

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	1
<b>1. 1. KOMPARTIMENTIERUNG</b> .....	1
<b>1. 2. ENDOCYTOSE</b> .....	5
<b>1. 2. 1. BEDEUTUNG DER ENDOCYTOSE</b> .....	5
<b>1. 2. 2. MECHANISMEN DER INTERNALISIERUNG</b> .....	7
<b>1. 2. 2. 1. Gliederung nach dem Aufnahme-</b> <b>Vorgang</b> .....	7
<b>1. 2. 2. 1. 1. Clathrin-vermittelte</b> <b>Endocytose</b> .....	7
<b>1. 2. 2. 1. 2. Clathrin-unabhängige</b> <b>Endocytose</b> .....	11
<b>1. 2. 2. 1. 3. Potocytose (Aufnahme über</b> <b>Caveolae)</b> .....	13
<b>1. 2. 2. 2. Gliederung nach der Interaktion mit</b> <b>Bestandteilen der Cytoplasma-Membran</b> .....	14
<b>1. 2. 2. 2. 1. Rezeptor-vermittelte</b> <b>Endocytose</b> .....	14
<b>1. 2. 2. 2. 2. Adsorptive Endocytose</b> .....	15
<b>1. 2. 2. 2. 3. Fluid-Phase Endocytose</b> .....	15
<b>1. 2. 3. ENDOCYTOTISCHE KOMPARTIMENTE</b> .....	17
<b>1. 2. 3. 1. Präendosomale Vesikel</b> .....	17
<b>1. 2. 3. 2. Frühe Endosomen (Sortierende</b> <b>Endosomen)</b> .....	18
<b>1. 2. 3. 2. 1. Morphologie</b> .....	18
<b>1. 2. 3. 2. 2. Funktionen früher Endosomen</b> .....	20
<b>1. 2. 3. 2. 3. Eigenschaften früher</b> <b>Endosomen</b> .....	21
<b>1. 2. 3. 3. Rezyklisierende Endosomen</b> .....	22
<b>1. 2. 3. 4. Träger-Vesikel zwischen frühen und</b> <b>späten Endosomen</b> .....	22
<b>1. 2. 3. 5. Späte Endosomen</b> .....	23
<b>1. 2. 3. 6. Lysosomen</b> .....	24
<b>1. 2. 4. DAS SAURE MILIEU IN ENDOCYTOTISCHEN</b> <b>KOMPARTIMENTEN</b> .....	25
<b>1. 2. 5. ENDOCYTOSE-MODELLE</b> .....	26
<b>1. 2. 5. 1. Das Vesikel-Transfer-Modell ("Vesicle</b> <b>Shuttle Model")</b> .....	26
<b>1. 2. 5. 2. Das Maturationsmodell</b> .....	27
<b>1. 2. 5. 3. Modell eines endosomalen Retikulums</b> .....	28
<b>1. 2. 5. 4. Konvergenz der Modelle</b> .....	29
<b>1. 3. TRANSCYTOSE</b> .....	29
<b>1. 3. 1. TRANSCYTOSE IN MDCK-ZELLEN</b> .....	30
<b>1. 4. MEMBRANFUSIONEN</b> .....	32
<b>1. 4. 1. Allgemeine Fusionsmodelle:</b>	
<b>1. 4. 2. Der Einfluß von N-Ethylmaleinimid auf</b> <b>Fusionsvorgänge</b> .....	35

1. 4. 3. Die Rolle von GTP-bindenden Proteinen .....	37
1. 4. 4. Fusionsvorgänge bei der Endocytose .....	42
1. 4. 4. 1. Frühe Endocytose-Ereignisse .....	42
1. 4. 4. 2. Fusionsprozesse im Bereich der frühen Endosomen.....	44
1. 4. 4. 2. 1. ATP-, Cytosol- und Temperaturabhängigkeit der Fusion .....	46
1. 4. 4. 2. 2. Hemmung der Endosomenfusion durch NEM und GTP $\gamma$ S.....	47
1. 4. 4. 2. 3. Die Rolle der GTP-bindenden Proteine rab4 und rab5.....	49
1. 4. 4. 2. 4. Andere Membran-assoziierte Fusionsfaktoren.....	51
1. 4. 4. 2. 5. Verschiedene Charakteristika der Fusion früher Endosomen.....	52
1. 4. 4. 3. Fusionen zwischen frühen Endosomen und rezyklisierenden Endosomen .....	55
1. 4. 4. 4. Fusionseigenschaften potentieller Träger-Vesikel zwischen frühen und späten Endosomen.....	56
1. 4. 4. 5. Fusionen zwischen apikal und basolateral markierten Endosomen polarisierter Zellen .....	57
1. 4. 4. 6. Interaktionen zwischen späten Endosomen und Lysosomen.....	58
1. 4. 4. 7. Interaktionen zwischen Lysosomen .....	61
1. 4. 4. 8. Fusion zwischen transcytotischen Vesikeln und apikaler Plasmamembran.....	61
1. 5. DIE LEBER ALS MODELLSYSTEM.....	62
1. 5. 1. ALLGEMEINER AUFBAU DER LEBER.....	62
1. 5. 2. ZELLTYPEN DER LEBER.....	63
1. 5. 2. 1. Hepatocyten .....	63
1. 5. 2. 2. Endothelzellen .....	67
1. 5. 2. 3. Kupfferzellen .....	67
1. 5. 2. 4. Ito-Zellen.....	67
1. 5. 2. 5. Pit-Zellen (granuläre Lymphocyten).....	67
1. 5. 3. FUNKTIONEN DER LEBER.....	68
1. 5. 3. 1. Metabolische Funktionen .....	69
1. 5. 3. 2. Die biliäre Sekretion.....	69
1. 5. 3. 3. Endocytose und Abbau von Asialoglykoproteinen .....	71
1. 5. 3. 4. Transcytose von polymerem IgA.....	72
1. 5. 3. 5. Nicht-Rezeptor-vermittelte Transcytose .....	75
2. ZIEL DER STUDIE .....	78

<b>3. MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	79
<b>3. 1. MATERIALIEN</b> .....	80
<b>3. 2. METHODEN</b> .....	80
<b>3. 2. 1. ALLGEMEINE METHODEN</b> .....	80
<b>3. 2. 1. 1. Die Methode der isoliert perfundierten Rattenleber</b> .....	80
<b>3. 2. 1. 1. 1. Organentnahme</b> .....	80
<b>3. 2. 1. 1. 2. Leberperfusion bei verschiedenen Temperaturen</b> .....	82
<b>3. 2. 1. 1. 3. Hypertone Leberperfusion</b> .....	85
<b>3. 2. 1. 1. 4. Kalium-freie Leberperfusion</b> .....	85
<b>3. 2. 1. 1. 5. Perfusionsfixierung</b> .....	86
<b>3. 2. 2. MORPHOLOGISCHE METHODEN</b> .....	87
<b>3. 2. 2. 1. Elektronenmikroskopie</b> .....	87
<b>3. 2. 2. 3. Präparation von Proben für die Fluoreszenzmikroskopie</b> .....	87
<b>3. 2. 2. 3. 1. Gefrierschnitte</b> .....	88
<b>3. 2. 2. 3. 2. Paraffinschnitte</b> .....	88
<b>3. 2. 2. 3. 3. Glykolmethylacrylat-Schnitte</b> .....	89
<b>3. 2. 2. 3. 4. Immunfluoreszenzfärbungen</b> .....	89
<b>3. 2. 2. 4. Fluoreszenzmikroskopie</b> .....	90
<b>3. 2. 2. 5. Digitale Bildverarbeitung</b> .....	91
<b>3. 2. 3. PRÄPARATIVE METHODEN</b> .....	91
<b>3. 2. 3. 1. Präparation von FITC-Dextran</b> .....	91
<b>3. 2. 3. 2. Präparation von Asialo-Orosomuroid (ASOR)</b> .....	92
<b>3. 2. 3. 3. Biotinylierung von Asialo-Orosomuroid</b> .....	92
<b>3. 2. 3. 4. Präparation von galaktosyliertem Avidin</b> .....	93
<b>3. 2. 3. 5. Beladung von Endosomen und Lysosomen</b> .....	94
<b>3. 2. 3. 5. 1. Beladung früher Endosomen mit Biotin-ASOR, Avidin oder FITC-Dextran</b> .....	94
<b>3. 2. 3. 5. 2. Beladung später Endosomen mit Biotin-ASOR, <sup>125</sup>J-ASOR oder gal-Avidin</b> .....	95
<b>3. 2. 3. 5. 3. Beladung von Lysosomen mit Biotin-Dextran und FITC-Dextran</b> .....	95
<b>3. 2. 3. 6. Homogenisierung der Leber</b> .....	96
<b>3. 2. 3. 7. Präparation von postnukleärem Überstand, Mikrosomen, Endosomenangereicherten Golgi-Fractionen und Lysosomen</b> .....	96
<b>3. 2. 3. 8. Cytosol-Präparation</b> .....	97

3. 2. 3. 9. Präparation peripherer Membranproteine .....	98
3. 2. 3. 10. Präparation polymerisierter Mikrotubuli .....	98
3. 2. 4. ANALYTISCHE METHODEN .....	99
3. 2. 4. 1. Proteinbestimmung nach Bradford.....	99
3. 2. 4. 2. Bestimmung der Peroxidase (HRP).....	100
3. 2. 4. 3. Messung der $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase-Aktivität .....	100
3. 2. 4. 4. Fluorimetrische Messung von FITC und Texas Rot.....	101
3. 2. 4. 5. Messung der Azidifizierungsfähigkeit von Endosomen.....	101
3. 2. 4. 6. Messung der TCA-präzipitierbaren und nicht-präzipitierbaren $^{125}\text{J}$ -Radoaktivität.....	102
3. 2. 4. 7. SDS-PAGE .....	103
3. 2. 4. 8. Silberfärbung .....	104
3. 2. 4. 9. Auswertung der SDS-PAGE.....	104
3. 2. 4. 10. <i>In vitro</i> -Fusionstest .....	105
3. 2. 4. 11. ELISA .....	106
3. 2. 4. 12. Bestimmung von Marker-Konzentrationen und Latenz in Membran-Präparationen .....	107
3. 2. 4. 13. Dichtegradientenzentrifugation nach der <i>in vitro</i> -Fusion.....	108
3. 2. 4. 15. Organellen-Durchflußanalyse (Single Organelle Flow Analysis, SOFA) .....	109
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>111</b>
<b>4. 1. APIKALE ENDOCYTOSE IN HEPATOCYTEN.....</b>	<b>111</b>
<b>4. 1. 1. ENTWICKLUNG EINES MARKIERUNGSSYSTEMS.....</b>	<b>111</b>
<b>4. 1. 1. 1. Optimierung der apikalen Markierung.....</b>	<b>111</b>
<b>4. 1. 2. MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>114</b>
<b>4. 1. 2. 1. Fluoreszenzmikroskopie apikaler Endosomen.....</b>	<b>114</b>
<b>4. 1. 2. 1. 1. Lokalisation apikaler Endosomen nach 2 min bei 37°C.....</b>	<b>114</b>
<b>4. 1. 2. 1. 2. Partielle Kolokalisation apikaler Endosomen und apikaler Membranproteine .....</b>	<b>115</b>
<b>4. 1. 2. 1. 3. Morphometrie apikaler Endosomen durch digitale Bildverarbeitung.....</b>	<b>118</b>
<b>4. 1. 2. 2. Elektronenmikroskopie apikaler Endosomen.....</b>	<b>119</b>
<b>4. 1. 3. AZIDIFIZIERUNG ANGEREICHERTER APIKAL MARKIERTER ENDOSOMEN .....</b>	<b>120</b>

4. 1. 3. 1. Vergleich mit den Azidifizierungseigenschaften von basolateralen frühen Endosomen und Lysosomen.....	121
4. 1. 4. <i>IN VIVO</i> -ZUSAMMENTREFFEN BASOLATERALER UND APIKALER ENDOCYTOSE- WEGE.....	122
4. 2. APIKAL-BASOLATERALER TRANSPORT .....	126
4. 3. BASOLATERAL-APIKALE TRANSCYTOSE.....	129
4. 3. 1. REZEPTOR-VERMITTELTE TRANSCYTOSE VON <sup>125</sup> J-ASOR .....	129
4. 3. 1. 1. ASOR-Transcytose unter normalen und hypertonen Bedingungen .....	129
4. 3. 2. TRANSCYTOSE VON HRP UND FITC- DEXTRAN .....	134
4. 3. 2. 1. Transcytose unter normalen Bedingungen (bei 37°C).....	135
4. 3. 2. 2. Transcytose bei 16°C und 37°C .....	137
4. 3. 2. 3. Transcytose von HRP bei 11°C, 16°C und 37°C .....	140
4. 3. 2. 4. Transcytose von HRP nach Beladung bei 4°C und Erwärmung auf 37°C .....	142
4. 3. 2. 5. Transcytose von HRP und FITC- Dextran unter hypertonen Bedingungen.....	144
4. 3. 2. 6. Transcytose von HRP und FITC- Dextran unter K <sup>+</sup> -freien Bedingungen.....	147
4. 3. 2. 7. Transcytose von HRP nach einer Stunde Vorperfusion bei 37°C .....	150
4. 3. 3. VERGLEICH ZWISCHEN HRP, FITC- DEXTRAN UND ASOR.....	151
4. 4. FUSIONSPROZESSE .....	154
4. 4. 1. ETABLIERUNG EINES <i>IN VITRO</i> FUSIONSSYSTEMS .....	154
4. 4. 1. 1. Bestimmung der optimalen Beschichtungskonzentration und der Linearität des ELISA-Systems .....	156
4. 4. 1. 2. Bestimmung des Biotinylierungsgrades von BASOR.....	156
4. 4. 1. 3. Charakterisierung des galaktosylierten Avidins im ELISA, durch SDS-PAGE und in der isoliert perfundierten Leber .....	158
4. 4. 1. 4. Aufnahme von <sup>125</sup> J-gal-Avidin in der isoliert perfundierten Leber und Kompetitierung der Aufnahme durch ASOR.....	159
4. 4. 2. <i>IN VITRO</i> FUSION ZWISCHEN FRÜHEN ENDOSOMEN, SOWIE ZWISCHEN FRÜHEN UND SPÄTEN ENDOSOMEN.....	159

4. 4. 2. 1. Kinetik und ATP-Abhängigkeit der Fusion.....	160
4. 4. 2. 2. Fusionseffizienz.....	162
4. 4. 2. 3. <i>In vitro</i> Fusion von PNS, Mikrosomen und angereicherten Endosomen .....	163
4. 4. 2. 4. Cytosol-Abhängigkeit der Fusion.....	165
4. 4. 2. 5. Die <i>in vitro</i> Fusion früher Endosomen ist unabhängig von KCl .....	166
4. 4. 2. 6. Einfluß von N-Ethylmaleinimid (NEM) auf die Fusion.....	168
4. 4. 2. 7. Einfluß von Nigericin, NH <sub>4</sub> Cl, Brefeldin A und Benzylamin auf die Endosomen-Fusion.....	171
4. 4. 2. 8. Fusion von frühen und späten Endosomen in Gegenwart polymerisierter Mikrotubuli .....	172
4. 4. 2. 9. Erhöhung der Dichte während der <i>in vitro</i> Fusion.....	173
4. 4. 3. VORINKUBATIONSTESTS.....	176
4. 4. 3. 1. Vorinkubation bei 37°C in Gegenwart oder Abwesenheit von Fusionspuffer .....	177
4. 4. 3. 2. Kinetik des Fusionsignalverlustes durch Vorinkubation .....	178
4. 4. 3. 3. Latenz von Avidin-PNS vor und nach der Vorinkubation.....	180
4. 4. 3. 4. Einfluß von Nigericin, Ammoniumchlorid und Benzylamin auf den Vorinkubationseffekt .....	181
4. 4. 3. 5. Mikrotubuli haben keinen Einfluß auf den Vorinkubationseffekt .....	183
4. 4. 3. 6. Zugabe von Cytosol nach der Vorinkubation.....	183
4. 4. 3. 7. Regenerierung der Fusionsfähigkeit durch periphere Membranproteine .....	185
4. 4. 3. 8. Reduktion der fusionsregenerierenden Wirkung peripherer Membranproteine durch NEM und GTPγS.....	187
4. 4. 3. 9. SDS-PAGE der Präparation peripherer Membranproteine.....	188
4. 4. 4. <i>IN VITRO</i> FUSION VON ENDOSOMEN MIT LYSOSOMEN .....	190
4. 4. 4. 1. Etablierung des Fusionssystems.....	190
4. 4. 4. 2. Hemmung der Endosomen-Lysosomen Fusion durch NEM und durch Vorinkubation der Endosomen.....	192
4. 4. 5. MESSUNG DER <i>IN VITRO</i> FUSION DURCH DURCHFLUSS-ANALYSE	

<b>FLUORESZENZMARKIERTER ENDOSOMEN</b>	
<b>(SINGLE ORGANELLE FLOW ANALYSIS, SOFA):</b>	
4. 4. 5. 1. FACS-Analyse von Standardpartikeln (Beads).....	194
4. 4. 5. 2. SOFA fluoreszenzmarkierter Membran-Präparationen.....	195
4. 4. 5. 3. Zunahme des Side Scatters früher Endosomen nach Inkubation unter Fusionsbedingungen .....	197
4. 4. 5. 4. Temperaturabhängigkeit der Fusion.....	201
4. 4. 5. 5. Fusion in KAcSH- und KCISH-Puffer in Gegenwart und Abwesenheit von Nigericin .....	203
4. 4. 5. 6. SOFA von Lysosomen nach Inkubation unter Fusionsbedingungen.....	204
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>208</b>
<b>5. 1. APIKALE ENDOCYTOSE UND 5. 2. APIKAL-BASOLATERALER TRANSPORT.....</b>	<b>208</b>
<b>5. 3. BASOLATERAL-APIKALE TRANSCYTOSE.....</b>	<b>209</b>
<b>5. 4. FUSIONSPROZESSE .....</b>	<b>212</b>
5. 4. 1. Allgemeine Überlegungen über Unterschiede zwischen den Fusionsbedingungen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	212
5. 4. 2. Fusionsfähigkeiten verschiedener endocytischer Kompartimente in Hepatocyten .....	214
5. 4. 3. Charakteristika der Hepatocyten-Endosomenfusion.....	218
5. 4. 3. 1. Gemeinsamkeiten mit anderen Fusionsprozessen.....	218
5. 4. 3. 2. Unterschiede zu anderen Fusionsprozessen.....	218
5. 4. 3. 2. 1. Kinetik der Fusion.....	218
5. 4. 3. 2. 2. Fusionseffizienz.....	220
5. 4. 3. 2. 3. Cytosol-Abhängigkeit der Fusion.....	221
5. 4. 3. 2. 4. Unabhängigkeit der Endosomenfusion vom Puffersystem.....	222
5. 4. 3. 2. 5. Lokalisation der NEM-Sensitivität .....	223
5. 4. 3. 2. 6. Einfluß von Nigericin, Ammoniumchlorid und Benzylamin.....	225
5. 4. 3. 2. 7. Unabhängigkeit der Fusion zwischen frühen und späten endocytischen Kompartimenten von intakten Mikrotubuli .....	226
5. 4. 3. 2. 8. Erhöhung der Endosomen-Dichte während der Fusion .....	227

5. 4. 3. 2. 9. Verlust der Fusionsfähigkeit durch Vorinkubation .....	229
5. 4. 3. 2. 10. <i>In vitro</i> Fusion von Endosomen mit Lysosomen.....	233
5. 4. 3. 2. 11. Durchfluß-Analyse fluoreszenzmarkierter Endosomen zur Messung der <i>in vitro</i> Fusion.....	235
<b>6. CONCLUSIO</b> .....	237
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	240
<b>ANHANG A: PUFFERLÖSUNGEN</b> .....	263
<b>ANHANG B: The acidic environment in endocytic compartments</b> .....	265
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	271
 ANHANG B	
<b>The acidic environment in endocytic compartments</b> .....	271
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	277



# 1. EINLEITUNG

## 1. 1. KOMPARTIMENTIERUNG

Eines der wesentlichsten Charakteristika aller bis jetzt gefundenen Lebensformen ist ihre Abgrenzung von der Umwelt; also die Kompartimentierung ihrer eigenen Organisationsform. Erst diese Abgrenzung ermöglicht das Auftreten von elektrochemischen Gradienten, und damit die Existenz energetischer Potentialdifferenzen. Die Tendenz zum Ausgleich dieser Differenzen in Form eines Fließgleichgewichts macht die Aufrechterhaltung eines höheren Ordnungszustandes innerhalb dieses Kompartiments, und somit die temporär und räumlich begrenzte Reduktion des Entropiegrades möglich (Negentropie).

Aufgrund der Abgrenzung bilden Kompartimente Reaktionsräume, wobei jedoch keine Homogenität innerhalb eines Reaktionsraumes gegeben sein muß. Prokaryonten können als Lebensformen angesehen werden, bei denen die vitale Organisationsstruktur als einzelnes Kompartiment mit nur einer Abgrenzung gegenüber der Umwelt verwirklicht ist. Eukaryonten, hingegen zeichnen sich durch eine Organisationsform aus, in der verschiedene Kompartimente mit unterschiedlichen inneren Milieus, innerhalb eines gemeinsamen, umfassenden Kompartiments existieren (siehe Abb. 1. 1.).

Die Abgrenzung der Kompartimente wird im allgemeinen durch Membranen aus Phospholipiden und Membranproteinen gebildet. Dabei bilden die Phospholipide eine Doppelschicht (Lipid-Bilayer) mit den hydrophoben Fettsäureketten auf der inneren Seite und den polaren, hydrophilen Resten auf den beiden Außenseiten. Diese Konfiguration entspricht dem wäßrigen Milieu unserer Umwelt. Der Zusammenhalt der Doppelschicht wird hauptsächlich durch die hydrophoben Wechselwirkungen der Lipide gewährleistet, die jedoch zum Großteil nicht auf Van der Waal'sche Kräfte zurückzuführen sind, sondern darauf, daß durch die Interaktion hydrophober Gruppen in einem wäßrigen Milieu die Entropie der umgebenden Wassermoleküle steigt. Oberhalb einer bestimmten Temperatur erlaubt diese Art der Interaktion eine hohe Flexibilität, bzw. laterale Mobilität der einzelnen Komponenten.

Transversale Bewegungsvorgänge von einer Seite der Doppelschicht auf die andere sind dagegen äußerst selten. Membranproteine sind nach dem "Fluid

Mosaic"-Modell von Singer & Nicolson durch hydrophobe Gruppen in die flexible Doppelschicht eingebettet, in der sie normalerweise lateral diffundieren können (außer sie sind mit dem darunterliegenden Cytoskelett verknüpft und immobilisiert).

Die Zellmembran, als äußerste Grenzfläche der Zelle gegenüber der Umwelt, trennt eine cytoplasmatische von einer extracytoplasmatischen Phase; das gleiche gilt im Prinzip auch für intrazelluläre Kompartimente. Der Inhalt dieser Kompartimente ist extracytoplasmatisch und entspricht somit von der räumlichen Anordnung her dem Extrazellulär-Raum. Nach dieser Kompartimentierungsregel zählt man das Innere des Kerns (Karyoplasma), das Cytoplasma, sowie die Innenräume der Mitochondrien und Plastiden zu den plasmatischen Phasen. Nicht-plasmatische Phasen sind das Lumen von ER, Golgi, Endosomen, Lysosomen und anderen intrazellulären Kompartimenten, die nur von einer Membran umgeben sind, sowie die Zwischenräume zwischen Doppelmembranen, wie sie bei Mitochondrien und Plastiden vorkommen. Ein Charakteristikum der plasmatischen Phase ist, daß normalerweise nur sie Nukleinsäuren enthält (Kleinig & Sitte, 1986).

Bei Fusions- und Spaltungsprozessen von Kompartimenten können nur gleichartige Phasen verschmelzen bzw. sich voneinander abtrennen. Dieses Prinzip liegt den Fusions- und Fissionsereignissen der Exocytose wie auch der Endocytose zugrunde.

Die Lipid-Membranen sind jedoch nicht nur funktionell in cytoplasmatische und extracytoplasmatische Seite differenziert, sondern auch strukturell asymmetrisch; die Phospholipid-Zusammensetzungen der beiden Schichten können beträchtlich differieren, ebenso wie die Lipid-Zusammensetzungen verschiedener intrazellulärer Kompartimente. Dennoch ist die Kompartimentierung der Zelle nicht statisch, sondern außerordentlich dynamisch. In einem Membranfluß findet ein kontinuierlicher Austausch statt, der in einem Fließgleichgewicht metastabile Verhältnisse aufrecht erhält. So ist z.B. die Zelloberfläche ziemlich konstant, obwohl aufgrund der Endocytose-Vorgänge bei Makrophagen z.B. die gesamte Cytoplasma-Membran innerhalb einer halben Stunde internalisiert werden kann (Steinman et al., 1976).

Abb. 1. 1.

Schema der wichtigsten Kompartimente einer Eukaryonten-Zelle:  
(Die Größenverhältnisse entsprechen nicht den realen Relationen)

Ein wesentlicher Parameter von Kompartimenten ist deren spezifische Oberfläche, das ist die Oberfläche bezogen auf das Volumen des Kompartiments. Dieser Parameter ist meist relativ groß bei Kompartimenten, deren primäre Aufgaben Membran-bezogen sind, und eher klein bei sphärischen Strukturen, die eine Kugel-ähnliche Form aufweisen und z.B. Speicher- oder Transportfunktionen ausüben, bzw. Aufgaben, die im Lumen ablaufen, wie etwa Abbau-Vorgänge bei Lysosomen. Bei einer Vergrößerung kugelförmiger Kompartimente wächst die Oberfläche mit dem Quadrat des Radius, das Volumen aber mit der dritten Potenz. Kompartimente mit großer spezifischer Oberfläche sind hingegen oft tubulär oder flächenförmig (Zisternen-artig). Diese Strukturen sind näherungsweise ein- oder zweidimensional, folglich wird die spezifische Oberfläche bei einem Fusionsvorgang nicht wesentlich verändert. Bei einer Fusion zweier Kompartimente dieses Typs sind sowohl Gesamtvolumen, als auch die gesamte Oberfläche näherungsweise die Summe der Einzelwerte. Dies ist bei einer Fusion kugelförmiger Kompartimente nicht der Fall. Wenn aus der Summe der beiden Einzelvolumina ein neues größeres Kugelgebilde entsteht, würde die

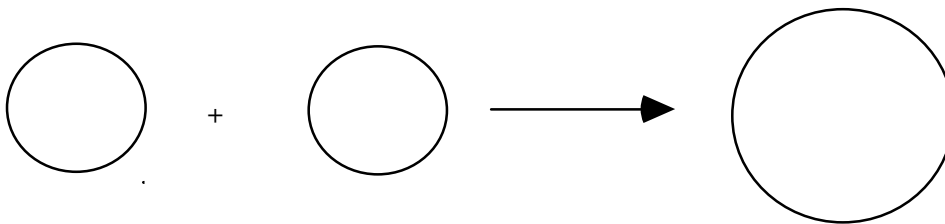
Oberfläche dieser Kugel deutlich kleiner sein als die Summe der einzelnen Oberflächen (siehe Abb. 1. 2.).

**Fusion zweier tubulärer Kompartimente:**



$$\begin{aligned}
 V_1 &= r^2 \pi h & V_2 &= r^2 \pi h & V' &= 2 r^2 \pi h \\
 O_1 &= 2 r^2 \pi + 2 r \pi h & O_2 &= 2 r^2 \pi + 2 r \pi h & O' &= 2 r^2 \pi + 4 r \pi h \\
 O_1 + O_2 &= 4 r^2 \pi + 4 r \pi h \dots\dots \text{wenn } 2 r^2 \pi \text{ klein ist, so gilt:} & O_1 + O_2 &= O'
 \end{aligned}$$

**Fusion zweier kugelförmiger Kompartimente:**



$$\begin{aligned}
 V_1 &= (4 r^3 \pi) / 3 & V_2 &= (4 r^3 \pi) / 3 & V' &= (8 r^3 \pi) / 3 = (4 R^3 \pi) / 3 \\
 O_1 &= 4 r^2 \pi & O_2 &= 4 r^2 \pi & R &= r \sqrt[3]{2} \\
 O_1 + O_2 &= 8 r^2 \pi & & & O' &= 4 R^2 \pi = 4 \sqrt[3]{4} r^2 \pi \\
 & & & & &= ca. 6,35 r^2 \pi
 \end{aligned}$$

Abb. 1. 2.

Wenn die Fusion einer Anzahl  $n$  kugelförmiger Vesikel betrachtet wird, so ergibt sich eine gesamte Membranoberfläche:  $O_{\text{gesamt}} = 4 n r^2 \pi$

Wenn diese Vesikel wieder ein kugelförmiges Kompartiment bilden würden, so ergäbe sich für diese Kugel eine Oberfläche:  $O = 4 \sqrt[3]{n^2} r^2 \pi$

Bei einer Anzahl von 890 präendosomalen Vesikeln mit einem Radius von 37,5 nm, die z.B. ein frühes tubulovesikuläres Endosom bilden (Courtoy, 1991), errechnet sich eine Oberfläche von  $3560 r^2 \pi$  ( $= 15,7 \mu\text{m}^2$ );

die Summe der Volumina dieser Vesikel ergäbe jedoch eine Kugel mit einer Oberfläche von ca.  $370 r^2 \pi$  ( $= 1,63 \mu\text{m}^2$ ).

Wenn sich das Gesamtvolumen nicht ändert, würde somit eine Fusion kugelförmiger Vesikel Ein- oder Ausstülpungen von Membran-Anteilen

begünstigen. Genauso könnte natürlich durch einen Einstrom von Wasser das Volumen erhöht werden, wodurch die Kugelgestalt aufrechterhalten bleibt. Dies würde jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach zu einer Verringerung der Kompartiment-Dichte führen.

## **1. 2. ENDOCYTOSE**

### **1. 2. 1. BEDEUTUNG DER ENDOCYTOSE**

Nach der Kompartimentierungsregel kann man die Endocytose als Aufnahme von Extrazellulär-Raum ansehen, bei der dieser durch aktive Vorgänge der Zelle so weit verändert wird, daß er von der Zelle "kontrolliert" werden kann. Die Aufnahme erfolgt durch Abschnürung der Cytoplasma-Membran ins Zellinnere, wobei der Prozeß ursprünglich in die Aufnahme ganzer Partikel (Phagocytose, von griech. *phagein* = fressen) und die Aufnahme von Flüssigkeit (Pinocytose von griech. *pinein* = trinken) unterteilt wurde.

Es wird angenommen, daß der Vorgang der Endocytose evolutionär aus dem Mechanismus der Nahrungsaufnahme in frühen einzelligen Organismen entstanden ist. Die Funktion der Endocytose hat sich jedoch im Lauf der Entwicklung zu höheren Lebewesen immer mehr spezialisiert, und nur in bestimmten Fällen dient sie noch der Internalisierung von Substanzen mit Nahrungscharakter, wie z.B. bei der Endocytose von Transferrin zur Aufnahme von Eisen, oder bei der LDL-Endocytose zur Rekrutierung von Cholesterin. Die Beschaffung der meisten Nährstoffe erfolgt bei Säugetierzellen durch transmembranen Transport der niedermolekularen energiereichen Verbindungen aus dem Blut, bzw. Extrazellulär-Raum. Der Endocytose-Mechanismus, als Methode zur Nahrungsaufnahme, wurde jedoch von den Zellen für verschiedenste Aufgaben adaptiert, z.B. für die Interaktion mit anderen Zellen, für Immunreaktionen, zur Regulation zellulärer Prozesse über Wachstums-hormone, zur Eliminierung körperfremder Zellen oder zum Abbau extrazellulärer Makromoleküle (Kleinig & Sitte, 1986, Seite 95 ff).

Die Entstehung des Endocytose-Mechanismus scheint in einer elementaren Form bereits vor der Evolution voll ausgebildeter Eukaryonten stattgefunden zu haben. Nachdem viele Bakterien durch Membran-assoziierte Ribosomen

Exoenzyme mit Verdauungsfunktionen ausschleusen, könnte eine Einstülpung und Abschnürung der Membran günstigere Abbau-Bedingungen und somit einen Selektionsvorteil bewirkt haben. Die Verdauungsvakuole würde in dieser einfachen Form die Funktionen von ER, Golgi, Endosomen und Lysosomen in sich vereinen. Die Endosymbionten-Hypothese zur Erklärung des Auftretens von Mitochondrien und Chloroplasten setzt die Existenz eines derartigen primitiven endocytierenden Organismus voraus. Der Sprung vom Prokaryonten zum Eukaryonten wäre also durch die Evolution der Phagozytose kombiniert mit der Internalisierung prokaryontischer Zellen erklärbar (De Duve, 1986, Seite 94 ff).

Die Interpretation der Endocytose als Aufnahme von Extrazellulär-Raum ("Umwelt") ins Zellinnere und darauffolgende aktive Veränderung dieses Reaktionsraumes erscheint deshalb plausibel, weil dieser Vorgang einen generellen Selektionsvorteil liefert. Die Zelle kann aufgrund der praktischen Unbegrenztheit der Umwelt diese nicht kontrollieren. Ausgeschleuste Enzyme, Ionen oder Wirkstoffe würden durch die Diffusion laufend verlorengehen. Eine Umschließung von Extrazellulär-Raum führt jedoch zu seiner räumlichen Limitierung. Ein Transport von Enzymen in diesen eingeschlossenen Extrazellulär-Raum ermöglicht dann einen effizienten Abbau extrazellulärer Verbindungen. Von diesem Blickwinkel aus gesehen, erscheint die Tatsache, daß lysosomale Enzyme nach ihrer Synthese am rauhen ER und Transport durch den Golgi vom Sekretionsweg abzweigend zum Endocytose-Weg transportiert werden, als eine Art intrazelluläre Sekretion, bei der die Zelloberfläche selbst in einem "Bypass"-Schritt übergangen wird. In diesem Zusammenhang ist auch die Parallele zwischen Clathrin-vermittelter Endocytose und ebenfalls Clathrin-abhängiger Abzweigung der lysosomalen Enzyme vom Sekretionsweg interessant. Man könnte das Innere des Golgi-Apparates aufgrund des Faktums, daß es eine nicht-plasmatische Phase darstellt, als Äquivalent des Extrazellulär-Raumes betrachten. Somit wäre eine Abschnürung Clathrin-umhüllter Vesikel vom *trans*-Golgi Retikulum in das Cytoplasma äquivalent zu einer Endocytose von der Zelloberfläche. Die Fusion der Transportvesikel mit endocytischen Kompartimenten wäre dann wiederum einer Sekretion in den Extrazellulär-Raum gleichzusetzen.

Wenn man annimmt, daß die Zelle extrazellulären Raum internalisiert, um ihn dann kontrollieren und verändern zu können, so erklärt das auch, warum sich verschiedene Parameter entlang des Endocytose-Weges verändern. So ist etwa die Azidität kleiner, sehr früher endocytischer Kompartimente nahe am extrazellulären Wert, während Kompartimente die ein späteres Stadium

darstellen ein zunehmend saures Milieu aufweisen. In ähnlicher Weise ändern sich auch das Redoxpotential, die Dichte und der Gehalt an verschiedenen lumenalen, sowie Membran-ständigen Proteinen.

Man könnte also sagen, daß die Zelle Extrazellulär-Raum, der an sich nahezu unveränderbar ist, zuerst umschließt und dann rasch so weit verändert und eigene Strukturbestandteile einbaut, bis dieser Reaktions-raum ein Bestandteil der Zelle geworden ist.

## 1. 2. 2. MECHANISMEN DER INTERNALISIERUNG

### 1. 2. 2. 1. Gliederung nach dem Aufnahme-Vorgang

#### 1. 2. 2. 1. 1. Clathrin-vermittelte Endocytose

Ein besonders gut untersuchter Mechanismus der Endocytose ist die Aufnahme über Clathrin-umhüllte Einstülpungen der Cytoplasma-Membran ("Clathrin-Coated Pits") und die daraus entstehenden Clathrin-umhüllten Vesikel ("Clathrin-Coated Vesicles"). Der Clathrin-Mantel besteht aus Triskelion-Untereinheiten (Abb. 1. 3.), die sich von innen in einem "Self-Assembly"-Prozeß an die Cytoplasma-Membran anlagern und dabei ein hexagonales Gitter aufbauen. Jede Ecke wird dabei vom Mittelpunkt eines Triskelions gebildet, die Kanten aus jeweils 4 Schenkeln (2 langen und 2 kurzen, siehe Abb. 1. 4.).

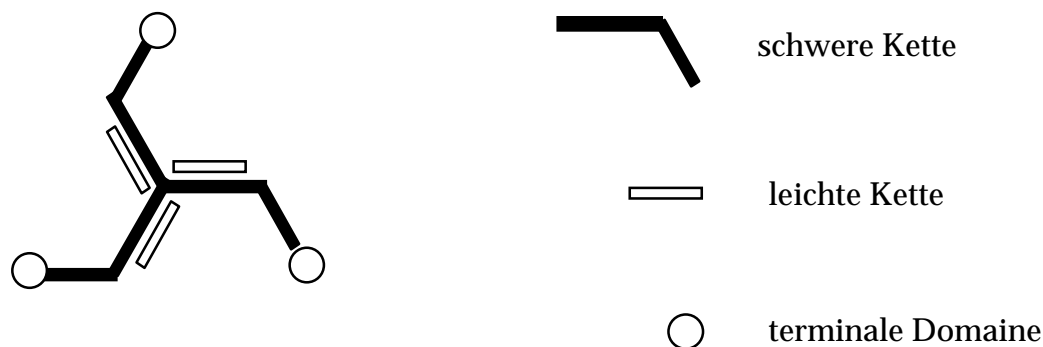


Abb. 1. 3.

Aufbau eines Clathrin-Triskelions (nach Schmid, 1992).

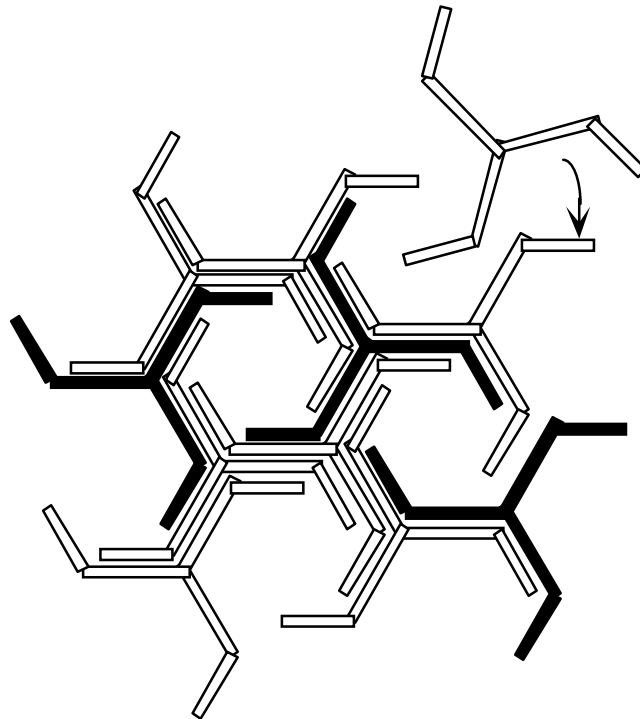


Abb. 1. 4.

Modell der Struktur eines Clathrin-Mantels aus Triskelion-Einheiten

(nach De Duve, 1986, Seite 214): Die leichten Ketten und terminalen Domänen sind nicht eingezeichnet.

Nachdem die Triskelions nicht flach, sondern leicht gekrümmt sind, führt die Assoziation mehrerer Einheiten zu einer Krümmung des Mantels. Zur Anpassung des Gitters an die zunehmende Krümmung beim Wachsen des Mantels, werden manche Einheiten wieder abgelöst, und es werden Fünf- und Siebenecke gebildet. Ein Clathrin-Mantel mit der gleichen Struktur wird auch bei der Abspaltung lysosomaler Enzyme vom *trans*-Golgi Retikulum gebildet. Zwischen der Clathrin-Hülle und der Vesikel-Membran liegt noch eine Schicht von Adaptor-Proteinen, die einen Komplex aus vier Untereinheiten bilden.



Diese Schicht ist sowohl bei der Endocytose, als auch bei der Abzweigung der lysosomalen Enzyme vom *trans*-Golgi Retikulum zu finden. Der Adaptor-Protein-Komplex des Golgi-Bereiches wird als AP1 bezeichnet, er besteht aus den Untereinheiten  $\beta'$  und  $\gamma$  (jeweils 100 - 110 kDa), sowie einer 47 kDa- und einer 19 kDa-Untereinheit. Der Komplex der Endocytose, AP2, besteht aus den Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , die den Einheiten  $\gamma$  und  $\beta'$  sehr ähnlich sind, sowie aus einer 50 kDa- und einer 17 kDa-Einheit, die ebenfalls den entsprechenden Golgi-Untereinheiten ähneln (Morris et al., 1989; Pearse & Robinson, 1990; Schmid, 1992; siehe Abb. 1. 5.).

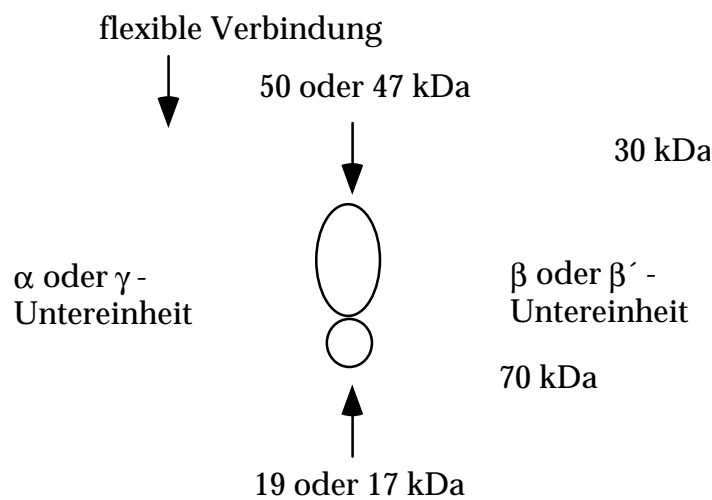


Abb. 1. 5.

Struktur eines Adaptor-Komplexes (nach Schmid, 1992)

Die Adaptor-Protein-Komplexe binden über ihre  $\beta$ -, bzw.  $\beta'$ -Einheiten an Clathrin und unterstützen die Aneinanderlagerung der Clathrin-Triskelions. Zusätzlich binden die Adaptor-Proteine an die Cytoplasma-Membran, höchstwahrscheinlich durch eine Interaktion mit der cytoplasmatischen Domäne von Rezeptoren. Dies ist für den Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor und den LDL-Rezeptor gezeigt worden (Glickman et al., 1989), für den Asialoglykoprotein-Rezeptor (Beltzer & Spiess, 1991) und lysosomale saure Phosphatase (Sosa et al., 1993). Ein wesentliches Signal für eine Endocytose dürfte in diesem Zusammenhang eine Tyrosin-enthaltende Sequenz des Rezeptors sein, die einen starken Knick (" $\beta$ -turn") in der

Aminosäure-Kette verursacht (Trowbridge, 1991; Trowbridge et al., 1993). Einer Di-Leucin enthaltenden Sequenz, die möglicherweise ein Signal für einen Transport zu den Lysosomen darstellt, wird ebenfalls eine Rolle für die Endocytose zugeschrieben, vor allem bei Proteinen, die über keine Tyrosin-Sequenz verfügen (Trowbridge et al., 1993).

Man kann den Komplex aus Adaptor-Proteinen und Clathrin als eine Art Filter betrachten, in dem die zu internalisierenden Rezeptoren festgehalten werden (Hopkins, 1992). Einige Rezeptoren, wie z.B. der LDL-Rezeptor, werden in den Clathrin-umhüllten Einstülpungen der Cytoplasma-Membran konzentriert (Goldstein et al., 1985), viele Membranproteine bleiben jedoch gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt; für den Fc-Rezeptor wurde wiederum aufgezeigt, daß seine Endocytose durch eine cytoplasmatische Domäne, die die Aufnahme in Clathrin-Coated Pits verhindert, reguliert wird (Miettinen et al., 1992); in ähnlicher Weise wird beim T-Zellen-Membranprotein CD4 durch eine Tyrosin-Kinase die Aufnahme in Clathrin-Coated Pits verhindert (Pelchen-Matthews, 1992). Man könnte also von positiven und negativen Coated Pit-Lokalisations-signalen sprechen (Watts & Marsh, 1992).

Trotz der komplexen Interaktion zwischen Rezeptoren, Adaptor-Proteinen und Clathrin, sowie der scheinbar aufwendigen Assoziation von Clathrin-Triskelions bei der Bildung des Mantels, ist die Anzahl der internalisierten Clathrin-umhüllten Vesikel beträchtlich. Für BHK-Zellen wurde eine Aufnahme von 1500 - 3000 Vesikeln pro Minute angegeben (Marsh & Helenius, 1980), für Hepatocyten sogar die Internalisierung von etwa 10 000 Vesikeln pro Minute (Courtoy, 1991).

In Fibroblasten nehmen Clathrin-umhüllte Einstülpungen 1 - 2% der Zelloberfläche ein; ihre Bildung erfolgt mit einer Halbwertszeit von etwa 5 min, während die Halblebenszeit der Clathrin-umhüllten Vesikel nur ca. 1 min beträgt (Gruenberg & Howell, 1989). Sehr bald nach ihrer Abschnürung von der Cytoplasma-Membran verlieren sie ihren Clathrin-Mantel durch eine sogenannte "Uncoating ATPase", die zur Familie der 70 kDa-Hitzeschock-Proteine zählt (Gao et al., 1991). Die kurze Lebenszeit der Clathrin-umhüllten Vesikel ist auch in Übereinstimmung mit der für polymerisiertes Clathrin angegebenen Halblebenszeit von nur 10 - 15 sec. (Gruenberg & Howell, 1989).

Die Anlagerung und Dissoziation des Clathrin-Mantels erfolgt also in einem sehr raschen Zyklus. Zuerst kommt es an der Innenseite der Membran zu einem Initiationsschritt, bei dem sozusagen ein Clathrin-Kristallisationskeim angelagert wird, und zwar über eine Interaktion mit Adaptor-Proteinen, die ihrerseits wieder an die cytoplasmatische Domäne des Rezeptors binden. *In*

*vitro* können z.B. gereinigte AP2-Komplexe in Verbindung mit Clathrin die Einstülpung der Membran stimulieren (Smythe et al., 1992). Dieser Schritt erfordert die Hydrolyse von ATP und möglicherweise die Anwesenheit bestimmter GTP-bindender Proteine.

Das Wachstum des Clathrin-Mantels dürfte keine metabolische Energie erfordern und als "Self-Assembly" ablaufen. Mit zunehmender Größe der Clathrin-Fläche wird auch die Krümmung der Membran gefördert. Für die vollständige Einstülpung der Membran ist Cytosol, ATP und GTP notwendig, also auch dabei scheinen GTP-bindende Proteine involviert zu sein. Der Fissionsvorgang, also die Abschnürung des Vesikels dürfte unter der Beteiligung heterotrimerer G-Proteine vor sich gehen und wiederum die Hydrolyse von ATP erfordern (Schmid & Smythe, 1991; Schmid, 1992; Schmid, 1993; Carter et al., 1993). Von einer Arbeitsgruppe wurde beschrieben, daß die Abschnürung  $Ca^{2+}$ -abhängig ist (Lin et al., 1991), und unter Beteiligung von Annexin VI abläuft (Lin et al., 1992). In A431-Zellen dürfte jedoch Annexin VI nicht beteiligt sein (Smythe et al., 1994). Der den Zyklus abschließende Prozeß der Ablösung des Clathrin-Mantels ist ebenfalls ATP-abhängig. Ob dabei gleichzeitig die Adaptor-Proteine vom Vesikel abgelöst werden ist nicht bekannt; *In vitro*-Untersuchungen bei denen der Clathrin-Mantel unter Bedingungen abgelöst wurde, bei denen die AP2-Komplexe an den Vesikeln gebunden bleiben, haben allerdings ergeben, daß die Adaptor-Proteine die Aggregation der Vesikel induzieren. Somit könnten sie eine Rolle für die Vorbereitung der Fusion dieser Vesikel spielen (Beck et al., 1992).

### **1. 2. 2. 1. 2. Clathrin-unabhängige Endocytose**

Die Frage, ob Endocytose-Prozesse unabhängig von Clathrin auftreten, ist zumindest bei einigen Zelllinien noch nicht vollständig geklärt. Während manche Studien zeigen, daß die gesamte Aufnahme von Flüssigkeit und Membran während der Endocytose auf Clathrin-abhängige Endocytose zurückgeführt werden kann (in BHK-Zellen: Marsh & Helenius, 1980); zeigten andere Untersuchungen, daß unter Bedingungen, die die Clathrin-vermittelte Internalisierung hemmen, die Endocytose von Fluid-Phase Markern nicht blockiert werden kann. Im wesentlichen wurden drei verschiedene experimentelle Manipulationen eingesetzt, um den Clathrin-abhängigen Weg zu hemmen: Ein hypotoner Schock gefolgt von  $K^+$ -freier Inkubation, die

Inkubation in hypertonem Medium, sowie die Inkubation in saurem Medium, um den pH-Wert des Cytosols zu senken.

Frühe Untersuchungen an Hep-2 Zellen haben gezeigt, daß eine Kombination von hypotonem Schock und K<sup>+</sup>-freier Inkubation zum Verschwinden von Coated Pits führt, und gleichzeitig die Endocytose von Transferrin und bestimmten Viren blockiert, während die Aufnahme anderer Viren nicht gehemmt wird (Madshus et al., 1987). Ein ähnlicher Effekt wurde durch Inkubation in saurem Medium erzielt, was zu einer Ansäuerung des Cytosols (unter pH 6,5) führt. Dabei werden zwar Clathrin-umhüllte Membran-Einstülpungen ausgebildet, die Abschnürung von Clathrin-umgebenen Vesikeln jedoch blockiert. Während Marker der Clathrin-abhängigen Endocytose nicht mehr aufgenommen werden, kommt es nur zu einer geringen Reduktion der Aufnahme von Fluid-Phase-Markern und des Proteins Ricin, das an Glykolipide der Membran bindet (bei Vero-, Hep 2-, MCF 7- und A431-Zellen; Sandvig et al., 1989). Bei BHK-Zellen und Fibroblasten blockierte jedoch eine ähnliche experimentelle Manipulation auch die Aufnahme von HRP, das in diesen Zellen als Fluid-Phase Marker angesehen werden kann (Davoust et al., 1987; Cosson et al., 1989). Inkubation von isolierten Hepatocyten in hypertonem Medium blockierte die Rezeptor-vermittelte Endocytose von Asialoglyko-proteinen, nicht jedoch die Aufnahme der Fluoreszenzverbindung "Lucifer Yellow" (Oka et al., 1989). In Fibroblasten wurde unter ähnlichen Bedingungen sowohl die LDL-, als auch die HRP-Endocytose unterbunden. Morphologisch konnte gezeigt werden, daß sich die Struktur von Clathrin an der Membran ändert und keine funktionsfähigen Clathrin-umhüllten Vesikel entstehen (Heuser & Anderson, 1989).

Die Ergebnisse unter diesen Versuchsbedingungen weisen also darauf hin, daß zumindest in bestimmten Zellen zusätzlich zur Clathrin-abhängigen Endocytose ein Clathrin-unabhängiger Mechanismus existiert, während dieser in BHK-Zellen und Fibroblasten unwahrscheinlich erscheint.

Dieser Clathrin-unabhängige Aufnahmeweg ist unempfindlich gegen Verringerung des cytosolischen pH-Wertes, die Reduktion intrazellulären Kaliums und Inkubation in hypertonem Medium; er wird jedoch durch Cytochalasin D und Colchicin (in Vero-Zellen) gehemmt (Sandvig & van Deurs, 1990). Cytochalasin D führt zu einer Inaktivierung von Mikrofilamenten, Colchicin lagert sich an Tubulin-Dimere an und verhindert so die Ausbildung von Mikrotubuli. Beide Agenzien können die Clathrin-abhängige Endocytose nicht blockieren; der Clathrin-unabhängige Weg scheint aber von den beiden angeführten Elementen des Cytoskeletts abhängig zu sein.

Genauere morphologische Studien in Hep-2- und A431-Zellen, bei denen die gesamte Zelloberfläche mit Gold-markiertem Concanavalin A beladen wurde, zeigte, daß Clathrin-umhüllte und nicht Clathrin-umhüllte präendosomale Vesikel etwa mit der gleichen Häufigkeit auftreten, daß die Clathrin-umhüllten Vesikel aber ein wenig größer sind (110 nm im Vergleich zu 95 nm). Durch selektive Markierung des Clathrin-abhängigen Weges wurde gezeigt, daß eine Ablösung des Clathrin-Mantels nicht die Erklärung für das Auftreten der nicht Clathrin-umhüllten Vesikel ist (Hansen et al., 1991). Obwohl damit gezeigt wurde, daß diese beiden Internalisierungswege unterschiedlich sind, scheinen sie sich im Bereich der frühen Endosomen wieder zu vereinen (Hansen et al., 1993).

Zusätzlich zu den hier aufgezeigten Clathrin-unabhängigen Wegen der Endocytose existiert jedoch noch ein anderer Aufnahmevorgang, der Clathrin-unabhängig ist, sich jedoch in der Größe der involvierten Vesikel von den vorher beschriebenen unterscheidet. Dieser Aufnahme-Prozeß wird als Makropinocytose bezeichnet; er wird durch Wachstumsfaktoren und Phorbol-ester induziert und führt zur Entstehung großer Vakuolen mit einem Durchmesser bis zu mehreren Mikrometern. So wie der bereits beschriebene Clathrin-unabhängige Internalisierungsvorgang wird er ebenfalls durch Cytochalasin D, Colchicin, und Nocodazol gehemmt, was auch für die Phagozytose größerer Partikel gilt (Watts & Marsh, 1992).

In Analogie dazu wurde auch in der isoliert perfundierten Leber und in Hepatocyten beobachtet, daß EGF in höherer Dosis seine eigene Internalisierung durch einen Phenylarsin-unempfindlichen Weg (der möglicherweise mit dem makropinocytischen Weg ident ist) stimuliert (Kato et al., 1992).

Die Stimulierung der Makropinocytose durch Wachstumsfaktoren beeinflusst die Clathrin-abhängige Endocytose nicht (Racoosin & Swanson, 1992), und es konnte in A431-Zellen nachgewiesen werden, daß die Clathrin-vermittelte Endocytose und die Makropinocytose zur Beladung unterschiedlicher Endosomen-Populationen führen, die ihren Inhalt kaum austauschen.

Auch durch Brefeldin A wurde keine Vermischung dieser beiden endocytischen Populationen ausgelöst. Während die konventionellen Rezeptor-markierten Endosomen in Gegenwart von Brefeldin A eine hochtubuläre Struktur aufwiesen, wurden Makropinosomen morphologisch kaum verändert (Hewlett et al., 1994).

### **1. 2. 2. 1. 3. Potocytose (Aufnahme über Caveolae)**

Neben den bereits beschriebenen Mechanismen der Internalisierung, dürfte noch ein weiterer davon unterscheidbarer Aufnahme-Vorgang existieren, bei dem kleine Membran-Einstülpungen besonderer Art, die als *Caveolae* bezeichnet werden, auftreten. Die Membran-Einstülpungen sind auf der cytoplasmatischen Seite dicht von einem Protein-Mantel bedeckt, der aus sogenannten Caveolin-Einheiten besteht. Diese Funktionseinheit wurde vor allem für die Aufnahme von Folat über Rezeptoren, die mit Glykosylphosphatidyl-Inositol-Resten in der Membran verankert sind, beschrieben. Sie dürfte nur für die Aufnahme kleinerer Moleküle von Bedeutung sein. Da keine entsprechenden intrazellulären Vesikel gefunden wurden, ist auch noch nicht geklärt, ob es bei dieser Internalisierung überhaupt zu einer vollständigen Abschnürung der Membraneinstülpung kommt; und es wurde diskutiert, daß möglicherweise nur ein kurzes Schließen der Membran auftritt, gefolgt von einem Öffnungsvorgang und Wiederholung des Prozesses (Watts & Marsh, 1992; Anderson, 1993; Anderson, persönliche Mitteilung).

## **1. 2. 2. 2. Gliederung nach der Interaktion mit Bestandteilen der Cytoplasma-Membran**

### **1. 2. 2. 2. 1. Rezeptor-vermittelte Endocytose**

Die Rezeptor-vermittelte Endocytose läuft in den meisten Fällen über eine Clathrin-abhängige Internalisierung ab. Eine Ausnahme dürfte dabei die Rezeptor-vermittelte Internalisierung bestimmter Wachstumsfaktoren (EGF, IGF,...) sein, die scheinbar sowohl über Clathrin-abhängige als auch Clathrin-unabhängige Wege aufgenommen werden können (Moss & Ward, 1991 a,b; McClain & Olefsky, 1988; Kato et al., 1992).

Rezeptoren sind in der Regel Membranproteine mit einer cytoplasma-tischen Domäne, die ihnen eine Interaktion mit Elementen der Clathrin-Hülle (den Adaptor-Proteinen) ermöglicht, einer hydrophoben, helikalen Transmembransequenz und einer extracytoplasmatischen Domäne, an die die entsprechenden Liganden binden können. Die Affinität der Bindung kann sehr unterschiedlich sein; in diesem Hinblick ist die Grenze zur adsorptiven Endocytose, bei der eine geringere Spezifität vorliegt, verschwimmend. Viele Rezeptoren werden konstitutiv internalisiert, also auch ohne Liganden. Bei

einigen Rezeptoren allerdings löst erst die Bindung des Liganden die Endocytose aus. Dabei kommt es wahrscheinlich zu Konformationsänderungen des Rezeptors, die dann die Interaktion mit den Elementen des Endocytose-Apparates induzieren. Wie bereits bei der Beschreibung der Clathrin-abhängigen Endocytose angeführt wurde, kann es zu einer Konzentrierung der Rezeptoren in den Clathrin-Coated Pits ("Clustering") kommen; es kann aber auch eine gleichmäßige Verteilung über die Zelloberfläche beibehalten werden. In diesem Fall dürfte die Endocytose nur durch "zufällige" Lokalisation in Clathrin-umhüllten Bereichen ausgelöst werden, und somit mit geringerer Effizienz erfolgen. Einerseits wird angenommen, daß Clathrin-Coated Pits als eine Art Filter für Rezeptoren wirken, in denen sie nach einer lateralen Diffusion in der Membran sozusagen hängen bleiben, andererseits wurde auch diskutiert, daß die cytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren Initiationsstellen für die Anlagerung von Clathrin-"Kristallisationskeimen" darstellen könnten. Die genaue Interaktion zwischen den verschiedenen Rezeptoren, den Adaptor-Proteinen und den Clathrin-Einheiten ist also noch nicht völlig geklärt.

#### **1. 2. 2. 2. Adsorptive Endocytose**

Früher wurde nur zwischen Fluid-Phase- und adsorptiver Endocytose unterschieden, wobei der Ausdruck "adsorptive Endocytose" auch für Rezeptor-vermittelte Prozesse verwendet wurde. Man ist dazu übergegangen jene Endocytose-Prozesse, bei denen eine mehr oder weniger unspezifische Bindung an Bestandteile der Cytoplasma-Membran vorliegt, aber kein Rezeptor definiert werden kann, als adsorptive Endocytose zu bezeichnen. In den meisten Fällen kommt es dabei zu einer Konzentrierung der adsorbierten Verbindung im Vergleich zur Endocytose der Fluid-Phase.

#### **1. 2. 2. 3. Fluid-Phase Endocytose**

Als Fluid-Phase Endocytose wird die Aufnahme von Verbindungen bezeichnet, die Membran-impermeabel sind und nicht an die Cytoplasma-Membran binden. Aus diesen Eigenschaften ergeben sich experimentell folgende Charakteristika:

- a) Die Aufnahme ist proportional zur Konzentration des Markers im extrazellulären Medium, ohne eine Sättigung zu zeigen.
- b) Die Aufnahme von markiertem Marker wird nicht durch Zugabe von unmarkiertem Marker verringert.
- c) Die Aufnahmerate verschiedener Fluid-Phase Marker ist gleich.

Zur Untersuchung der Fluid-Phase Endocytose wurden verschiedenste Marker eingesetzt, bei denen jedoch nicht immer in dem entsprechenden System gezeigt wurde, daß sie die oben angeführte Definition erfüllen. Für elektronenmikroskopische Studien wurde z.B. kolloidales Gold eingesetzt, das jedoch vom "Particle Receptor" der Makrophagen erkannt werden kann. Andere häufig eingesetzte Marker sind Peroxidase (HRP), oder fluoreszierende Dextrane. Bei der Peroxidase kann (zumindest bei einigen Zelllinien) ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, daß sie unspezifisch an Membran-Proteine bindet und somit zum Teil die Charakteristik eines adsorptiven, Endocytose-Markers aufweist.

Aufgrund der Tatsache, daß bei der Fluid-Phase Endocytose keine Konzentrierung der internalisierten Marker erfolgt, und diese nicht mit Membran-Elementen interagieren, können sie dazu eingesetzt werden, über die Gesamtheit des endocytischen Apparates quantitative Informationen zu erhalten. Diesbezügliche Untersuchungen haben ergeben, daß eine beträchtliche Menge an Flüssigkeit, und damit auch Plasmamembran internalisiert wird, ein Großteil davon aber sehr rasch wieder rezykliert wird. Steinman et al. konnten bereits 1976 zeigen, daß Makrophagen innerhalb von 33 min das Äquivalent ihrer gesamten Zelloberfläche endocytieren, und daß von Fibroblasten der entsprechende Anteil innerhalb von 125 min aufgenommen wird. Die Summe der lysosomalen Kompartimente macht bei Makrophagen jedoch konstant nur etwa 18% der Zelloberfläche aus; somit betragen das Volumen und die Oberfläche der Vesikel, die innerhalb von einer Stunde internalisiert werden ca. das Zehnfache der entsprechenden lysosomalen Werte im Gleichgewichtszustand. Dieses Faktum impliziert das Vorliegen einer sehr hohen Rezyklisierungsrate.

In Hepatocyten aus Kaninchen wurde die Aufnahme und die Rezyklisierung des Fluid-Phase Markers <sup>125</sup>J-Polyvinylpyrrolidon gemessen und nach den Resultaten durch Computer-Analyse und Simulation ein theoretisches Modell erstellt, das den Ergebnissen am besten entspricht. Dabei wurde ermittelt, daß mindestens drei intrazelluläre Kompartimente involviert sind, und das von allen drei Kompartimenten ein Rezyklisierungsweg zur Zelloberfläche



existieren dürfte. Die Daten ergaben, daß etwa 80% des Markers bereits aus dem ersten Kompartiment (frühen Endosomen) rezyklisieren, von den 20% die zum nächsten Kompartiment weitertransportiert werden (späte Endosomen, bzw. Prälysosomen) gelangen nach dem Modell 40% an die Zelloberfläche (= 8% absolut), der Rest wird in das dritte Kompartiment transportiert, von dem er jedoch ebenfalls mit einer Rate von 0,3%/min rezyklisiert werden kann. Die Aufnahmerate war nach diesen Befunden 0,27 µl/h für 10<sup>6</sup> Zellen, das sind 0,27 pl/h pro Zelle (Blomhoff et al., 1989).

Eine Arbeit, in der kinetische und morphologische Daten von Ratten-Hepatocyten kombiniert wurden, führte zu der Interpretation, daß über eine Aufnahme von etwa 170 Vesikeln/sec. 0,136 pl pro Stunde und Zelle internalisiert werden (mit einer Membranoberfläche von 10 880 µm<sup>2</sup>/h), wobei 66% des Fluid-Anteils und 95% der Membran rasch wieder rezyklisiert werden. Es wurde angenommen, daß der weiter-transportierte Flüssigkeitsanteil noch einmal 7-fach konzentriert wird, und daß es bei späteren endocytischen Stadien zu einem Vesikulieren der Membran in das Innere des Endosoms kommt, wodurch "Multivesicular Bodies" gebildet werden (Courtoy, 1991).

Bei den Berechnungen von Courtoy (1991) ergibt sich für Hepatocyten eine Internalisierungsrate von 2,7% des Zellvolumens pro Stunde; andere Arbeiten geben jedoch noch viel höhere Raten an (50% des Zellvolumens/h bei Oka et al., 1989 mit Lucifer Yellow als Marker; 500% des Zellvolumens/h bei Scharschmidt et al., 1986). Diese Differenzen können kaum mehr durch eine natürliche Variabilität erklärt werden; aufgrund der Tatsache, daß eine gründliche Entfernung von Markerresten auf der Zelloberfläche mitunter schwierig ist, jedoch eine Voraussetzung für eine exakte Quantifizierung darstellt, dürften diese hohen Werte eher unwahrscheinlich sein.

## **1. 2. 3. ENDOCYTISCHE KOMPARTIMENTE**

### **1. 2. 3. 1. Präendosomale Vesikel**

Clathrin-umhüllte Vesikel, die eine Population der präendosomal Vesikel ausmachen, wurden bereits zum Teil beschrieben (siehe 1. 2. 2. 1. 1.).

Ihre Größe ist meistens nicht sehr variabel; der Durchmesser ist etwa 110 nm. Aufgrund ihrer Clathrin-Hülle haben sie eine hohe Dichte und können über

diese Eigenschaft relativ gut von anderen Kompartimenten abgetrennt werden (Woodman & Warren, 1991).

Es wurde beschrieben, daß sie funktionelle H<sup>+</sup>-ATPase Moleküle enthalten, wobei aber nicht zwischen Clathrin-umhüllten Vesikeln der Endocytose und jenen des Golgi-Apparates differenziert wurde (Arai et al., 1988; Zhang et al., 1992). Für die endocytische Population dieser Vesikel wurde jedoch postuliert, daß sie ihr Lumen nicht ansäuern (Fuchs et al., 1987). Aufgrund ihrer geringen Größe würde die Anwesenheit von 0,3 freien H<sup>+</sup>-Ionen, also weniger als einem einzigen, ausreichen, um einen rechnerischen pH-Wert von 6,0 zu erzielen; deshalb muß angenommen werden, daß in diesem submikroskopischen Bereich nicht mit dem idealisierten pH-Wert-Konzept von Sørensen gerechnet werden kann (siehe Punkt 1.4.; Schmid, 1994).

Wie bereits beschrieben waren jene nicht-Clathrin-umhüllten präendo-somalen Vesikel, die nicht auf eine Ablösung des Mantels Clathrin-umhüllter Vesikel zurückzuführen waren, ein wenig kleiner und wiesen einen Durchmesser von etwa 95 nm auf (Hansen et al., 1991). Über die Eigenschaften dieser Vesikel ist im Detail nichts bekannt.

## **1. 2. 3. 2. Frühe Endosomen (Sortierende Endosomen)**

### **1. 2. 3. 2. 1. Morphologie**

Als frühe Endosomen werden jene endocytischen Kompartimente bezeichnet, die nach den kleineren präendosomal Trägervesikeln als die ersten größeren Strukturen im Verlauf der Endocytose auftreten. Sie liegen normalerweise in der Peripherie der Zelle; bei Hepatocyten wurde ein Bereich von 1,5 µm innerhalb der Cytoplasma-Membran als Lokalisation dieser frühen Endosomen angegeben (Wall & Hubbard, 1985).

Sie weisen eine komplexe tubulo-retikuläre und vakuoläre Struktur auf, die sich in einem sehr dynamischen Gleichgewichtszustand befinden dürfte. Elektronenmikroskopische Studien zeigen frühe Endosomen in den meisten Fällen als Kompartimente, bei denen ein vakuoläres Grund-element existiert (Durchmesser: 400 - 500 nm), von dem mehrere tubuläre Fortsätze ausgehen. Es wurde angenommen, daß die tubulären Fortsätze die Ausgangspunkte der rezyklisierenden Endosomen darstellen, während der vakuoläre Teil jene

Moleküle trägt, die für den Abbau bestimmt sind (Geuze et al., 1987; Hubbard, 1989;).

Für Hepatocyten wurde angegeben, daß der vakuoläre Körper (Durchmesser: 500 nm) 33% des Volumens ( $0,0655 \mu\text{m}^3$ ) und 5% der Membran-Oberfläche ( $0,785 \mu\text{m}^2$ ) früher Endosomen ausmacht, während die tubulären Fortsätze, die der Rezyklisierung zur Zelloberfläche zugeführt werden, 66% des Volumens ( $0,131 \mu\text{m}^3$ ) und 95% der Membran ( $14,94 \mu\text{m}^2$ ) darstellen (Courtoy, 1991).

Morphologische Untersuchungen lebender Hep2-Zellen mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie haben gezeigt, daß die Endosomen dieser Zellen ein ausgedehntes tubuläres Retikulum bilden, das jedoch gegen die gängigen Fixierungsmethoden, sowie gegen niedrige Temperaturen und UV-Strahlung empfindlich ist (Hopkins et al., 1990).

Die elektronenmikroskopische Analyse der Tubuli ergab eine Länge im  $\mu\text{m}$ -Bereich und einen Durchmesser von 30 - 50 nm, wobei auch Verdickungen der Tubuli mit einem Durchmesser von 100 - 600 nm beobachtet wurden. Fluoreszenzmarkiertes Transferrin bewegte sich in den Tubuli mit einer Geschwindigkeit von 0,5 - 1  $\mu\text{m}/\text{sec}$ . Die Verdickungen bewegten sich mit einer Geschwindigkeit von 0,05  $\mu\text{m}/\text{sec}$ . weiter und transportierten fluoreszenzmarkiertes EGF, das anfangs in der Perimeter-Membran lokalisiert war und dann immer mehr in internen Vesikeln (Durchmesser: 30 - 50 nm) detektiert wurde. Die Kombination der Video-Mikroskopie lebender Zellen mit der elektronenmikroskopischen Struktur-Aufklärung führte zu der Interpretation, daß die Verdickungen "Multivesicular Bodies" darstellen, in denen EGF-Rezeptoren akkumulieren. Diese Befunde führten zu einem eigenen Modell der Endocytose, nach dem internalisierte Verbindungen in ein dynamisches endosomales Retikulum gelangen, wo manche Rezeptoren in den Verdickungen gleichsam ausgesiebt und dem lysosomalen Abbau zugeführt werden (siehe auch 1. 2. 5. 3.; Hopkins et al., 1990; Warren, 1990).

Spätere Untersuchungen mit HRP als endocytischem Marker und unüblichen EM-Präparationsmethoden zeigten ähnliche tubulo-retikuläre Strukturen in zahlreichen anderen Zelllinien (AtT20, PC12, HeLa, Hep2, Vero, MDCK, NRK-Zellen, weniger hingegen in BHK-Zellen und 3T3-Fibroblasten), die in früheren Studien nicht in dem Ausmaß detektiert wurden. Diese tubulären frühen Endosomen bildeten lokal netzartige Strukturen, die manchmal mit vesikulären endosomalen Strukturen verbunden waren, die jedoch nicht ein einzelnes Retikulum bildeten. Weder die Beladung, noch die Entladung dieser tubulären Endosomen war von Mikrotubuli abhängig, ebensowenig wie die fadenartige Struktur. Die Tubuli waren in der Nähe der Cytoplasma-

Membran, aber auch im Bereich des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums aufzufinden, zeigten also nicht in allen Fällen die für frühe Endosomen typische periphere Lokalisation. Sie waren jedoch eindeutig weder tubuläre Lysosomen, wie sie in Makrophagen vorkommen, noch Teile des Golgi-Apparates, noch waren sie in direktem Kontakt mit späten Endosomen. Es wurde postuliert, daß diese frühen endocytischen Strukturen eine Rolle bei der Rezyklisierung spielen könnten (Tooze & Hollinshead, 1991).

In Gegenwart von Brefeldin A, einem Pilzmetabolit, der Fissionsprozesse verschiedener intrazellulärer Transportvorgänge blockiert, bildete sich aus den beobachteten tubulären Endosomen ein einzelnes, zusammen-hängendes Retikulum (Tooze & Hollinshead, 1992).

### **1. 2. 3. 2. 2. Funktionen früher Endosomen**

Eine der wesentlichsten Aufgaben früher Endosomen liegt, wie auch durch die morphologischen Befunde impliziert wird, in der Rezyklisierung von Membranen und Rezeptoren, und somit in der Sortierung verschiedener internalisierter Verbindungen. In unpolarisierten Zellen, muß dabei vor allem die Aufgabe bewältigt werden, jene Verbindungen die in Lysosomen abgebaut werden sollen, von den Molekülen zu trennen, die wieder zurück an die Zelloberfläche zu transportieren sind.

Dadurch kann die Zelle verschiedenste Rezeptoren, wie z.B. die Rezeptoren für Asialoglykoproteine, für LDL, für Transferrin und für  $\alpha_2$ -Makro-globulin, wiederverwenden, und gleichzeitig wird der Großteil der residenten Zelloberflächenproteine, die internalisiert wurden, wieder zurückgeführt (Hubbard, 1989; Gruenberg & Howell, 1989; Trowbridge et al., 1993).

Bei polarisierten Zellen muß noch zusätzlich die Sortierung transcytotischer Verbindungen durchgeführt werden.

Die Trennung zwischen Rezeptoren und Liganden, die eine Voraussetzung für die Sortierung ist, erfolgt meist über das saure Milieu innerhalb der Endosomen, das durch die Aktivität von  $H^+$ -ATPasen des vakuolären Typs verursacht wird. Es wurde festgestellt, daß der Grad der Azidifizierung des endosomalen Lumens in frühen Stadien der Endocytose niedriger ist, als in späteren. Für frühe Endosomen wurde ein pH-Wert von 6,0 - 6,5 angegeben, für späte Endosomen hingegen ein Wert von 5,0 - 6,0.

Diesen Unterschieden wird eine Rolle in der Sortierung verschiedener Verbindungen zugeschrieben, da manche Rezeptor-Liganden-Komplexe, wie

etwa der Komplex von Mannose-6-Phosphatrezeptor und lysosomalen Enzymen, *in vitro* erst bei einem niedrigeren pH-Wert dissoziieren als jene Komplexe, die sich bereits in einem frühen endocytischen Kompartiment lösen (Mellman et al., 1986; Hubbard, 1989). Wenn man die morphologische Charakterisierung früher Endosomen nach Courtoy (1991) als Basis nimmt, erhält man bei einem pH-Wert von 6,0 jedoch eine Anzahl von nur 39 freien H<sup>+</sup>-Ionen für den zentralen vakuolären Teil des Endosoms; für die tubulären Elemente erscheint die Angabe eines pH-Wertes überhaupt nicht mehr durchführbar, bzw. nicht sinnvoll, da man bei einem pH-Wert von 6,0 rechnerisch auf nur ein freies H<sup>+</sup>-Ion auf einer Länge von mehr als 2 µm kommt, das ist in etwa die Länge, die für die tubulären Elemente postuliert wird (siehe Punkt 1.4., Schmid, 1994).

Diese Überlegung ist in Einklang mit Befunden, nach denen für rezyklisierende Endosomen (die wahrscheinlich aus den tubulären Elementen hervorgehen) ein annähernd neutrales Milieu angegeben wird (Cain et al., 1989). In diesem Zusammenhang muß auch erwähnt werden, daß die Permeabilität der endosomalen Membran für H<sup>+</sup>-Ionen sehr hoch sein dürfte (Fuchs et al., 1989 b).

### **1. 2. 3. 2. 3. Eigenschaften früher Endosomen**

Abgesehen von ihrem milden sauren Milieu unterscheiden sich frühe endosomale Kompartimente auch in ihrer Dichte von den entsprechenden Werten des Extrazellulär-Raumes, sowie von anderen Endocytose-Kompartimenten. Unter isotonen Bedingungen (in Percoll-Gradienten) beträgt die Dichte früher Endosomen etwa 1,045 g/ml, und ist somit niedriger als in späten Endosomen und Lysosomen. (Diaz et al., 1991; Wessling-Resnick, 1990 a). Hinsichtlich der Protein-Zusammensetzung gibt es in CHO-Zellen (Schmid et al., 1988) und in BHK-Zellen (Aniento et al., 1993; Emans et al., 1993) Unterschiede zwischen den lumenal markierbaren Proteinen früher Endosomen und den extrazellulär zugänglichen Membranproteinen der Zelloberfläche, sowie den Proteinen später Endosomen. In Hepatocyten bestehen hingegen kaum strukturelle Unterschiede zwischen frühen und späten Endosomen (Casciola-Rosen et al., 1992). Der Grad der Differenzierung zwischen frühen und späten Endosomen dürfte somit von der Zelllinie abhängig sein.

Die Dynamik früher Endosomen wurde durch Biotinylierung von Zelloberflächen-Proteinen und Endocytose von Avidin gezeigt, was zu einer Quervernetzung dieser Proteine und in der Folge zu einer deutlichen Zunahme des Volumens der frühen Endosomen führte (Parton et al., 1992).

Endosomen, wie auch Lysosomen, sind möglicherweise (zumindest in Fibroblasten) über Mikrofilamente mit der Cytoplasma-Membran verbunden (Hagmann et al., 1992).

### **1. 2. 3. 3. Rezyklisierende Endosomen**

Über die genauen Eigenschaften jener Endosomen, die zur Zelloberfläche rezyklisieren, ist sehr wenig bekannt. Es ist auch möglich, daß sich diese Endosomen aus unterschiedlichen Populationen zusammensetzen, da die Rezyklisierung wahrscheinlich nicht nur von frühen Endosomen ausgeht, sondern auch von späteren Stadien der Endocytose (Blomhoff et al., 1989; Harding et al., 1991; Kok et al., 1992; Killisch et al., 1992; Jahraus et al., 1994). Es ist anzunehmen, daß sie einige der Merkmale jener Kompartimente aufweisen, aus denen sie hervorgehen; andererseits sind natürlich aufgrund der Sortierungsprozesse auch Unterschiede zu erwarten. Es gibt auch Hinweise dafür, daß ein Rezyklisierungsprozeß von Endosomen zur Zelloberfläche existiert, der über das *trans*-Golgi-Retikulum läuft (Hubbard, 1989); dieser Prozeß könnte parallel mit der Rezyklisierung von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren von späten Endosomen zum TGN ablaufen, jenem Ort, wo sie wieder neue lysosomale Enzyme binden (Goda & Pfeffer, 1991; Lombardi et al., 1993); oder aber von frühen Endosomen ausgehen, wie jene Befunde zeigen, bei denen es unter Einfluß von Brefeldin A zu einer Vermischung früher Endosomen mit dem TGN kommt (Lippincott-Schwartz et al., 1991; Wood et al., 1991; Klausner et al., 1992).

### **1. 2. 3. 4. Träger-Vesikel zwischen frühen und späten Endosomen**

Bei Inkubation von BHK-Zellen mit Endocytose-Markern in Gegenwart des Mikrotubuli-depolymerisierenden Agens Nocodazol kommt es zur Markierung größerer Vesikel mit einem Durchmesser von 0,4 - 0,7 µm, die nach den frühen Endosomen beladen werden (Gruenberg et al., 1989).

Eine Voraussetzung für die Bildung dieser Träger-Vesikel, bzw. für ihre Abschnürung von den frühen Endosomen ist die Aktivität der H<sup>+</sup>-ATPase. Ihre

Blockierung durch Bafilomycin A<sub>1</sub> verursacht eine Tubularisierung der frühen Endosomen und verhindert den Transport zu den späten Endosomen (Clague et al., 1994).

Es konnte festgestellt werden, daß diese Vesikel über ein bestimmtes cytosolisches Protein ("Cytoplasmic Linker Protein, CLIP-170") an Mikrotubuli binden (Scheel & Kreis, 1991; Pierre et al., 1992) und ihre Fusion mit späten Endosomen durch intakte Mikrotubuli stimuliert wird. Dieser Prozeß ist von dem Mikrotubuli-assoziierten Motorprotein Dynein abhängig, das Bewegungsvorgänge in Richtung des Minus-Endes unterstützt, also zum perinukleären Bereich hin (Aniento et al., 1993). Ähnliche Carrier-Vesikel wurden auch für polarisierte Zellen beschrieben (MDCK-Zellen); eine Fusion zwischen apikalen und basolateralen Carrier-Vesikeln wird ebenso durch Mikrotubuli stimuliert und ist von den beiden entgegengesetzt gerichteten Motorproteinen Dynein und Kinesin abhängig (Bomsel et al., 1990).

Die Protein-Zusammensetzung der Träger-Vesikel unterscheidet sich in BHK-Zellen vom Protein-Muster früher oder später Endosomen (Aniento et al., 1993; Emans et al., 1993).

Nach den Ergebnissen von Diaz et al. (1991), bei denen Nocodazol die Dichte-Verschiebung endosomaler Marker *in vivo* nicht verhindern kann, wäre anzunehmen, daß Carrier-Vesikel eine höhere Dichte als frühe Endosomen aufweisen.

### **1. 2. 3. 5. Späte Endosomen**

Endocytische Kompartimente, die von internalisiertem Marker nach den frühen Endosomen, aber noch vor den Lysosomen erreicht werden und deren Beladung Mikrotubuli-abhängig ist, werden als späte Endosomen bezeichnet. Im Gegensatz zu frühen Endosomen weisen sie meist interne Membranstrukturen auf. Diese Endosomen, wie auch die Träger-Vesikel zwischen frühen und späten Endosomen repräsentieren wahrscheinlich jene Kompartimente, die aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften als "Multivesicular Bodies" bezeichnet werden. Die inneren Membran-Einschlüsse entstehen offensichtlich durch eine *cis*-Verschmelzung der eigenen Membranhülle unter Abschnürung von Vesikeln ins Innere. Sie enthalten z.B. EGF-Rezeptoren, die in Lysosomen abgebaut werden sollen, wobei die Tyrosin-Kinase-Aktivität der EGF-Rezeptoren für deren Lokalisation in den

internen Vesikeln, oder die Bildung der internen Vesikel selbst, verantwortlich ist (Felder et al., 1990).

Die Azidität später Endosomen dürfte in der Regel niedriger sein als jene von frühen Endosomen; ihr pH-Wert wurde mit 5,0 - 6,0 angegeben (Hubbard, 1989; Gruenberg & Howell, 1989).

Frühe und späte Endosomen unterscheiden sich zumindest in einigen Zelllinien auch durch ihr Verhalten bei trägerfreier Elektrophorese (CHO-Zellen: Schmid et al., 1988; für die Leber: Schmid et al., 1992), sowie durch ihre Dichte; die in isotonen Gradienten 1,06 - 1,10 beträgt. Ursprünglich wurde angenommen, daß späte Endosomen eine geringe Fusionsaktivität aufweisen; jüngere Untersuchungen haben hingegen gezeigt, daß späte Endosomen von BHK-Zellen untereinander fusionieren können, wobei die Fusionseffizienz etwa zwei Drittel der Effizienz der Fusion früher Endosomen beträgt (Aniento et al., 1993). In den späten Endosomen dürfte auch die Rezyklisierung von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren zum TGN beginnen (Griffiths et al., 1988; Gruenberg & Howell, 1989).

### **1. 2. 3. 6. Lysosomen**

Von Beginn ihrer Entdeckung an wurden Lysosomen als saure, intrazelluläre Kompartimente definiert, die eine Vielzahl an Hydrolasen mit einem pH-Optimum im sauren Bereich enthalten, und in denen der Abbau hochmolekularer Verbindungen stattfindet (De Duve, 1963). In der Folge wurde festgestellt, daß auch Endosomen ein saures inneres Milieu aufweisen, und daß sie ebenfalls zumindest einige aktive Hydrolasen enthalten (Diment & Stahl, 1985; Roederer et al. 1987; Gruenberg & Howell, 1989). Da in den meisten Fällen kein weiterer Transport von Makromolekülen aus Lysosomen zu anderen Kompartimenten detektiert werden konnte, wurde in der Folge vorgeschlagen, Lysosomen als terminale Abbau-Kompartimente zu definieren, um sie von den Hydrolase-enhaltenden Endosomen zu unterscheiden (Kornfeld & Mellman, 1989). Diese Definition ist jedoch ebenfalls zumindest in einigen Fällen fragwürdig, da Rezyklisierungsprozesse von den Lysosomen zur Zelloberfläche bei Antigen-präsentierenden Zellen beobachtet wurden (Harding et al., 1991), und auch retrograde Transportvorgänge von den Lysosomen zu späten Endosomen in NRK-Zellen (Jahraus et al., 1994). Eine vertretbare biochemische Unterscheidung der Lysosomen von anderen Kompartimenten besteht darin, daß Lysosomen reich an lysosomalen



Glykoproteinen sind, aber praktisch keine Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren enthalten, während z.B. späte Endosomen beides enthalten (Griffiths et al., 1988; Kornfeld & Mellman, 1989).

In der früheren Nomenklatur wurde zwischen primären und sekundären Lysosomen unterschieden, wobei primäre Lysosomen als jene aus Golgi-Elementen stammenden Elemente bezeichnet wurden, die zwar lysosomale Enzyme, aber noch keine Abbau-Produkte enthielten, und durch eine Fusion mit endocytischen Kompartimenten sekundäre Lysosomen bilden. Die primären Lysosomen dieser Definition sind gleichzusetzen mit den Vesikeln, die abzweigend vom *trans*-Golgi-Retikulum lysosomale Enzyme zum Endocytose-Weg transportieren.

Der Transport endocytierter Verbindungen zu den Lysosomen ist Temperatursensitiv; unterhalb einer Temperatur von 20°C kommt es zu einer starken Hemmung der Aufnahme in Lysosomen (Kornfeld & Mellman, 1989). Dieser Temperatur-Block ist aber nicht quantitativ; auch bei 16°C konnte eine Übertragung endocytierter Verbindungen zu den Lysosomen nachgewiesen werden (Haylett & Thilo, 1991).

Eine wesentliche physikalische Unterscheidung der Lysosomen von anderen Kompartimenten ist ihre hohe Dichte, die unter isotonen Bedingungen bei 1,10 g/ml und darüber liegt (Kornfeld & Mellman, 1989). Es ist jedoch noch völlig ungeklärt, wie Lysosomen diese hohe Dichte aufbauen. Eine *in vitro* Inkubation lysosomaler Enzyme bei einem pH-Wert von 4,8 führt zu einer Aggregation der Enzyme und könnte damit zu der erhöhten Dichte führen (Buckmaster et al., 1988). Dies ist in Einklang mit dem für Lysosomen angegebenen pH-Wert von 4,5 - 5,0 (Hubbard, 1989). Andererseits wurde beschrieben, daß eine Inkubation von Lysosomen bei pH 6,0 und 37°C die Dichte der Lysosomen erhöht, was jedoch durch ATP verhindert werden kann. Da der ATP-Effekt durch Ionophore reduziert wird, wurde angenommen, daß für die Aufrechterhaltung der niedrigen lysosomalen Dichte ein pH-Gradient notwendig ist (Mayorga et al., 1993 b).

#### **1. 2. 4. DAS SAURE MILIEU IN ENDOCYTISCHEN KOMPARTIMENTEN**

Ausgehend von den extrazellulären Bedingungen findet man in den frühen Endosomen die ersten deutlichen Veränderungen der aufgenommenen Flüssigkeit. Eine davon ist die milde Azidifizierung des Endosomen-Inneren,

die durch die Aktivität einer H<sup>+</sup>-ATPase des vakuolären Typs induziert wird. Verschiedene Versuche, das Ausmaß der Azidifizierung zu quantifizieren, führten dazu, für frühe Endosomen einen pH-Wert von 6,0 - 6,5 anzugeben, für späte Endosomen einen Wert von 5,0 - 6,0, und für Lysosomen einen Wert von 4,5 - 5,0 (Mellman et al., 1986; Schmid et al., 1989; Hubbard, 1989). Bei Messungen der Azidität einzelner früher Endosomen wurde jedoch auch eine sehr hohe Heterogenität des apparenten pH-Wertes beobachtet, mit einer Bandbreite von einer pH-Einheit bei der Hälfte des Maximums der Gaußkurve (Shi et al., 1991). Die Tatsache, daß entlang des Endocytose-Weges unterschiedlich Grade an Azidität vorliegen, impliziert, daß Mechanismen für deren Regulation existieren. Es wurden verschiedene Möglichkeiten für diese Regulation aufgezeigt. So kann z.B. das saure Milieu in frühen Endosomen mancher Zelllinien durch Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen, die den elektrogenen H<sup>+</sup>-ATPasen entgegenwirken reduziert werden (Fuchs et al., 1989 a; Cain et al., 1989).

Durch einen Einstrom von Cl<sup>-</sup> über Cl<sup>-</sup>-Kanäle kann hingegen das Membranpotential reduziert und somit die Azidifizierung stimuliert werden. Diese Cl<sup>-</sup>-Kanäle können wiederum durch sekundäre Botenstoffe ("Second Messengers") moduliert werden (Barasch et al., 1991; Zen et al., 1992).

Falls die für frühe Endosomen beschriebenen tubulären Strukturen tatsächlich eine wesentliche strukturelle Komponente darstellen, ist es jedoch fraglich, wie die höhere Aktivität der H<sup>+</sup> Ionen in derartig kleinen Kompartimenten vorstellbar ist, bzw. wie sie sich unter diesen außergewöhnlichen Bedingungen verhalten (siehe Anhang B; bzw. Schmid, 1994).

## **1. 2. 5. ENDOCYTOSE-MODELLE**

### **1. 2. 5. 1. Das Vesikel-Transfer-Modell ("Vesicle Shuttle Model")**

Nach dem Vesikel-Transfer-Modell sind frühe Endosomen, späte Endosomen und Lysosomen präexistierende Kompartimente, zwischen denen ein Transport durch Träger-Vesikel aufrechterhalten wird (Hubbard, 1989). Es impliziert dadurch zahlreiche selektive Fusions- und Fissionsvorgänge entlang des Endocytose-Weges. Unterstützt wird dieses Modell durch jene Befunde, die in CHO- und BHK-Zellen deutliche Unterschiede in der Protein-Zusammensetzung zwischen frühen und späten Endosomen nachweisen

konnten (Schmid et al., 1988; Aniento et al., 1993; Emans et al., 1993). Ebenso ist die Identifizierung und Charakterisierung von Träger-Vesikeln zwischen frühen und späten Endosomen ein Hinweis dafür, daß dieses Modell in den untersuchten Zellen (BHK-Zellen) zumindest zum Teil manifestiert ist (Gruenberg et al., 1989; Aniento et al., 1993). Ein entsprechender Vesikel-Transfer zwischen späten Endosomen und Lysosomen wurde aber noch nicht nachgewiesen.

Ein Indiz für die Bedeutung des Vesikel-Transfer-Modells liegt auch in den Befunden, die eine sehr spezifische Lokalisation von kleinen GTP-bindenden Proteinen an bestimmten Kompartimenten der Endocytose und deren Bedeutung bei intrazellulären Transport-Prozessen zeigen (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992; Van der Sluijs, 1992 a,b; Zerial & Stenmark, 1993; Lombardi et al., 1993; Steele-Mortimer et al., 1994; Stenmark et al., 1994).

### **1. 2. 5. 2. Das Maturationsmodell**

Beim Maturationsmodell wird angenommen, daß sich frühe Endosomen durch die Fusion präendosomaler Vesikel bilden. Durch Abzweigung (Fission) bestimmter Komponenten (Rezyklisierung), sowie durch Fusion mit Hydrolase-hältigen Kompartimenten ändern diese Endosomen ihre Eigenschaften und reifen dadurch zu späten Endosomen und in der Folge zu Lysosomen heran, wobei der Prozeß mit einem Transport von der Zellperipherie in den perinukleären Raum verbunden ist.

Die endocytisierten Verbindungen bleiben nach diesem Modell im wesentlichen in demselben Kompartiment, während dieses seine Eigenschaften ändert (Hubbard, 1989; Murphy, 1991).

Dieses Modell wird von den Befunden unterstützt, die eine große strukturelle Ähnlichkeit zwischen frühen und späten Endosomen aufzeigen (bei Hepatocyten: Casciola-Rosen et al., 1992), sowie von den Befunden, die darauf hinweisen, daß sich die Dichte von Endosomen möglicherweise in Abwesenheit von Lysosomen bis zur lysosomalen Dichte erhöhen kann (Roederer et al., 1990).

In der Hepatom-Zelllinie HepG2 konnte gezeigt werden, daß der gesamte Endocytose-Weg von Asialo-Orosomucoid, mit Ausnahme der Lysosomen, für eine zweite Markierung durch den Rezyklisierungsmarker Transferrin mit der gleichen Kinetik zugänglich ist (Stoorvogel et al., 1991). Dieses Ergebnis spricht

dafür, daß in den untersuchten Zellen frühe Endosomen zu späten Endosomen heranreifen.

Mikroskopische Studien bei denen Endosomen einer CHO-Zelllinie mit zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierten LDL-Derivaten durch aufeinanderfolgende Inkubation beladen wurden, wiesen ebenfalls eindeutig auf eine Maturation hin. Mit zunehmender Dauer der markerfreien Inkubation zwischen den beiden Beladungsphasen nahm die Zahl der für den zweiten Marker zugänglichen Endosomen, die mit dem ersten Marker beladenen waren, ab, während jedoch die Konzentration des ersten Markers in diesen Endosomen konstant blieb. Die Zahl der Endosomen, die nur den ersten Marker enthielten, blieb gleich, während die Zahl der Endosomen, die nur mit dem zweiten Marker beladen waren zunahm, was auf eine Bildung neuer Endosomen zurückgeführt wurde. Diese Erscheinungen lassen sich nur mit einem Maturationsmodell zwischen frühen und späten Endosomen erklären (Dunn & Maxfield, 1992). Wenn jedoch aus jedem späten Endosom nach dem Maturationsmodell ein Lysosom werden würde, taucht die Frage auf, wie eine konstante Zahl an Lysosomen aufrechterhalten wird.

### **1. 2. 5. 3. Modell eines endosomalen Retikulums**

Nach den Beobachtungen von Hopkins et al. (1990) an lebenden Hep-2-Zellen wurde postuliert, daß in intakten Zellen endosomale Kompartimente sehr häufig tubulär sind und weit mehr miteinander vernetzt, als ursprünglich angenommen wurde. Die Wanderung von Membran-Verdickungen mit vesikulären Einschlüssen entlang dieser Tubuli wurde als Indiz für eine Vernetzung früher und später endocytischer Kompartimente aufgefaßt. Es wurde diskutiert, daß die Verdickungen wie ein "Schleppnetz" durch das endosomale System gezogen werden könnten, und dabei bestimmte Rezeptoren (wie der EGF-Rezeptor) durch Abzweigung in interne Vesikel in diesen Verdickungen festgehalten werden (Warren, 1990). Befunde von Tooze & Hollinshead (1991, 1992) zeigten ein ähnliches endosomales Retikulum in zahlreichen anderen Zelllinien, wobei jedoch festgestellt wurde, daß es sich dabei nur um frühe endocytische Strukturen handelte. Die Ausprägung eines endosomalen Retikulums scheint somit von der Zelllinie abhängig zu sein, und keine allgemein gültige Erklärung für den Transport zwischen frühen und späten Stadien der Endocytose zu liefern.

#### **1. 2. 5. 4. Konvergenz der Modelle**

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die verschiedenen Modelle bei geeigneten Parametern ineinander übergehen können. So würde etwa ein Vesikel-Transfer-Modell funktionell in ein Maturationsmodell übergehen, wenn die Größe der Transfer-Vesikel die Größe des zurückbleibenden Kompartiments überschreitet (Murphy, 1993). Der für Träger-Vesikel zwischen frühen und späten Endosomen angegebene Durchmesser von 0,4 - 0,7 µm (Gruenberg et al., 1989) ist durchaus in Einklang mit dieser Überlegung. Er ist auch praktisch ident mit dem für das vakuoläre Grundelement früher Endosomen angegebenen Durchmesser von 0,5 µm (Courtoy, 1991). Somit wäre es vorstellbar, daß Träger-Vesikel eine gereifte Form früher Endosomen ohne ihre tubulären Fortsätze darstellen ("Branching-Maturation Model", Courtoy, 1991).

Nach ähnlichen Überlegungen würde eine ausgeprägte Dynamik untereinander interagierender Endosomen, wie sie z.B. zwischen frühen Endosomen beobachtet wird, funktionell ein einzelnes Kompartiment in Form eines Retikulums reflektieren.

Es ist auch denkbar, daß für verschiedene Stadien der Endocytose unterschiedliche Modelle realisiert sind bzw. überwiegen. So wurde z.B. beschrieben, daß Makropinosomen zuerst gemäß einem Maturationsmodell ihre Eigenschaften ändern, um dann ähnlich dem Vesikel-Transfer-Modell mit präexistierenden Lysosomen zu fusionieren (Racoosin & Swanson, 1993).

### **1. 3. TRANSCYTOSE**

In polarisierten Zellen, die eine apikale und eine basolaterale Seite aufweisen, existiert ein zusätzlicher intrazellulärer Transportweg für Makromoleküle, nämlich der vesikuläre Transport von einem Zellpol zum gegenüberliegenden. Dieser Transportmechanismus ist vor allem bei Epithelzellen für die Aufnahme und Sekretion von pIgA und IgM von Bedeutung, sowie bei Endothel-Zellen, z.B. für den Transport von LDL (Vasile et al., 1983) und ebenso für den Transport von Makromolekülen über die Blut-Hirn-Schranke (Broadwell, 1989). Eine Transcytose kann von der basolateralen zur apikalen Seite erfolgen

(z.B. bei der Sekretion von IgA), oder auch von der apikalen zur basolateralen Seite (z.B. bei der Aufnahme mütterlicher IgG-Moleküle im Intestinaltrakt von Säuglingen).

Die Internalisierung von Verbindungen, die transcytiert werden, läuft nach denselben Mechanismen, wie die Endocytose ab; und es konnte auch gezeigt werden, daß Transcytose-Rezeptoren gemeinsam mit Rezeptoren des normalen Endocytose-Weges aufgenommen werden. Folglich müssen intrazelluläre Sortierungsprozesse existieren, die die transcytierenden Verbindungen von jenen Substanzen trennen, die für den lysosomalen Abbau, oder die Rezyklisierung zur Zelloberfläche (der Aufnahme-Seite) bestimmt sind. Diese Sortierung läuft (zumindest bei polymerem IgA als Transcytose-Marker) bereits in frühen Endosomen ab (Klapper et al., 1990; Sztul, 1991).

Die Eigenschaften der dabei entstehenden Transcytose-Vesikel sind noch nicht näher definiert; es wird jedoch angenommen, daß sie keine deutliche Fähigkeit zur Azidifizierung ihres Lumens aufweisen (Fuchs, persönliche Mitteilung), und daß ihre Dichte nicht wesentlich höher ist, als die der frühen Endosomen.

Nach dem Transport der Vesikel zum gegenüberliegenden Zellpol kommt es entweder zu einer direkten Fusion mit der Cytoplasma-Membran, oder aber auch zu einer Fusion mit rezyklisierenden Endosomen dieses Zellpols (Barroso & Sztul, 1994). Dieser Fusionsprozeß wurde für Hepatocyten bereits *in vitro* rekonstituiert und wird unter Punkt 1. 4. 4. 8. beschrieben (Sztul, 1992; Sztul et al., 1993)

### **1. 3. 1. TRANSCYTOSE IN MDCK-ZELLEN**

MDCK-Zellen, die den Kaninchen-pIgA-Rezeptors exprimieren, werden als Modellsystem für die Transcytose und generell für die Charakterisierung intrazellulärer Transportwege polarisierter Zellen eingesetzt. Die verschiedenen Formen des Rezeptors weichen im Molekulargewicht ein wenig von jenen Ratten-Hepatocyten ab.

Neu-synthetisierte Rezeptoren werden im Bereich des TGN in Richtung der basolateralen Membran sortiert; für diesen Schritt ist eine Sequenz von 14 Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne, in der Nähe der Transmembransequenz notwendig (Casanova et al., 1991).

Für die Internalisierung von der Zelloberfläche sind zwei Tyrosin-Reste der cytoplasmatischen Domäne von Bedeutung (Okamoto et al., 1992); für die Sortierung in transcytotische Vesikel ist die Aminosäure-Sequenz 670 - 707,

sowie die Phosphorylierung von Serin-664 wesentlich (Breitfeld et al., 1990). Während die beschriebene Sequenz den Transport zu den Lysosomen verhindert, hemmt die negativ geladene Phosphatgruppe eine Rezyklisierung zur Zelloberfläche (Casanova et al., 1990).

Jüngere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Phosphorylierung nur für die Transcytose von pIgA-Rezeptor in Abwesenheit des Liganden essentiell ist (Hirt et al., 1993).

Die Transcytose von pIgA kann durch Brefeldin A spezifisch bereits in einem frühen Stadium gehemmt werden (Hunziker et al., 1991), während der transzelluläre Transport von Transferrin durch dieselbe Substanz stimuliert wird (Wan et al., 1992). Diese Diskrepanz dürfte in der unterschiedlichen intrazellulären Prozessierung der beiden Rezeptoren begründet sein. Weitere Untersuchungen über den Einfluß von Brefeldin A auf die pIgA-Transcytose zeigten, daß diese Verbindung nicht nur in einem frühen, sondern auch in einem späten Stadium der Transcytose wirkt, indem es den Transport der pIgA-Rezeptoren aus apikal lokalisierten Endosomen zur apikalen Membran inhibiert. Dieser Prozeß scheint auch von heterotrimeren G-Proteinen abhängig zu sein, da er durch Cholera-Toxin ebenfalls gehemmt wird (Barroso & Sztul, 1994).

Die Mikrotubuli-Abhängigkeit der Transcytose wurde in MDCK-Zellen für beide Transport-Richtungen untersucht. Interessanterweise wurde die pIgA-Transcytose von der basolateralen zur apikalen Seite durch Depolymerisierung der Mikrotubuli nahezu völlig blockiert, während die Transcytose von Fc-Rezeptor von der apikalen zur basolateralen Seite unbeeinflusst war. Die Blockierung der basolateral-apikalen Transcytose ging mit einer mangelnden Translokation der transcytotischen Vesikel von der basolateralen zur apikalen Seite einher. Diese Translokation wurde jedoch bei 17°C in MDCK-Zellen (im Gegensatz zu Hepatocyten) nicht verhindert (Hunziker et al., 1990).

Die beiden unterschiedlichen Seiten polarisierter Zellen verhalten sich bei der Transcytose offensichtlich nicht gleich. Das ist auch in Einklang mit der Beobachtung, daß Mikrofilamente eine wichtige Rolle bei der Internalisierung auf der apikalen, nicht aber auf der basolateralen Seite spielen (Gottlieb et al., 1993).

Aufgrund der verschiedenen Ergebnisse mit pIgA muß die ursprüngliche Sicht, daß bei der Transcytose nach der Segregation aus frühen Endosomen und Translokation transcytotischer Endosomen diese direkt mit der gegenüberliegenden Membran fusionieren, abgeändert werden.

Die Transcytose scheint vielmehr eine basolaterale und eine apikale Endosomen-Population mit entsprechenden rezyklisierenden Elementen miteinander zu verbinden (Barroso & Sztul, 1994; Apodaca et al., 1994).

## **1. 4. MEMBRANFUSIONEN**

### **1. 4. 1. Allgemeine Fusionsmodelle:**

Die Notwendigkeit für Fusionsprozesse zwischen verschiedenen Membranen ergibt sich unmittelbar aus der Organisationsform von Eukaryonten als Lebensformen mit mehreren Kompartimenten (Organellen) innerhalb einer gemeinsamen Membranhülle. Die vielfältigen Aufgaben einer eukaryontischen Zelle, wie etwa Sekretion, Biosynthese von Membranproteinen, Transport von Enzymen zu ihren Zielorganellen, Aufnahme makromolekularer Verbindungen etc., erfordern die kontrollierte und spezifische Spaltung (Fission) oder Verschmelzung (Fusion) Membranhüllter Reaktionsräume.

Um bei der Fission das abzuspaltende Kompartiment vom Ausgangskompartiment völlig zu trennen, muß ebenfalls eine Membranverschmelzung stattfinden. Aufgrund des molekularen Aufbaus der Membran als asymmetrische Lipid-Doppelschicht (Lipid-Bilayer) mit einer dem Cytosol zugewandten und einer entsprechend abgewandten Seite, sind vom Ablauf des Fusionsvorganges her *cis*- und *trans*-Membranverschmelzungen zu unterscheiden (de Duve, 1986).

Bei der *cis*-Verschmelzung entsteht der erste Kontakt zwischen den beiden dem Cytosol zugewandten Lipidschichten (z.B. bei der Endosomenfusion), bei der *trans*-Verschmelzung zwischen den von der Zelle abgewandten Lipidschichten (z.B. bei der Abspaltung von Vesikeln in die Zelle bei der Endocytose - siehe Abb. 1. 6.).



Abb. 1. 6.

Schema von Membranverschmelzungen:

Die extracytoplasmatische Seite ist grau schattiert

Es wird angenommen, daß es für kurze Zeit zu Intermediärphasen im Aufbau der Lipid-Membran kommt. Diese Zwischenstadien könnten entweder die Charakteristik inverte micellarer Strukturen aufweisen (Wilschut, 1989 - siehe Abb. 1. 7. Teil A), oder über Proteine ablaufen, die einen Membrantunnel bilden, bzw. einen "Protein-Kragen" an der Fusionsstelle (Neher, persönliche Mitteilung - siehe Abb. 1.7. Teil B).

Abb. 1. 7.

Modell der Fusion zweier Lipid-Bilayer und mögliche intermediäre Zustände:

A) Inverte micellare Strukturen als Zwischenstufe; B) Protein-Kanal als Zwischenstufe

#### 1. 4. 2. Der Einfluß von N-Ethylmaleinimid auf Fusionsvorgänge

Bei der Analyse verschiedener Fusionsprozesse hat sich herausgestellt, daß diese möglicherweise im Prinzip sehr ähnlich ablaufen, und zwar nicht nur während der Endocytose, sondern auch bei anderen vesikulären Transport-Vorgängen. Dies wurde nicht nur aufgrund der Tatsache, daß alle spezifischen Fusionen ATP, Cytosol und erhöhte Temperatur erfordern, postuliert, sondern aufgrund der Beobachtung, daß ein bestimmter Faktor, der als N-Ethylmaleinimid sensitives Protein beim intra-Golgi Transport identifiziert wurde (Balch et al., 1984), auch bei Fusionsvorgängen zwischen ER und Golgi (Beckers et al., 1989) und bei Endosomenfusionen (Diaz et al., 1989 b) wesentlich ist. Der Faktor, der durch das SH-Gruppen alkylierende Reagens N-Ethylmaleinimid (NEM) inaktiviert wird, wurde als NSF bezeichnet (NEM-sensitive factor) und in der Folge als Protein identifiziert, das aus vier identen 76 kDa-Untereinheiten besteht. Die Aminosäure-Sequenz des Proteins wurde durch Klonierung und Sequenzierung des entsprechenden Gens aus CHO-Zellen aufgeklärt. Dabei wurde entdeckt, daß das Protein zu 48% mit dem SEC18-Genprodukt von *Saccharomyces cerevisiae* ident ist, und weitere 15% des Proteins sehr ähnlich sind (Wilson et al., 1989). Der hohe Identitätsgrad zwischen dem Säugetier- und dem Hefe-Protein haben zu dem Schluß geführt, daß dieser Faktor Bestandteil eines konservierten und ubiquitär verbreiteten Fusionsapparates ist.

NSF wurde im Cytosol, aber auch an die Membranen assoziiert gefunden, und es wurde gezeigt, daß die Dissoziation von der Membran die Hydrolyse von ATP voraussetzt. Die weitere Untersuchung ergab, daß zuerst bestimmte Proteine an die Membran (an einen potentiellen Rezeptor) binden müssen, bevor NSF über diese Proteine an die Membran assoziieren kann. Die Proteine wurden als "Soluble NSF-Attachment Proteins (SNAP)" bezeichnet; es konnten drei Vertreter mit jeweils 35 kDa, 36 kDa und 39 kDa ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -SNAP) identifiziert werden. Die Bindung zwischen NSF und dem Rezeptor war am stärksten, wenn sie über  $\gamma$ -SNAP in Kooperation mit einem der beiden anderen SNAP-Typen erfolgte. Daraus wurde ein Fusionsapparat aus mehreren Einheiten mit einem Sedimentations-koeffizienten von 20 S abgeleitet (Wilson et al., 1991; Waters et al., 1991; Wilson et al., 1992 - siehe Abb. 1. 8.).

Auch wenn dieser Fusionskomplex bei unterschiedlichsten intrazellulären Fusionen zum Einsatz kommt, und somit scheinbar ein universelles Prinzip der Zelle für diese Aufgabe darstellt, ist noch nicht zweifelsfrei erwiesen, daß

eben dieser Komplex bei der Fusion von Endosomen von verschiedenen Zelllinien gleichermaßen eingesetzt wird. Die Experimente von Diaz et al. (1989 b) konnten eine direkte Beteiligung von NSF bei der *in vitro* Fusion von Endosomen aus J774-Makrophagen nachweisen. Dabei konnte die auf NEM-behandelte Versuchsansätze fusionsregenerierende Wirkung von J774- oder CHO-Cytosol durch Vorinkubation des Cytosols mit einem Anti-NSF-Antikörper blockiert werden. Eine Zugabe von reinem CHO-NSF zu den Cytosol-Präparationen, bei denen das endogene NSF durch den Antikörper blockiert war, konnte deren restorative Eigenschaft wieder herstellen. Die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe wiesen jedoch darauf hin, daß die NEM-Sensitivität der Fusion von CHO- oder K562-Endosomen nicht ausschließlich auf NSF zurückzuführen sind, da eine 37°C-Inkubation von gelfiltrierte Cytosol in Abwesenheit von ATP, das sind Bedingungen unter denen Golgi-NSF rasch inaktiviert wird, zu keinem Verlust der restorativen Wirkung führten. Eine Inkubation mit Anti-NSF-Antikörper verursachte nur eine 25 - 30%ige Verringerung des NEM-sensitiven Fusionssignals (Wessling-Resnick & Braell, 1990 b). Diese Befunde sprechen für eine Beteiligung von NEM-sensitiven Proteinen, die nicht mit NSF ident sind.

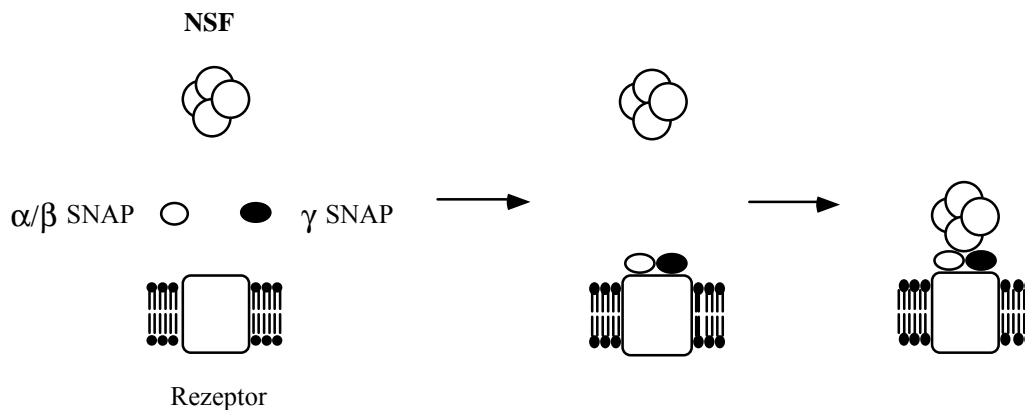


Abb. 1. 8.

Zusammensetzung des NSF/SNAP/Rezeptor-Komplexes, wie er für die Fusion von Golgi-Membranen postuliert wurde (Wilson et al., 1992):

NSF.... N-Ethylmaleinimid-Sensitive Factor

SNAP ..... Soluble NSF Attachment Protein

Erst nachdem SNAP-Moleküle an den entsprechenden Rezeptor der Membran gebunden haben, kann NSF an den Komplex assoziieren. Der gesamte Komplex ist essentiell für die Membran-Fusion. Durch ATP-Hydrolyse wird die Dissoziation, und somit die Inaktivierung des Fusionskomplexes verursacht.

### **1. 4. 3. Die Rolle von GTP-bindenden Proteinen**

Die Beobachtung, daß NSF als Bestandteil eines größeren Fusionsapparates bei mehreren unterschiedlichen Fusionsprozessen innerhalb der Zelle eingesetzt wird, führte zu dem Postulat, daß andere Faktoren an der Fusion beteiligt sein müssen, die die notwendige Spezifität der Reaktion garantieren. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß verschiedene GTP-bindende Proteine an den unterschiedlichen Membran-Fusionsprozessen beteiligt sind, und die genau definierte Lokalisation dieser GTP-bindenden Proteine in der Zelle hat dazu geführt, daß ihnen die Vermittlung der notwendigen Spezifität zugeschrieben wurde. Es wurde postuliert, daß diese Proteine in ihrer GTP-assoziierten Form an die Membran eines Vesikels gekoppelt eine Bindung mit einer spezifischen Andockstelle auf einem zweiten Vesikel eingehen, wodurch erst der Fusionsapparat wirksam werden kann - siehe Abb. 1.9. (Wilschut, 1989).

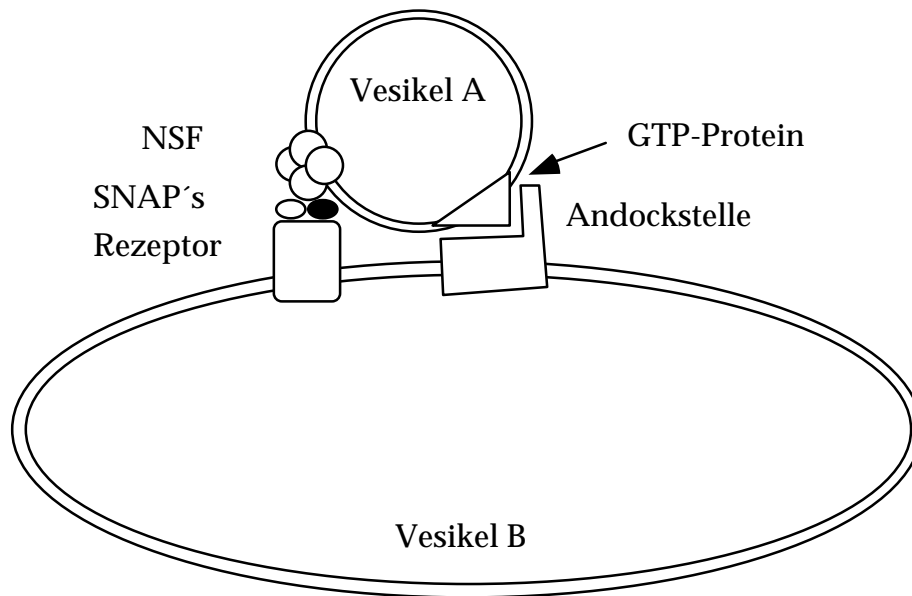


Abb. 1. 9.

Modell der Interaktion zwischen zwei Vesikeln vor der Fusion: Die Kopplung erfolgt durch Bindung zwischen einem GTP-bindenden Protein auf einem Vesikel und einer spezifischen Andockstelle auf dem zweiten Vesikel.

Ausgehend von Studien über Sekretionsmutanten von *Saccharomyces cerevisiae* (SEC4-Mutationen, Salminen & Novick, 1987), bei denen gezeigt wurde, daß das Protein des entsprechenden Gens ein "ras-ähnliches" kleines GTP-bindendes Protein ist, wurde nach den korrespondierenden Proteinen bei Säugetier-Zellen gesucht. Die Untersuchungen haben zur Entdeckung einer großen Zahl von ras-ähnlichen Proteinen geführt, die als rab-Proteine bezeichnet wurden. Diese Proteine, mit einem Molekulargewicht von 20 - 25 kDa, haben eine hoch konservierte GTP-Bindungsdomäne, die auch für die GTP-Hydrolyse bedeutend ist und eine Effektor-Domäne, über die das Protein z.B. mit einem GTPase-aktivierenden Protein (GAP) interagieren kann, das die eher niedrige rab-eigene GTP-Hydrolyse-Rate stimuliert (Balch, 1990). Die GTP-Bindung dürfte als eine Art molekularer Schalter fungieren,

bei dem die GTP-gebundene Form den aktiven, und die GDP-gebundene Form den inaktiven Zustand darstellt (Balch, 1990; Goud & McCaffrey, 1991). Die Funktion der rab-Proteine wird durch eine Zahl verschiedener anderer Proteine reguliert. Zu diesen zählen außer dem bereits angeführten GAP noch GTPase-inhibierende Proteine (GIP), GDP-Dissociation inhibitor (GDI) und sogenannte Austauschfaktoren (Guanine Nucleotide Exchange Factors), die den Austausch von GDP gegen GTP und umgekehrt beschleunigen (Goud & McCaffrey, 1991). Die Assoziation von rab-Proteinen an die jeweilige Membran wird durch eine posttrans-lationale Isoprenylierung (durch das Anfügen von Geranylgeranyl-Prenyl-Resten an Carboxy-terminale Cyteinreste durch eine Geranylgeranyl-Transferase II) unterstützt (Kinsella & Maltese, 1991; Pfeffer, 1992; Zerial & Stenmark, 1993). Die genetische Komplexität der Familie der rab-Proteine wurde durch partielle Sequenzierung mittels PCR-Klonierungstechniken aufgezeigt (Chavrier et al., 1992). Die Funktion der Aufrechterhaltung der Fusionspezifität wurde vor allem deshalb den rab-Proteinen zugeschrieben, weil sie genau bestimmten subzellulären Kompartimenten zugeordnet werden konnten (Review: Pfeffer, 1992; Zerial & Stenmark, 1993). Im Bereich des Endocytosewegs wurden hauptsächlich die Proteine rab4, rab5, rab7 und rab9 nachgewiesen. Rab4 konnte auf frühen Endosomen lokalisiert werden, ebenso rab5, das jedoch zusätzlich an der Cytoplasma-Membran und bei Clathrin-umhüllten Vesikeln gefunden wurde. Rab7 und rab9 wurden hingegen den späten Endosomen zugeordnet, wobei rab9 auch im Trans-Golgi Retikulum aufzufinden war. Es gibt Hinweise, daß bei frühen Endosomen neben rab4 und rab5 noch mindestens drei weitere rab-Proteine vertreten sind, deren Funktion noch nicht geklärt ist. Die Anwesenheit von verschiedenen rab-Proteinen auf einem Kompartiment wurde damit erklärt, daß sie dort unterschiedliche Funktionen zu erfüllen haben. Es ist aber noch nicht als gesichert anzusehen, daß diese rab-Protein-Zuordnung für alle Zellen gleichermaßen gültig ist. Es gibt bestimmte rab-Proteine, die nur in bestimmten Zelllinien zu finden sind; so ist z.B. rab3a nur in Zellen, die eine regulierte Sekretion ausüben; ebenso dürfte rab17 für polarisierte Zellen charakteristisch sein (Zerial & Stenmark, 1993). Die spezifische Lokalisation wird zumindest bei einigen Vertretern durch die Aminosäure-Sequenz im Bereich des C-Terminus determiniert. So konnte eine Übertragung der 34 C-terminalen Aminosäuren von rab7 auf rab5 die rab5-Lokalisation von frühen Endosomen und der Cytoplasma-Membran zur rab7-typischen Lokalisation auf späte Endosomen verschieben (Chavrier et al.,

1991). Diese Ergebnisse sprechen für die Existenz Organellen-spezifischer rab-Rezeptoren, die die C-terminale Domäne erkennen.

Das Postulat, daß die Spezifität der Fusionsvorgänge hauptsächlich durch rab-Proteine gewährleistet wird, kann jedoch nicht als gesichert angesehen werden, da in jüngster Zeit auch dem NSF/SNAP-Fusionskomplex eine Spezifität zugesprochen wurde. Bei der Suche nach SNAP-Rezeptoren mit Rinderhirn als Ausgangsmaterial wurden vier verschiedene Faktoren gefunden, die alle mit der Synapse assoziiert waren. Es konnte nachgewiesen werden, daß ein SNAP-Rezeptor auf der Ziel-Membran existiert (target-SNAP-Rezeptor oder t-SNARE), aber auch ein SNAP-Rezeptor auf dem Transportvesikel (vesicular- oder v-SNARE). Folglich könnten die beiden Membranen über NSF und SNAP spezifisch miteinander interagieren, wobei theoretisch auch eine direkte Interaktion zwischen v-SNARE und t-SNARE denkbar wäre (Söllner et al., 1993). Die Analyse der Aminosäure-Sequenz von Rabphilin 3a, einem Protein, das spezifisch rab3a erkennt, führte zu der Vermutung, daß es an t-SNARE binden kann. Aufgrund dessen wurde ein theoretisches Modell aufgestellt, bei dem v-SNARE und t-SNARE an den NSF/SNAP-Komplex binden, und andererseits mit einem rab-Protein und dessen korrespondierendem Rabphilin interagieren (Zerial & Stenmark, 1993 - siehe Abb. 1. 10.).



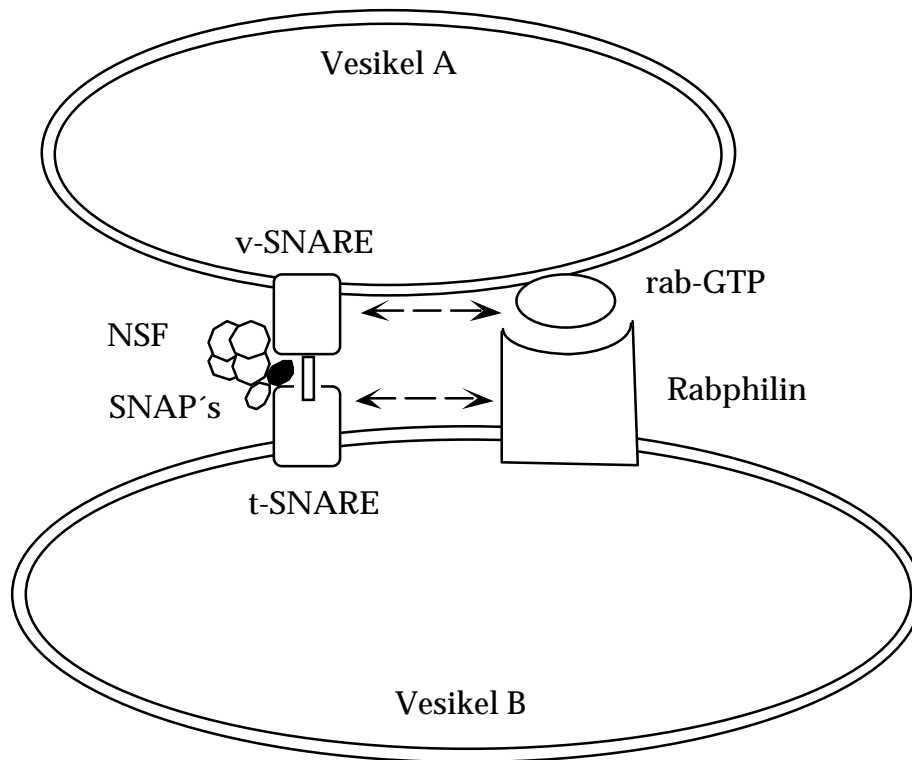


Abb. 1. 10.

Modell für die mögliche Interaktion zweier Vesikel vor der Fusion über rab-Proteine und SNAP-Rezeptoren (nach Zerial & Stenmark, 1993; modifiziert):

v-SNARE: Vesikel- SNAP-Rezeptor

(Vesicular Soluble N-Ethylmaleinimid Sensitive Factor Attachment Protein Receptor); t-SNARE: Target-SNAP-Rezeptor

- 1) NSF und SNAP interagieren mit v-SNARE und t-SNARE
- 2) v-SNARE und t-SNARE binden möglicherweise aneinander
- 3) Das Vesikel A-spezifische rab-Protein interagiert mit seinem Rabphilin
- 4) Möglicherweise besteht eine Interaktion zwischen rab-Protein und v-SNARE; sowie eine Interaktion zwischen Rabphilin und t-SNARE

Zusätzlich zu den rab-Proteinen wurde jedoch auch eine weitere Familie kleiner GTP-bindender Proteine gefunden, die die Bezeichnung ARF für "ADP-Ribosylation Factor" tragen, und die sowohl beim intra-Golgi Transport (Taylor & Melançon, 1991), als auch bei der Endosomen-Fusion von Bedeutung sind (Lenhard et al., 1992 b).

Außer den kleinen GTP-bindenden Proteinen der rab- und ARF-Familie sind auch noch große, heterotrimere G-Proteine in der Form, wie sie auch die Signal-Transduktion an der Cytoplasma-Membran vermitteln, an den intrazellulären Transportvorgängen bei der Sekretion und der Endocytose beteiligt (Pfeffer, 1992; Colombo et al., 1992 b).

#### **1. 4. 4. Fusionsvorgänge bei der Endocytose**

##### **1. 4. 4. 1. Frühe Endocytose-Ereignisse**

Der erste Vorgang einer Membranfusion bei der Endocytose ist das Schließen des "Membranhalses", bei der eine Einstülpung der Cytoplasma-Membran (z.B. ein "Clathrin-Coated Pit") zu einem Vesikel ("Clathrin-Coated Vesicle") geschlossen wird. Dieser Vorgang ist, wie bereits erwähnt eine *trans*-Membranverschmelzung. Über diese Art der Fusion ist noch sehr wenig bekannt. Es kann angenommen werden, daß sie unter Umständen völlig anders reguliert wird, als eine *cis*-Verschmelzung, da die Kontaktseite der beiden Membranen außerhalb der Zelle liegt. Somit können die verschiedenen cytosolischen Faktoren des Fusionsapparates, der bei *cis*-Fusionen zum Einsatz kommt, wie z.B. NSF, SNAP und GTP-bindende Proteine, kaum in ähnlicher Weise wirksam werden.

Untersuchungen dieser frühen Stadien der Endocytose unter Verwendung von perforierten A431-Zellen (einer humanen Adenocarcinom-Zelllinie) haben gezeigt, daß die Voraussetzung für die Abschnürung Clathrin-umhüllter Vesikel, nämlich die Einstülpung der Cytoplasma-Membran zu Clathrin-Coated Pits von Adaptor-Proteinen, die zwischen der Membran und der Clathrin-Hülle liegen, in Verbindung mit Clathrin stimuliert wird (Smythe et al., 1992).

Der Abschnürungsvorgang selbst dürfte von Cytosol, erhöhter Temperatur und der Hydrolyse von ATP abhängig sein (Schmid & Smythe, 1991). Bei diesem Prozeß scheinen auch heterotrimere G-Proteine beteiligt zu sein, wie durch Hemmung mittels Fluoroaluminat, sowie durch Mastoparan, das spezifisch mit  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine interagiert, gezeigt werden konnte (Carter et al., 1993).

In einem anderen experimentellen System, in dem isolierte Plasma-Membranen eingesetzt wurden, konnte eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit bei der Abspaltung Clathrin-umhüllter Vesikel gefunden werden (Lin et al., 1991). In

der Folge wurde die Beteiligung von Annexin VI an diesem Prozeß nachgewiesen (Lin et al., 1992).

Nach dem Abkoppeln Clathrin-umhüllter Vesikel von der Cytoplasma-Membran wird der Clathrin-Mantel sehr rasch durch eine sogenannte "Uncoating-ATPase" abgebaut und es kann der nächste Fusionsprozeß stattfinden, der dem Mechanismus nach eine *cis*-Verschmelzung darstellt. Fissionsprozesse (Knospungsvorgänge) von endocytischen Kompartimenten, bei denen es zu einer Vesikel-Abspaltung ins Cytosol kommt, wie sie etwa für die Sortierung unterschiedlicher Liganden in die verschiedenen Transportwege (Rezyklisierung, lysosomaler Weg, transcytotischer Weg) notwendig sind, stellen *trans*-Membranverschmelzungen dar; alle Fusionsvorgänge zwischen Zellkompartimenten wie Endosomen oder Lysosomen sind *cis*-Verschmelzungen. Fissionsprozesse, bei denen Vesikel in das Innere eines Zellkompartiments abgespalten werden (Mikro-Autophagie, bzw. Bildung sogenannter "Multivesicular bodies") sind naturgemäß ebenfalls *cis*-Membranverschmelzungen.

Eine der ersten Arbeiten, die eine *in vitro* Fusion zwischen intrazellulären Kompartimenten beschreibt, konnte einen Fusionsvorgang zwischen den ersten isolierbaren Endocytose-Kompartimenten und Lysosomen rekonstituieren (Altstiel & Branton, 1983). Dabei wurde festgestellt, daß der Clathrin-Mantel die Fusion hemmt. Ein signifikantes Fusionsignal zwischen Lysosomen und Clathrin-umhüllten Vesikeln, wurde nur gefunden, wenn der Clathrin-Mantel vorher entfernt wurde. Bei dieser Arbeit war jedoch die Anwesenheit von etwa 10  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Ca}^{2+}$  für die Fusion notwendig, nicht jedoch die Gegenwart von ATP. Eine Protease-Behandlung der Vesikeloberfläche führte zu keinem Verlust an Fusionsfähigkeit. Da in anderen Fusionssystemen Membran-assoziierte Faktoren eine Voraussetzung für die Fusion darstellten (Colombo et al., 1991), und ein ATP-abhängiges Fusionsignal gemessen wurde, könnte die von Altstiel & Branton beschriebene Fusion unter Umständen auch einen unspezifischen,  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Prozeß darstellen. Die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  wurde jedoch bei der Endosomenfusion nicht ausreichend untersucht. Während bei der Fusion von J774-Makrophagen-Endosomen die Anwesenheit von freiem  $\text{Ca}^{2+}$  (ohne Komplexierung durch EGTA) eine ATP-unabhängige Fusion induzierte (Diaz et al., 1988), fand bei CHO- oder K562-Endosomen keine ATP-unabhängige *in vitro* Fusion in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  statt. Es konnte sogar eine Hemmung der Endosomenfusion durch Calcium ab einer Konzentration von etwa 40  $\mu\text{mol/l}$  beobachtet werden (Wessling-Resnick & Braell, 1990 b). Es muß jedenfalls

festgestellt werden, daß viele Endosomen-Fusionstests in Gegenwart von EGTA zur Komplexbildung von freiem Calcium durchgeführt wurden (Braell, 1987; Diaz et al., 1988; Wessling-Resnick & Braell, 1990 b; Pitt et al., 1992; Lenhard et al., 1992 a). Es wäre deshalb durchaus möglich, daß bestimmte endocytische Kompartimente, die unter diesen *in vitro*-Bedingungen nicht fusionieren, *in vivo* doch zur Fusion befähigt sind.

Aufgrund der zellulären Organisation, bei der Clathrin-umhüllte Vesikel in der Zellperipherie und Lysosomen im perinukleären (bzw. bei Hepatocyten im pericanaliculären) Bereich auftreten, erscheint es jedenfalls unwahrscheinlich, daß eine Fusion zwischen Clathrin-umhüllten Vesikeln (nach Verlust ihres Clathrin-Mantels) mit Lysosomen eine physiologische Rolle spielt. Die übliche Auffassung ist, daß diese peripheren präendosomalen Vesikel entweder untereinander, oder mit präexistierenden frühen Endosomen fusionieren. Dieser Fusionsprozeß konnte mit gereinigten Clathrin-umhüllten Vesikeln von A431-Zellen *in vitro* nachvollzogen werden, und wies im Prinzip die gleichen Eigenschaften auf wie die Fusion von Endosomen untereinander (Woodman & Warren, 1991). Ebenso konnte gezeigt werden, daß Vesikel aus Cytoplasma-Membran von J774-Makrophagen mit kinetisch frühen Endosomen fusionieren können (Mayorga et al., 1988). Dieser Fusionsprozeß war abhängig von ATP, Cytosol und KCl und ebenfalls der Endosomenfusion sehr ähnlich. Die Effizienz des Fusionsvorganges war jedoch niedriger als bei der Fusion früher Endosomen im gleichen Zellkultur-System. Wenn Endosomen mit der Cytoplasma-Membran (zumindest mit bestimmten Domänen) fusionieren können, muß jedoch angenommen werden daß *in vivo* regulatorische Mechanismen existieren, die diesen Fusionsprozeß hemmen, da sonst die endocytisierten Verbindungen wieder rasch in den Extrazellulär-Raum sezerniert würden. Die Fusion mit der Cytoplasma-Membran erscheint folglich nur für rezyklisierende Endosomen sinnvoll.

### **Fusionsprozesse im Bereich der frühen Endosomen**

Ob die in der Zellperipherie befindlichen frühen Endosomen nun durch Fusion der präendosomalen Vesikel untereinander entstehen, oder präexistierende Kompartimente sind, mit denen diese Vesikel fusionieren, ist noch nicht zweifelsfrei geklärt. Die frühen endocytischen Kompartimente bilden jedenfalls ein komplexes Membransystem mit tubulo-retikulären und

vakuolären Bereichen, in dem zahlreiche Fusions- und Fissionsvorgänge ablaufen.

Die meisten Versuchsansätze, die eine *in vitro* Fusion von Endosomen zum Inhalt haben, setzten Endosomen aus diesem Stadium der Endocytose ein. Die unterschiedlichen Fissionsprozesse, die von diesem Kompartiment ausgehen wurden jedoch kaum charakterisiert. In polarisierten Zellen wie Hepatocyten gehen von den frühen Endosomen drei weitere Transportwege aus, nämlich die Rezyklisierung von Rezeptoren an die Zelloberfläche, der lysosomale Transportweg und die Transcytose.

Bis jetzt konnte nur die Segregation zwischen einem Marker für den Rezyklisierungsweg (biotinyliertes Transferrin) und einem Marker des lysosomalen Weges (Avidin- $\beta$ -Galaktosidase) mit Hilfe eines indirekten Versuchsansatzes *in vitro* rekonstituiert werden (Wessling-Resnick & Braell, 1990 a). Es wurden frühe Endosomen aus K562-Zellen verwendet. Die Vorinkubation einer der beiden Membran-Präparationen in Gegenwart von ATP und Cytosol führte zu einer Verminderung des Signales bei einem anschließenden Fusionstest mit dem zweiten Marker. Die Kinetik dieses Verlusts an Fusionsfähigkeit war praktisch ident mit der Kinetik der *in vivo* Segregation, nicht aber mit der normalen Fusionskinetik. Der Vorinkubationseffekt konnte durch NEM inhibiert werden; er wurde jedoch nicht von Ammoniumchlorid oder Chloroquin beeinflusst. Durch Gradienten-Zentrifugation konnte die Dichte-Zunahme des lysosomalen Markers bei gleichbleibender Dichte des Transferrin-Kompartiments nachgewiesen werden, und somit die Trennung der beiden Marker in unterschiedliche Kompartimente. Mit Ausnahme der Feststellung der Temperatur-, Cytosol- und ATP-Abhängigkeit dieses Prozesses konnten aber keine näheren Aussagen über den Mechanismus der Membranverschmelzung bei der Fission getroffen werden.

Im Gegensatz dazu ist bereits sehr viel über den Ablauf der Fusionen zwischen kinetisch frühen Endosomen bekannt. Gerade frühe Endosomen scheinen in allen bisher untersuchten Zelllinien (BHK-, CHO-, HepG2-, K562-, A431-Zellen, Makrophagen, Lymphocyten und Zellen aus *Dictyostelium discoideum*,) eine hohe Fusionsaktivität aufzuweisen, was sogar dazu geführt die Gesamtheit der peripheren Endosomen als eine funktionelle Einheit zu beschreiben; gewissermaßen als ein funktionell zusammenhängendes Organell (Gruenberg & Howell, 1989). Dabei spielt es offensichtlich keine Rolle, ob frühe Endosomen tatsächlich ein kontinuierliches Retikulum bilden,

wie aus den Befunden von Hopkins et al. (1990) für Hep-2 Zellen hervorgeht, solange die Dynamik der Fusionsprozesse eine Funktionseinheit bewirkt.

#### **1. 4. 4. 2. 1. ATP-, Cytosol- und Temperaturabhängigkeit der Fusion**

Die *in vitro* Fusion früher Endosomen erforderte in allen so weit untersuchten Zelllinien die Anwesenheit von ATP und Cytosol, und sie war abhängig von der Inkubationstemperatur (Gruenberg & Howell, 1986; Braell, 1987; Diaz et al., 1988; Beaumelle & Hopkins, 1989; Gruenberg & Howell, 1989; Bomsel et al., 1990; Wessling-Resnick & Braell, 1990 b; Pitt & Schwartz, 1991; Lenhard et al., 1992 a). Als Energiequelle wurde meist ein ATP-regenerierendes Reaktionsgemisch verwendet. Bei Verwendung von ATP alleine (1 mmol/l) war das Fusionssignal von Makrophagen-Endosomen bei etwa 62% der Kontrolle (Diaz et al., 1988). Bei HepG2-Endosomen wurden mit 5 mmol/l ATP nur etwa 50% der Fusion verglichen mit einem ATP-regenerierenden System erzielt (Pitt & Schwartz, 1991). Die Fusion der Endosomen konnte durch die nicht-hydrolysierbare ATP-analoge Verbindung ATP $\gamma$ S (Adenosin 5'- $\gamma$ -thiotriphosphat) gehemmt werden. Der Effekt von ATP $\gamma$ S und die Hemmung der Endosomenfusion durch GTP $\gamma$ S waren nicht additiv, was darauf hinweist, daß die beiden Nucleotide bei unterschiedlichen Stadien des Fusionsvorganges wirken (Wessling-Resnick & Braell, 1990 b).

Die Cytosol-Abhängigkeit der Fusion war bei Endosomen aus CHO-Zellen, J774-Makrophagen und *Dictyostelium discoideum* relativ niedrig. Das Fusionsmaximum wurde bei diesen Zelllinien bereits bei einer Proteinkonzentration von etwa 1-3 mg/ml erreicht (Braell, 1987; Mayorga et al., 1989; Lenhard et al., 1992 a). Eine deutlich höhere Abhängigkeit von cytosolischen Faktoren wurde bei BHK- und HepG2-Zellen beschrieben (Gorvel et al., 1991; Pitt & Schwartz, 1991). Bei diesen Zelllinien wurde eine Zunahme der Fusion bis 10 mg/ml (bei BHK-Endosomen) bzw. bis 7 mg/ml (bei HepG2-Endosomen) gemessen, und es konnte dabei noch keine Plateau-Phase detektiert werden, was darauf hindeutet, daß das Maximum erst bei einer deutlich höheren Cytosol-Konzentration erreicht wird.

Die für die Fusion notwendigen cytosolischen Faktoren scheinen keine besonders hohe Zelllinien-Spezifität aufzuweisen, da bei vielen Endosomen-Fusionstests Cytosol-Präparationen, die aus anderen Zelltypen stammen als die markierten Endosomen, die Fusion vergleichbar unterstützen (Diaz et al., 1988; Wessling-Resnick & Braell, 1990 b; Pitt & Schwartz, 1991;).

Aber auch die mit den Endosomen-Membranen assoziierten Faktoren dürften zumindest teilweise nicht besonders Species-spezifisch sein, da auch Endosomen unterschiedlicher Zellarten miteinander fusionieren können (Wessling-Resnick & Braell, 1990 b).

Die Temperatur-Abhängigkeit der *in vitro* Fusion von Endosomen war bei den untersuchten Säugetier-Zellen in etwa gleich. Bei 10°C konnte in diesen Zellen keine Fusion detektiert werden, erst ab einer Temperatur von ca. 20°C war ein Fusionsignal meßbar (Wessling-Resnick & Braell, 1990 a; Beaumelle & Hopkins, 1989; Diaz et al., 1988). Bei Endosomen des amöbenartigen Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* konnte zwar bei 14°C keine Fusion nachgewiesen werden, dafür aber im Vergleich zu den anderen Zelllinien ein deutliches Signal bereits bei 21°C (Lenhard et al., 1992 a). Diese Eigenschaft wurde von den Autoren mit der Tatsache erklärt, daß *Dictyostelium discoideum* -Zellen im Gegensatz zu den Säugetier-Zellen am besten zwischen 21°C und 28°C wachsen.

Nachdem eine Internalisierung von Markern bei 16°C zu einer Beladung von frühen Endosomen führt, ohne deren Morphologie im Vergleich zur 37°C-Kontrolle wesentlich zu ändern, kann jedenfalls angenommen werden, daß Fusionen zwischen frühen endocytischen Kompartimenten *in vivo* bei 16°C auftreten.

#### **1. 4. 4. 2. 2. Hemmung der Endosomenfusion durch NEM und GTP $\gamma$ S**

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen über Fusionsprozesse entlang des Sekretionsweges kann die Fusion von Endosomen durch NEM gehemmt werden. Wie bereits beschrieben kann diese NEM-Sensitivität zumindest bei einer Zelllinie (J774-Makrophagen) dem NEM-sensitiven Faktor NSF, der auch bei anderen Fusionsvorgängen essentiell ist, zugeschrieben werden (Diaz et al., 1989 b). Es gibt jedoch auch Hinweise dafür, daß die NEM-abhängige Hemmung der Endosomenfusion auch auf andere Faktoren zurückgeführt werden kann (bei K562-Zellen: Wessling-Resnick & Braell, 1990 b). In der gleichen Arbeit wurde auch festgestellt, daß die Fusion durch die nicht hydrolysierbare GTP-analoge Verbindung GTP $\gamma$ S (Guanosin- $\gamma$ -thio-Triphosphat) gehemmt wird, wobei der GTP $\gamma$ S-Effekt noch vor dem NEM-Effekt liegt. Bei einer Inkubation in Gegenwart von NEM kam es zur Akkumulierung einer Intermediärstufe, die bereits hinter dem GTP $\gamma$ S-sensitiven Schritt lag. Folglich wurde postuliert, daß GTP-bindende Proteine

für die Erkennung oder Aggregation der beiden Fusionspartner notwendig sind, nicht jedoch für die Fusion. Aufgrund der Hemmbarkeit der Fusion durch Fluoro-Aluminat, das nur heterotrimere G-Proteine beeinflusst, wurde ein Einfluß dieser Klasse von GTP-bindenden Proteinen für wahrscheinlich erachtet.

Eine GTP $\gamma$ S-Sensitivität wurde im allgemeinen bei allen Fusionstests festgestellt. In den seltensten Fällen konnte jedoch eine genaue Zuordnung der GTP $\gamma$ S-sensitiven Stadien getroffen werden, da ähnlich wie bei Transportvorgängen entlang des sekretorischen Weges drei verschiedene Familien von Proteinen, die für die Fusion von Bedeutung sind, betroffen sein können, nämlich kleine GTP-bindende Proteine der rab- oder ARF-Familie, sowie große, heterotrimere G-Proteine. Der Einfluß der einzelnen Vertreter dieser GTP-bindenden Proteine ist auch möglicherweise von der untersuchten Zelllinie abhängig.

Von einer Arbeitsgruppe wurde beschrieben, daß der GTP $\gamma$ S-Effekt (bei J774-Makrophagen-Endosomen) von der Cytosol-Konzentration während des Fusionstests abhängig ist. Bei hohen Cytosol-Konzentrationen verursachte GTP $\gamma$ S eine Hemmung der Fusion, während es bei niedrigen Cytosol-Konzentrationen zu einer Erhöhung des Fusionssignals durch GTP $\gamma$ S kam (Mayorga et al., 1989 b). Dieses Phänomen wurde von den Autoren damit erklärt, daß in Gegenwart von GTP $\gamma$ S cytosolische Faktoren, die für die Fusion wesentlich sind, an die endosomale Membran binden und es dadurch unter Cytosol-limitierten Bedingungen zu einer Stimulierung der Fusion kommt. Wenn Endosomen in Abwesenheit von KCl, also unter nicht-fusogenen Bedingungen, jedoch in Anwesenheit von Cytosol und GTP $\gamma$ S bei 37°C vorinkubiert wurden, so wurde in einem darauffolgenden Fusionstests (in Gegenwart von KCl) sogar in Abwesenheit von Cytosol ein Fusionssignal beobachtet. Die Hypothese, daß GTP $\gamma$ S die irreversible Bindung cytosolischer Fusionsfaktoren an die Membran induziert, wurde dadurch untermauert, daß eine Präinkubation von Cytosol in Gegenwart von Membranen und GTP $\gamma$ S die fusogene Kapazität dieser Cytosol-Präparation hemmte, indem sie eine Verzehrerung der Fusionsfaktoren verursachte. In weiterer Folge konnte nachgewiesen werden, daß ein Vertreter der ARF-Proteine (ADP-Ribosylation Factors) für dieses Verhalten verantwortlich ist. Synthetische Peptide, die den 16 NH<sub>2</sub>-terminalen Aminosäuren von ARF1 und ARF4 entsprechen, und dadurch kompetitiv zur ARF-Aktivität wirken, blockierten die GTP $\gamma$ S-induzierte Stimulierung der Fusion in verdünntem Cytosol und ebenso die GTP $\gamma$ S-abhängige Hemmung der Fusion in konzentriertem Cytosol. Die



Zugabe von rekombinantem myristyliertem ARF hemmte die *in vitro* Fusion in Gegenwart von GTP $\gamma$ S, sowohl in verdünntem, als auch in konzentriertem Cytosol, indem es die Ausbildung eines Präfusionsstadiums blockierte (Lenhard et al., 1992 b). Der unterschiedliche Effekt von GTP $\gamma$ S bei hohen und niedrigen Cytosol-Konzentrationen konnte aber nicht nur durch ARF-Peptide verhindert werden, sondern auch durch eine niedrige Konzentration (10  $\mu$ mol/l) des amphiphilen Tetradeka-Peptids Mastoparan, das den GTP-Austausch verschiedener  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine beschleunigt. Mastoparan-Konzentrationen von mehr als 20  $\mu$ mol/l hemmten die Fusion bei beiden Cytosol-Konzentrationen. Ebenso konnte eine Hemmung der Endosomenfusion durch Zugabe gereinigter G $\beta\gamma$ -Untereinheiten erzielt werden. Nachdem jedoch Mastoparan und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten gegenteilige Wirkungen auf G-Proteine ausüben, müßte man die Beteiligung von zwei heterotrimeren G-Proteinen annehmen. Die Aktivierung eines G-Proteins durch Mastoparan würde dann die Dissoziation seiner G $\beta\gamma$ -Untereinheit verursachen, das wiederum an ein zweites G-Protein binden und dadurch dessen Wirkung blockieren könnte (Colombo et al., 1992 b). Eine Abhängigkeit des GTP $\gamma$ S-Effekts von der Cytosol-Konzentration, wie sie bei der *in vitro* Fusion von Makrophagen-Endosomen beobachtet wurde, wurde auch für Endosomen von *Dictyostelium discoideum* beschrieben (Lenhard et al., 1992 a).

#### **1. 4. 4. 2. 3. Die Rolle der GTP-bindenden Proteine rab4 und rab5**

Der Einfluß jener rab-Proteine (rab4 und rab5), die hauptsächlich auf frühen Endosomen lokalisiert sind, wurde vor allem durch genetische Studien untersucht, bei denen entweder die funktionelle Form, oder mutierte Varianten der rab-Proteine in größerer Menge exprimiert wurden.

Die genauere Analyse der Funktionen von rab4- und rab5-Proteinen hat deutliche Unterschiede aufgezeigt. Nachdem die Lokalisation von rab4 auf frühen Endosomen nachgewiesen wurde (Van der Sluijs, 1991), konnte gezeigt werden, daß es die Funktion oder die Bildung von endocytischen Kompartimenten, die mit der Rezyklisierung von Rezeptoren an die Cytoplasma-Membran verbunden sind, kontrolliert. Eine Überexpression von rab4 führte zu einer Umverteilung von Transferrin-Rezeptoren von einem endocytischen Pool zur Zelloberfläche, sowie zur Akkumulierung von Transferrin-Rezeptoren in einer Population endocytischer Vesikel ohne einem

ausgeprägten sauren Milieu (wahrscheinlich rezyklisierende Endosomen). Morphologisch verursachte die Überexpression die Zunahme kleiner tubulärer Strukturen (Van der Sluijs, 1992 a). Die außerordentlich feste Bindung von rab4 an endosomale Membranen (Van der Sluijs, 1991) wird durch eine reversible Phosphorylierung des Serin<sup>196</sup>-Restes durch eine p34<sup>cdc2</sup>-Kinase während der Mitose aufgehoben, wodurch das Protein ins Cytosol freigesetzt wird. Die C-terminale Isoprenylierung wird dabei jedoch nicht verändert (Van der Sluijs, 1992 b).

Die Überexpression von rab 5 führte im Gegensatz zu rab4 zur Ausbildung von atypisch großen frühen Endosomen und zu einer Erhöhung der Endocytose-Rate. Die Überexpression einer rab5-Mutation, bei der die Bindung von GTP blockiert ist, hatte einen gegenteiligen Effekt; die Endocytose-Rate war bei dieser Mutation um 50% reduziert, während aber die Rezyklisierungsrate nicht deutlich verändert war. Morphologisch verursachte die Expression der mutanten Form die Ausbildung kleinerer endocytischer Strukturen. Aufgrund dessen wurde postuliert, daß rab5 für die Fusion von präendosomalen Vesikeln (Clathrin-umhüllte Vesikel nach Abbau ihres Clathrin-Mantels) mit frühen Endosomen, bzw. für die Fusion früher Endosomen untereinander wesentlich ist (Bucci et al., 1992). Diese *in vivo* Daten sind auch in Übereinstimmung mit dem Ergebnis, daß rab5 die *in vitro* Fusion früher Endosomen reguliert. Die Endosomenfusion konnte durch Antikörper gegen rab5 gehemmt werden, ebenso durch Cytosol aus Zellen, die inaktives rab5 in größerer Menge exprimieren. Cytosol, das überexprimiertes, aktives rab5 enthält, stimulierte hingegen die Fusion (Gorvel et al., 1991). Genauere *in vivo* und *in vitro* Studien, bei denen der Einfluß der GTPase-Aktivität von rab5 auf die Endosomenfusion untersucht wurde, haben zu dem Ergebnis geführt, daß die GTPase-Aktivität nicht für die Membranfusion entscheidend ist, sondern für die Inaktivierung des Proteins und seine Abkopplung von der Membran. Ein mutiertes rab5-Protein mit stark reduzierter GTPase-Aktivität, das folglich in seiner GTP-Form akkumuliert, führte *in vivo* zur Ausbildung extrem großer früher Endosomen, und stimulierte bereits in kleiner Menge die *in vitro* Fusion der Endosomen. Ein mutiertes rab5-Protein mit einer erhöhten Affinität zu GDP zeigte die gegenteilige Charakteristik. Dies bedeutet, daß die GTP-Form des Proteins für die Fusion wichtig ist, nicht jedoch die GTP-Hydrolyse. Das bedeutet auch, daß die Hemmung der Fusion durch GTP $\gamma$ S in diesem Fall nicht über rab5 abläuft (Stenmark et al., 1994). Die N-terminale Domäne von rab5, die besonders empfindlich gegen Trypsin-Abbau ist, erwies sich als wesentlich

für die Interaktion und Fusion der Membranen. Die Vorinkubation der Membranen mit einem synthetischen Peptid dieser Domäne konnte die Endosomenfusion blockieren (Steele-Mortimer et al., 1994).

#### **1. 4. 4. 2. 4. Andere Membran-assoziierte Fusionsfaktoren**

Es gibt Hinweise dafür, daß noch andere Membran-assoziierte Faktoren am Fusionsprozeß beteiligt sind. In einer Studie von Colombo et al. (1991) mit J774-Makrophagen wurde gezeigt, daß durch eine Behandlung der Endosomen mit dem proteolytischen Enzym Trypsin diese Faktoren abgebaut und inaktiviert werden. Die Fusionsaktivität dieser Vesikel konnte aber durch die Zugabe einer Präparation peripherer Membranproteine, die durch Suspendierung der Membranen in 0,5 mol/l KCl-Puffer gewonnen wurden, wieder hergestellt werden. Die fusionsregenerierende Wirkung dieser peripheren Membranproteine konnte nicht dem NEM-sensitiven Faktor zugeschrieben werden. Im Gegensatz zu BHK-Zellen, in denen die fusionshemmende Wirkung des Trypsins scheinbar auf rab5 beruht, deuteten Fraktionierungsstudien darauf hin, daß sich der aktive Faktor der J774-Präparation aufgrund seines Molekulargewichts von mehr als 200 kDa auch deutlich von den kleinen GTP-bindenden Proteinen unterscheidet; es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß er zur Gruppe der heterotrimeren G-Proteine zählt. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Faktor für die Aggregation der Membranen vor der Fusion notwendig ist.

Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, bei dem die fusionsabhängige Übertragung von Proteinen von Donor-Vesikeln auf ein Akzeptor-Kompartiment bestimmt wird. Dabei wurden die Proteine des Donors metabolisch mit <sup>35</sup>S-Methionin markiert, (in BHK-Zellen) und eine gereinigte Endosomen-Fraktion wurde mit unmarkierten, durch Immunisolierung gereinigten und immobilisierten Akzeptor-Endosomen zur Fusion gebracht. Dabei werden markierte endosomale Proteine auf den immobilisierten Akzeptor übertragen, und diese können (nach Entfernung der nicht transferierten Proteine) durch zweidimensionale Elektrophorese charakterisiert werden. Bei Verwendung von intakten Endosomen als Donor-Präparation wurden durch die Fusion etwa 50 verschiedene Proteine übertragen. Wenn jedoch die Donor-Endosomen vorher einer Ultraschall-Fragmentierung unterworfen wurden, wodurch es zur Bildung kleiner

Vesikel mit einer geringeren Anzahl unterschiedlicher Proteine kommt, so wurden nur etwa fünf verschiedene Proteine transferiert.

Zu diesen Proteinen, die scheinbar eine elementare Voraussetzung für die Fusion bilden, zählen zwei Membranproteine mit niedrigem isoelektrischen Punkt und etwa 200 kDa und 40 kDa Molekulargewicht, sowie drei periphere Membranproteine (48 kDa, 38 kDa und 14 kDa) mit höherem isoelektrischen Punkt, die an die cytoplasmatische Seite der Membran assoziiert sind. Das periphere Membranprotein mit 38 kDa wurde als Annexin II identifiziert, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, das für Membran-Interaktionen wesentlich sein könnte. Dieses Protein wurde auch morphologisch auf endosomalen Membranen nachgewiesen. Nachdem Annexin II die Aggregation und Fusion von Phospholipid-Vesikeln mit Chromaffin-Granula induzieren kann, könnte es auch eine ähnliche Rolle in der Endosomenfusion spielen, wahrscheinlich in Kooperation mit anderen Fusionsfaktoren (Emans et al., 1993).

Für eine Präparation hochgereinigter Hepatocyten-Endosomen wurde unlängst gezeigt, daß das Hauptprotein an ihrer cytoplasmatischen Seite Annexin VI sein dürfte, ein Vertreter der Annexin-Familie mit einem Molekulargewicht von ca. 68 kDa (Jäckle et al., 1994).

Die Familie der Annexine umfaßt mindestens 13 weit verbreitete Proteine, denen bereits verschiedene Rollen bei intrazellulären Fusionsprozessen zugewiesen wurden. So wurde etwa postuliert, daß Annexine aufgrund ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Eigenschaften mit den Phospholipid-Gruppen der Membranen interagieren. Die lokal dehydratisierende Fähigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ , oder die Bildung eines Membrankanals könnten dann die Membranfusion auslösen (Gruenberg & Emans, 1993).

#### **1. 4. 4. 2. 5. Verschiedene Charakteristika der Fusion früher Endosomen**

Zur näheren Charakterisierung der *in vitro* Fusion früher Endosomen wurde der Prozeß auch morphologisch untersucht. Bei Untersuchungen von Diaz et al. (1989) wurden Makrophagen-Endosomen eingesetzt, die mit Goldpartikeln dreier unterschiedlicher Größen beladen waren. Die markierten frühen endocytischen Kompartimente traten als Vesikel mit einem Durchmesser von 100 - 200  $\mu\text{m}$ , sowie als kleine tubuläre Strukturen auf. Eine Inkubation dieser Kompartimente unter Fusionsbedingungen (37°C, in Gegenwart von ATP und Cytosol) gefolgt von einer raschen Fixierung bei 37°C und elektronenmikroskopischer Analyse der Präparation zeigte die

Aggregation mehrerer markierter Endosomen, sowie die Fusion dieser Kompartimente, was durch Kolokalisation unterschiedlich großer Goldpartikel nachgewiesen wurde. Durch die Fusion kam es zur Bildung größerer Kompartimente mit einem Durchmesser von etwa 600 - 1000 nm, zum Teil mit vesikulären Einschlüssen. Die Änderung der Größe der Vesikel konnte auch durch ihr Verhalten bei Differential-Zentrifugationen nachgewiesen werden. Bei einer Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation zeigten jedoch die fusionierten Endosomen die gleiche Dichte wie das Ausgangsmaterial (1,045 g/ml). Die Dichte-Erhöhung, die *in vivo* zu beobachten ist, wurde als durch den Versuchsansatz nicht rekonstituiert. Es konnte gezeigt werden, daß der Aggregationsschritt eine schnellere Kinetik als die Fusion aufweist, und im Gegensatz zu dieser auch in Abwesenheit von KCl ablaufen kann. Die Aggregation erforderte aber ebenso wie die Fusion die Gegenwart von ATP und Cytosol, sowie die Inkubation bei 37°C. Durch Kolokalisation von drei verschieden großen Goldpartikel in demselben Kompartiment konnte bewiesen werden, daß es auch zu Fusionen von mindestens drei Endosomen kommen kann, was als prinzipielle Fähigkeit zu multiplen Fusionen gedeutet wurde. Das Auftreten von Kompartimenten mit allen drei Markern erfolgte mit einer Verzögerung von etwa 10 min gegenüber der einfachen Fusion. Die Fähigkeit zur multiplen Fusion wurde auch dadurch gezeigt, daß die Zugabe einer größeren Menge unmarkierter Endosomen (mehr als doppelt so viel als markierte Endosomen) das Fusionssignal nur um 25% reduzierte.

Von Wessling-Resnick & Braell (1990 a) wurde auch der biochemische Nachweis für multiple Fusionsprozesse erbracht (mit Endosomen aus K562-Zellen), und zwar über die Bildung eines Dreifach-Komplexes, der durch ELISA quantifiziert wurde. Die dabei erzielten Ergebnisse führten zu dem Schluß, daß etwa 40 - 50% des Fusionssignales durch multiple Fusionen generiert werden.

Der Zusammenhang zwischen Dichte-Erhöhung der Endosomen und deren Fusionsfähigkeit wurde ebenfalls näher untersucht. Für J774- Makrophagen-Endosomen wurde gezeigt, daß die Dichte-Erhöhung der Endosomen *in vivo* mit einer Reduktion ihres Fusionssignals mit frühen Endosomen *in vitro* verbunden ist, daß die Dichte-Erhöhung aber nicht die Vermischung von frühen und späten endocytischen Kompartimenten *in vivo* verhindert. Eine Zeitspanne von 15 min zwischen den beiden Beladungen konnte die Mischung der beiden Reaktionspartner innerhalb von etwa 10 min in der intakten Zelle nicht beeinträchtigen. Während *in vivo* das Fusionsprodukt

hauptsächlich in dichten Endosomen gefunden wurde, konnte das Reaktionsprodukt der *in vitro* Fusion immer nur in leichten Kompartimenten detektiert werden (Diaz et al., 1991).

Ein interessantes zellbiologisches Phänomen ist die Beobachtung, daß vesikuläre Transportvorgänge von Säugetierzellen, darunter auch die Fusion von Endosomen, während der Mitose blockiert sind. Somit scheint die Fusionsfähigkeit von Endosomen nicht zeitlich konstant, sondern vom Zellzyklus abhängig zu sein. In Übereinstimmung mit diesem Postulat konnte eine Hemmung der *in vitro* Fusion früher Endosomen durch mitotisches Cytosol erzielt werden, und es konnte nachgewiesen werden, daß dieser Effekt von der Zellzyklus-abhängigen cdc2-Kinase in Verbindung mit Cyclin B verursacht wird (Tuomikoski et al., 1989; Thomas et al., 1992). Die Endosomenfusion könnte jedoch nicht nur durch einen Phosphorylierungsschritt während der Mitose gehemmt werden, sondern auch während der Interphase durch eine andere Kinase. So konnte z.B. bei A431-Zellen gezeigt werden, daß die Endosomenfusion durch Phosphatase-Inhibitoren, deren Wirkung unabhängig von cdc2-Kinase ist, gehemmt werden kann (Woodman et al., 1992). Die genaue Analyse der Bedeutung von Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsschritten wird jedoch dadurch erschwert, daß *in vivo* meist ein komplexes Gleichgewicht zwischen Phosphatasen und Kinasen herrscht, die selbst wiederum durch Phosphorylierung aktiviert oder inaktiviert werden können. So wurde z.B. von Pitt & Schwartz (1991) berichtet, daß die Fusion von HepG2-Endosomen durch den Phosphotyrosin-Phosphatase-Inhibitor Orthovanadat nicht gehemmt, sondern stimuliert wird. Eine potentielle Erklärung dafür ist, daß eine fusionshemmende Kinase durch eine Phosphorylierung in einem inaktiven Zustand gehalten wird, und ihre Aktivierung durch einen Phosphatase-Inhibitor verhindert wird. Durch die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen aktiver und inaktiver Kinase würde dann die Fusion stimuliert.

In der gleichen Arbeit (Pitt & Schwartz, 1991) wurde auch festgestellt, daß die Hemmung von Endoproteasen zu einer Inhibibierung der *in vitro* Fusion von Endosomen führen kann. Die beteiligte Protease dürfte jedoch nicht zu den Metallo-Endoproteasen zählen, denen eine Rolle für andere Transportvorgänge zugeschrieben wurde.

Neben den bereits angeführten Einflußfaktoren, wie Phosphorylierung oder proteolytische Prozessierung, die Fusionsproteine betreffen, wurde auch ein Einfluß von Lipiden auf die Fusion festgestellt.

Eine Hemmung der Phospholipase A2, deren Aktivität zur Freisetzung von Arachidonsäure und Lysophospholipiden führt, verursachte eine Hemmung der Endosomenfusion, die durch Zugabe von Arachidonsäure rückgängig gemacht werden konnte. Die Wirkung der Arachidonsäure könnte in der Begünstigung bestimmter intermediärer Zustände des Lipidbilayers liegen, andererseits aber auch in der Beeinflussung von Proteinen, oder in seiner Rolle als Vorstufe bioaktiver Verbindungen wie der Prostaglandine, Leukotriene oder Thromboxane (Mayorga et al., 1993 a).

#### **1. 4. 4. 3. Fusionen zwischen frühen Endosomen und rezyklisierenden Endosomen**

Fusionsprozesse zwischen frühen Endosomen und rezyklisierenden Endosomen wurden nicht bis ins Detail untersucht. Einige Fusionstests im Bereich früher endocytischer Kompartimente wurden jedoch mit Transferrin durchgeführt, das nicht nur frühe Endosomen markiert, sondern auch als Marker für den rezyklisierenden Transportweg angesehen werden kann. Eine *in vitro* Inkubation von Biotin-Transferrin markierten frühen Endosomen (PNS, 37°C + ATP) vor einem Fusionstest mit Avidin-markierten frühen Endosomen führte zu einer deutlichen Reduktion des Fusionsignales (Wessling-Resnick & Braell, 1990 a). Dies könnte auf eine Segregation des Transferrins in rezyklisierende Endosomen und eine geringere Fusionsfähigkeit dieser Endosomen mit frühen Endosomen zurückzuführen sein. Eine andere Arbeitsgruppe berichtete jedoch, daß ein Transferrin-Marker auch bei längeren Inkubationen *in vivo* in einem Kompartiment bleibt, das mit frühen Endosomen fusionieren kann, während ein Marker, der den lysosomalen Weg durchläuft, zunehmend an Fusionsfähigkeit verliert (Diaz et al., 1991). Ein Testsystem, das die Zugänglichkeit FITC-Transferrin enthaltender CHO-Endosomen für einen endocytierten Anti-FITC-Antikörper mißt, zeigte eine rasche Abnahme der Fusionsfähigkeit mit einer Halbwertszeit von weniger als 3 min, danach jedoch eine konstante Fusionsfähigkeit für 10 min, was darauf hindeutet, daß rezyklisierende Endosomen mit frühen Endosomen fusionieren können, allerdings mit geringerer Effizienz (Salzman & Maxfield, 1989). Diese Beobachtung ist in Einklang mit der These, daß regulative Mechanismen existieren müssen, die eine Fusion zwischen rezyklisierenden Endosomen und frühen Endosomen limitieren, da sonst die Sortierungsfunktion früher Endosomen beeinträchtigt würde.

#### **1. 4. 4. 4. Fusionseigenschaften potentieller Träger-Vesikel zwischen frühen und späten Endosomen**

Nach dem "Vesicle-Shuttle Model" (siehe 1. 2. 5. 1.) wird angenommen, daß Träger-Vesikel (Carrier-Vesikel) den Transport zwischen frühen und späten Endosomen übernehmen. Diese Carrier-Vesikel werden durch Inkubation in Gegenwart des Mikrotubuli-depolymerisierenden Agens Nocodazol beladen, da der Transport aus den frühen Endosomen heraus nicht Mikrotubuli-abhängig ist, dafür jedoch scheinbar der Transport der dabei entstehenden Vesikel zwischen den frühen und den späten Endosomen. Alle Interpretationen von Ergebnissen, die mit solcherart markierten Vesikel erzielt wurden, müßten jedoch in Betracht ziehen, daß die Akkumulierung jener Vesikel bei einer Inkubation in Gegenwart von Nocodazol möglicherweise einen unphysiologischen Zustand reflektiert.

Es wurde jedenfalls beschrieben, daß Carrier-Vesikel aus BHK-Zellen kaum mit frühen Endosomen fusionieren und auch untereinander keine deutliche Fusionsfähigkeit aufweisen (Gruenberg et al., 1989; Aniento et al., 1993). Mit späten Endosomen konnte hingegen eindeutig ein ATP-abhängiges Fusionsignal detektiert werden. Dieses Signal wurde in Gegenwart polymerisierter Mikrotubuli etwa auf den doppelten Wert erhöht, wodurch eine Fusionseffizienz erzielt wurde, die vergleichbar war mit jener früher Endosomen untereinander. Späte Endosomen waren in diesem System ebenfalls in der Lage, untereinander zu fusionieren. Dieser Fusionsprozeß war aber unabhängig von Mikrotubuli. Die Fusion der Carrier-Vesikel mit späten Endosomen war in Gegenwart von Mikrotubuli nicht nur effizienter, sie wies auch eine schnellere Kinetik auf. Dieser Befund ist möglicherweise dadurch erklärbar, daß eine dreidimensionale "Suche" von Fusionspartnern durch Mikrotubuli-Assoziation zu einer eindimensionalen Suche reduziert wird. Es konnte in der Folge gezeigt werden, daß die Mikrotubuli-stimulierte *in vitro* Fusion zwischen späten Endosomen und Träger-Vesikeln von cytoplasmatischem Dynein abhängig ist, einem Mikrotubuli-assoziierten Motor-Protein, das Transportvorgänge in Richtung des Minus-Endes von Mikrotubuli unterstützt. Diese Beobachtung ist gut mit den Verhältnissen in der intakten Zelle in Übereinstimmung, da die endocytischen Transportvorgänge in der Zelle zum Minus-Ende der Mikrotubuli (dem Mikrotubuli-organisierendem Zentrum) hin ablaufen (Aniento et al., 1993).



Es konnte jedoch festgestellt werden, daß die Bindung der Träger-Vesikel an Mikrotubuli *in vitro* nicht von Dynein abhängig ist, sondern von anderen cytosolischen Proteinen, die nicht durch NEM inaktiviert werden können. Zusätzlich zu diesen Proteinen waren jedoch auch Membran-Proteine der Vesikel für die Bindung notwendig. Der Vorgang der Vesikelbindung konnte durch GTP und ATP unterdrückt werden (Scheel & Kreis, 1991). In der Folge wurde die Rolle eines Nukleotid-sensitiven cytosolischen Proteins mit etwa 170 kDa (aus HeLa-Zellen) untersucht, und es konnte gezeigt werden, daß dieses Protein für die Bindung von Carrier-Vesikel an Mikrotubuli *in vitro* essentiell ist. Das Protein, das als "Cytoplasmic Linker Protein (CLIP-170)" bezeichnet wurde, kolokalisiert mit endocytischen Kompartimenten. Es konnte durch Sequenzierung charakterisiert werden, wobei im N-terminalen Bereich eine bis dato noch unbekannte Mikrotubuli-bindende Sequenz identifiziert wurde (Pierre et al., 1992).

#### **1. 4. 4. 5. Fusionen zwischen apikal und basolateral markierten Endosomen polarisierter Zellen**

In polarisierten Zelllinien wie etwa MDCK-Zellen ist der endocytische Apparat von der basolateralen und der apikalen Seite her zugänglich. Folglich existieren frühe basolaterale und frühe apikale Endosomen. *In vitro* Fusionstests haben ergeben, daß die frühen Endosomen einer Seite untereinander fusionieren können, nicht jedoch mit den frühen Endosomen des anderen Zellpols. Basolaterale und apikale Träger-Vesikel wurden durch Endocytose der Marker auf der entsprechenden Seite in Gegenwart von Nocodazol beladen. Eine *in vitro* Vermischung des Inhalts basolateraler Carrier-Vesikel mit jenem von apikalen Carrier-Vesikel erfolgte nur in Gegenwart polymerisierter Mikrotubuli über späte Endosomen als Zwischenstufe; apikal beladene späte Endosomen konnten jedoch in Abwesenheit intakter Mikrotubuli mit basolateral beladenen späten Endosomen zur Fusion gebracht werden, da sich in diesem Bereich die beiden Endocytose-Wege offensichtlich vereinen. Die nähere Analyse der Mikrotubuli-abhängigen Interaktion zwischen apikalen und basolateralen Träger-Vesikel zeigte auf, daß diese die Anwesenheit der Mikrotubuli-assoziierten Motor-Proteine Dynein und Kinesin erfordert, und daß sich die Markierungssubstanzen in späten Endosomen treffen (Bomsel et al., 1990).

Kinesin ist ein Motor-Protein, das Bewegungsprozesse in Richtung des Plus-Endes von Mikrotubuli unterstützt, also in die entgegengesetzte Richtung wie Dynein. Da bei der zellulären Organisation polarisierter MDCK-Zellen Mikrotubuli longitudinal zur Längsachse der Zellen ausgerichtet sind (mit dem Plus-Ende zum basolateralen Zellpol), ist die Beteiligung beider Motor-Proteine durchaus plausibel.

#### **1. 4. 4. 6. Interaktionen zwischen späten Endosomen und Lysosomen**

Nach dem "Vesicle Shuttle Model" der Endocytose erfordert der Transport endocytierter Verbindungen zu den Lysosomen die Fusion von späten Endosomen oder von Träger-Vesikel, die aus diesen hervorgehen, mit den Lysosomen, während nach dem Maturationsmodell späte Endosomen die Eigenschaften von Lysosomen annehmen (Hubbard, 1989). Die Frage, welches der beiden Modelle zutrifft, ist noch nicht geklärt und möglicherweise auch vom Zelltyp oder dem Differenzierungsstadium abhängig. Nachdem auch das Maturationsmodell Fusionsvorgänge inkludiert, die für den Zugang neu synthetisierter lysosomaler Enzyme zu den endocytischen Kompartimenten notwendig sind, können die Grenzen zwischen den beiden Modellen nicht klar definiert werden. Unter den entsprechenden Bedingungen könnte ein Modell funktionell auch durchaus in das andere Modell übergehen (Murphy, 1993), womit sich die Fragestellung zu einem semantischen Problem reduzieren würde.


Die Interaktion zwischen Endosomen und Lysosomen aus Rattenleber wurde durch einen indirekten experimentellen Ansatz genauer untersucht, bei dem die Dichte-Verschiebung endosomaler Marker zur lysosomalen Dichte gemessen wurde. Dabei wurden Endosomen (frühe und späte) mit radioaktivem Asialofetuin beladen und in Gegenwart von Cytosol, ATP und gereinigten Lysosomen bei 37°C inkubiert. Die resultierende Dichte-Erhöhung der markierten Kompartimente konnte nicht durch NEM gehemmt werden, erforderte jedoch die Anwesenheit von Lysosomen und wurde deshalb einer Fusion der Endosomen mit Lysosomen zugeschrieben (Mullock et al., 1989). Der Versuchsansatz wurde jedoch in Abwesenheit signifikanter Mengen monovalenter Ionen (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) durchgeführt, die nach den Befunden anderer Arbeitsgruppen für eine Dichte-Erhöhung von Endosomen in Abwesenheit von Lysosomen notwendig sind (Roederer et al., 1990; Murphy et al., 1993). Nachdem in den Experimenten von Mullock et al. (1989)

polymeres IgA, das bis zu frühen Endosomen gemeinsam mit Asialofetuin transportiert wird und danach in den Transcytose-Weg ausgeschleust wird, keine vollständige Dichte-Verschiebung erfährt, wurde der Schluß gezogen, daß nur späte Endosomen mit Lysosomen fusionieren können. Diese indirekte Schlußfolgerung kann jedoch nicht als zwingend angesehen werden, da polymeres IgA als Transcytose-Marker nach der unspezifischen Beladung endocytischer Kompartimente (10 min bei 37°C *in situ*) sich zum Teil bereits in transcytotischen Endosomen befindet, und keine klare Auskunft über das Verhalten früher Endosomen geben kann. Der direkte Nachweis, daß frühe Endosomen nicht mit Lysosomen fusionieren können (z.B. über spezifische Beladung früher Endosomen mit Asialofetuin), wurde nicht erbracht. Die *in vitro* Dichte-Verschiebung erfolgte erst ab etwa 30°C, einer Temperatur, die höher ist als die für Endosomen-Fusionen notwendige Temperatur. *In vivo* ist der Transport zu Lysosomen jedoch erst unterhalb von 20°C blockiert (Tomoda et al., 1989; Braulke et al., 1988). In weiterer Folge wurde versucht die Fusion zwischen Endosomen und Lysosomen auch über eine Methode, die die Verschmelzung der Membranen detektiert, nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden gereinigte späte Endosomen mit Octadecylrhodamin B beladen, einem fluoreszierenden hydrophoben Kohlenwasserstoff, der unspezifisch in höherer Konzentration in Membranen interkaliert, wodurch die Fluoreszenz verringert wird.

Eine Fusion dieser Endosomen mit anderen Membranen führt zu einer Verdünnung des Fluorophors im Lipidbilayer und dadurch zu einer Zunahme der Fluoreszenz. Mit dieser Methode wurde gezeigt, daß es in Abhängigkeit von der zugesetzten Lysosomen-Menge zu einer linearen Fluoreszenz-Zunahme während der gesamten Inkubationsdauer von 60 min kommt, was als Fusion zwischen Endosomen und Lysosomen interpretiert wurde (Mullock & Luzio, 1992).

Die Reaktion wurde jedoch in Abwesenheit von Cytosol durchgeführt, da dieses allein (möglicherweise durch Fettsäure-Bindungsproteine und Phospholipid-Transfer-Proteine) zu einer Fluoreszenz-Zunahme führte. Aufgrund der Beobachtung von Mullock & Luzio (1992), daß beim Dichte-Verschiebungsexperiment auch in Abwesenheit von Cytosol nahezu 50% des endosomalen Markers zur lysosomalen Position wandern, wurde postuliert, daß die Endosomen-Lysosomen-Fusion zum Teil Cytosol-unabhängig ist, wodurch der Fluoreszenztest in Abwesenheit von Cytosol gerechtfertigt erschien. Es ist jedoch festzustellen, daß alle anderen bisher beschriebenen Fusionsvorgänge die Anwesenheit cytosolischer Faktoren erforderten. Die

mit dem Fluoreszenztest ermittelte lineare Fusionskinetik bis zur maximalen Inkubationsdauer von 60 min ist ebenfalls nicht in Einklang mit der Fusionskinetik von Endosomen-fusionen, bei denen eine Plateauphase meistens nach rund 30 min auftritt. Eine weitere Schwachstelle des Fluoreszenztests ist die Tatsache, daß die Inkorporation des Fluorophors in die Membran unspezifisch ist, und somit eine überaus hohe Reinheit der Membran-Präparationen eine Voraussetzung für klare Aussagen ist. Diese Reinheit kann jedoch kaum erreicht werden, da z.B. eine völlige Trennung früher und später Endosomen in der Praxis kaum möglich ist. Die von Mullock & Luzio beschriebene Präparation dichter Endosomen war zwar etwa 50-fach angereichert im Hinblick auf den Proteingehalt des Homogenats, jedoch nur etwa 7-fach bezogen auf ein Marker-Enzym des endoplasmatischen Retikulums.

Mit Hilfe des Fluoreszenztests wurde auch beschrieben, daß ein 22 kDa-Protein der Lysosomen-Präparation, das durch NEM inaktiviert wird und kein GTP-bindendes Protein darstellt, für die Fluoreszenz-Zunahme essentiell ist. Daraus wurde abgeleitet, daß dieses Protein in der Lage ist die Endosomen-Lysosomen-Fusion zu induzieren. Die Sequenzierung der 20 N-terminalen Aminosäuren zeigte eine hohe Homologie zu einem GM2-Aktivator, einem Protein, das beim lysosomalen Abbau von Gangliosiden beteiligt ist. Aufgrund der Tatsache, daß dieses Protein auch Glykolipide von einem Liposom auf ein anderes übertragen kann, ist es jedoch auch möglich, daß es im Fluoreszenztest nicht fusogen wirkt, sondern einfach als Lipid-Überträger (Kuwana et al., 1993). 

Die gleiche Arbeitsgruppe entwickelte auch einen Fusionstest, bei dem die Vermischung der Kompartiment-Inhalt als Meßprinzip herangezogen wurde. Dazu wurden späte Endosomen mit Avidin-konjugiertem Asialofetuin beladen und Lysosomen mit biotinyliertem polymerem IgA, das zu einem gewissen Prozentsatz nicht nur den Transcytose-Weg durchläuft, sondern auch zu den Lysosomen transportiert wird. Mit diesen beiden Markern wurde gezeigt, daß die Endosomen-Lysosomen-Fusion ATP- und Cytosol-abhängig ist. Im Gegensatz zu der ursprünglich beschriebenen NEM-Insensitivität der Interaktion zwischen Endosomen und Lysosomen, konnte eine klare Hemmbarkeit durch NEM festgestellt werden. Dabei wurden die Membranen NEM behandelt; die NEM-empfindlichen Proteine dürften jedoch nicht ausschließlich Membran-assoziiert sein, da die für eine Hemmung notwendige Konzentration an NEM davon abhängig war, ob das eingesetzte Cytosol aktiven NEM-sensitiven Faktor enthielt. Das Testsystem,

bei dem die Endosomen-Lysosomenfusion durch eine Mischung der Kompartiment-Inhalte detektiert wurde, zeigte kein Signal in Abwesenheit von Cytosol und scheint somit das sicherste Testsystem zur Untersuchung dieses Fusionsvorganges zu sein (Mullock et al., 1994).

#### **1. 4. 4. 7. Interaktionen zwischen Lysosomen**

Nach der Fusion intakter CHO-Zellen mit unterschiedlich markierten Lysosomen kann es *in vivo* zu einer effizienten Vermischung von Lysosomen-Inhalten kommen, die jedoch bei 17°C unterdrückt wird (Ferris et al., 1987). Ebenso wurde ein rascher Austausch lysosomaler Membran-Proteine dokumentiert, der nach der Bildung eines Syncytiums aus Maus- und Ratten-Zellen mit einer Halbwertszeit von 30 min auftritt (Deng et al., 1991).

Eine *in vitro* Fusion von Lysosomen untereinander wurde hingegen bisher noch nicht beschrieben. Bei Endosomen-Fusionstests wurde sogar durch indirekte Befunde gezeigt, daß es unter den für Endosomen notwendigen Fusionsbedingungen zu keiner Fusion der Lysosomen kommt. Dies könnte bedeuten, daß Lysosomen *in vivo* möglicherweise nicht direkt miteinander fusionieren, sondern über Endosomen als Zwischenstufen miteinander interagieren, oder auch, daß andere Bedingungen, als die bei der Endosomenfusion eingesetzten, notwendig sind, um die Lysosomenfusion *in vitro* rekonstituieren zu können.

#### **1. 4. 4. 8. Fusion zwischen transcytotischen Vesikeln und apikaler Plasmamembran**

Die Fusion transcytotischer Vesikel mit der Plasmamembran wurde im Hepatocyten-System untersucht. Als fusionsabhängige Reaktion wurde die proteolytische Spaltung des pIgA-Rezeptors von der transcytotischen Form mit 120 kDa in die sekretorische Komponente mit 80 kDa gemessen. Die Spaltung kann nur erfolgen, wenn transcytotische Vesikel mit apikaler Plasmamembran fusionieren, da nur diese die dafür notwendige Protease enthält. Mit diesem System konnte gezeigt werden, daß der entsprechende Fusionsprozeß, wie die meisten anderen untersuchten Fusionsvorgänge die Anwesenheit von ATP und Cytosol, sowie Inkubation bei erhöhter Temperatur erfordert, und durch NEM gehemmt werden kann. Auch eine Inkubation des Versuchsansatzes mit Anti-NSF-Antikörper führte zu einer

Fusionshemmung. In weiterer Folge konnte ein 108 kDa-Protein detektiert werden, das mit transcytotischen Vesikeln assoziiert ist und für die Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran notwendig ist (Sztul, 1992; Sztul et al., 1993).

## **1. 5. DIE LEBER ALS MODELLSYSTEM**

### **1. 5. 1. ALLGEMEINER AUFBAU DER LEBER**

Die Leber ist ein wesentliches Organ aller Säugetiere. Sie ist in mehrere Lappen unterteilt, die von den Ästen der Pfortader und der Arteria hepatica durchblutet werden. 75% des Durchflußvolumens stammen von der Pfortader (Vena porta), die direkt vom Verdauungstrakt kommt, und somit reich an Nährstoffen ist. Die Arteria hepatica ist reich an Sauerstoff und garantiert dadurch die O<sub>2</sub>-Versorgung der Leberzellen. Der Abfluß des Blutes erfolgt (nach Verästelung der versorgenden Gefäße) zuerst über kleine Venen, die wieder zusammenlaufen und schließlich in die Hohlvene (Vena cava inferior) führen.

Zur Charakterisierung der funktionellen Morphologie wurde der Begriff eines Leber-Acinus definiert, der eine mikrovaskuläre Einheit des Leberparenchyms darstellt. Diese Funktionseinheit ist jener Gewebeteil der dreidimensional um einen terminalen Pfortader-Ast angeordnet ist, und zwischen zwei oder mehreren terminalen hepatischen Venen (Venae centrales) liegt, die das durchströmende Blut wieder aufnehmen. Das Parenchym zwischen dem Pfortader-Ast und einer terminalen Vene wird sequentiell in einer Richtung perfundiert, wodurch es zur Ausbildung von Gradienten für die verschiedensten Inhaltsstoffe des Blutes, die durch Hepatocyten aufgenommen oder abgegeben werden, kommt. Um dieses Faktum zu beschreiben, wird der Zwischenraum in drei funktionelle Zonen aufgeteilt (siehe Abb. 1. 11.).

Die Gallesekretion erfolgt an den Canaliculi zwischen den Hepatocyten. Diese kleinen Gallengangskanälchen werden wiederum in Ductuli zusammengefaßt, die gemeinsam mit Zweigen der Arteria hepatica und der Vena porta, den Arteriae interlobulares, sowie Venae interlobulares, sogenannte Lebertrias bilden.

Von den Ductuli fließt die Galle in kleinere und größere Gallenkanäle, die schließlich in einen gemeinsamen Gallengang führen. Beim Menschen kann, im Gegensatz zur Ratte, die Galle in einer Gallenblase gespeichert und auch eingedickt werden.

Abb. 1. 11.

Struktur eines Leber-Acinus: Die Zahlen 1, 2 und 3 und die entsprechenden Linien geben die Zonen des Acinus an; die Buchstaben A, B und C deuten den periportalen, den intermediären und den peripheren Bereich an.

P.S.: terminaler Pfortader-Ast (portal space)

T.H.V.: terminale hepatische Vene

(nach: Jones, in "Hepatology. A textbook of liver disease", ed. by Zakim & Boyer; W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA, 1982; S 9).

## **1. 5. 2. ZELLTYPEN DER LEBER**

### **1. 5. 2. 1. Hepatocyten**

Hepatocyten oder Leber-Parenchymzellen machen etwa 80% des Lebertolumens aus.

Als polarisierte Zellen verfügen sie über eine basolaterale (sinusoidale) und eine apikale (canaliculäre) Membran, wobei diese beiden Domänen der Zelloberfläche durch "Tight Junctions" voneinander getrennt sind, die den Austausch von Membranlipiden und Proteinen verhindern. Die sinusoidale Membran ist für die Aufnahme von Verbindungen aus dem Blut spezialisiert, sie verfügt deshalb auch über eine Vielzahl von Clathrin-umhüllten Membraneinstülpungen, über die Rezeptor-Liganden-Komplexe aufgenommen werden können.

Die laterale Domäne ist für den Kontakt zu Nachbarzellen und die interzelluläre Kommunikation verantwortlich und weist aus diesem Grund Struktur-Komponenten wie Desmosomen und sogenannte "Gap Junctions" auf. Desmosomen (Gürtel- und Knopfesmosomen) verleihen dem zellulären Komplex die nötige Stabilität; Gap Junctions sind Protein-Poren aus je sechs Untereinheiten, die die Übertragung von kleinen Molekülen (<1 kDa), und Ionen zwischen den Zellen erlauben, und somit eine elektrophysiologische Brücke darstellen. Diese Zellverbindungen sind in Abb. 1. 12. dargestellt.

Die apikale Membran ist für die Gallesekretion verantwortlich, und verfügt deshalb über verschiedene spezifische Transportproteine.

Neu synthetisierte apikale Membranproteine werden bei Hepatocyten nicht direkt vom TGN aus zur apikalen Zelloberfläche transportiert (wie bei MDCK-Zellen), sondern zuerst zur basolateralen Membran, von wo aus sie über transcytotische Endosomen zur apikalen Membran gelangen (Bartles et al., 1987).

Ein Schema der wichtigsten Endocytose- und Transcytose-Wege, die in Hepatocyten vorkommen, ist in Abb. 1. 13. dargestellt.



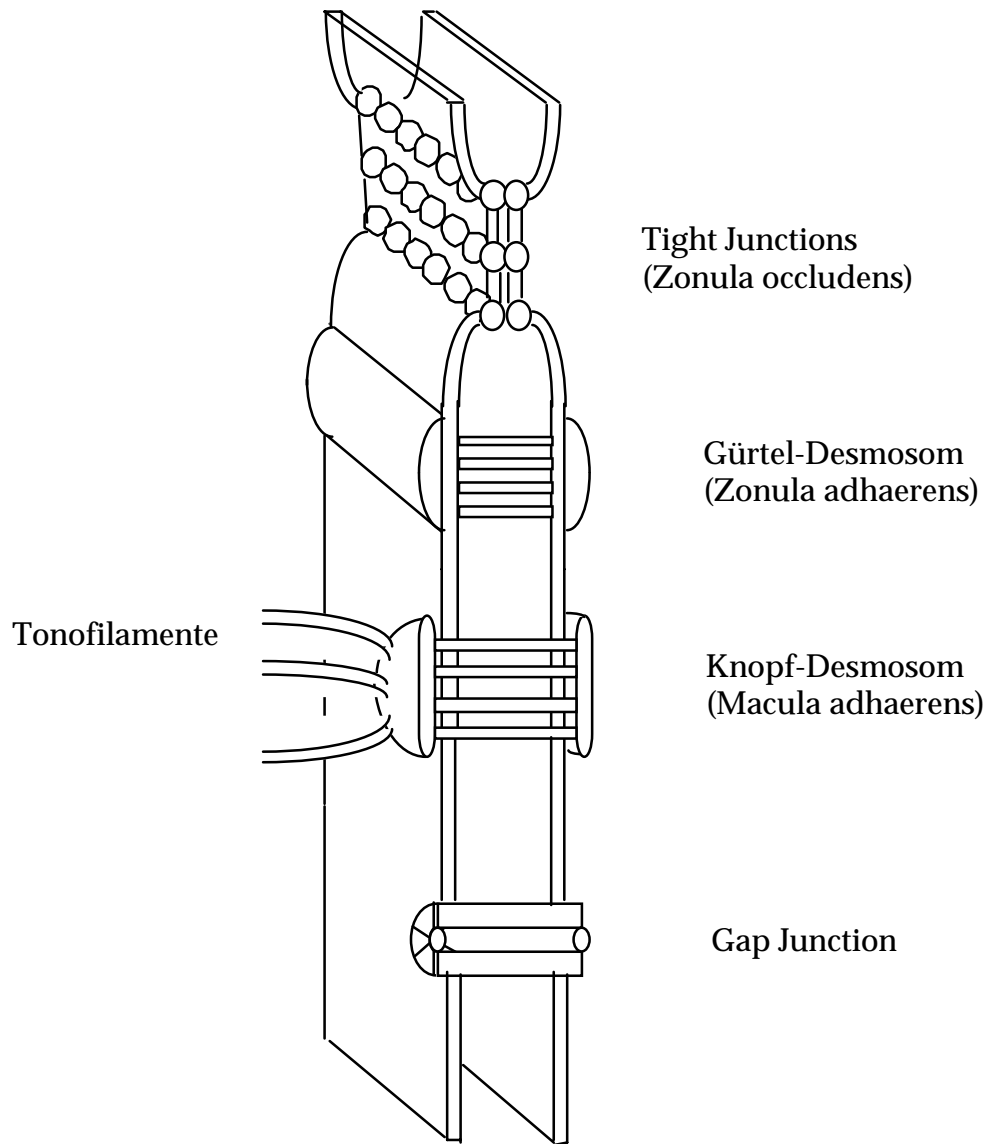


Abb. 1. 12.

Zellverbindungen polarisierter Zellen (nach De Duve, 1986)

Abb. 1. 13.

Endocytose- und Transcytose-Wege in Hepatocyten. Dargestellt ist die Internalisierung und der intrazelluläre Transport von polymerem IgA und Asialoglykoproteinen, sowie die Clathrin-unabhängige Internalisierung.

### **1. 5. 2. 2. Endothelzellen**

Endothelzellen liegen unmittelbar an den Gefäßwänden über den Hepatocyten, wobei sie ein fenestriertes Endothel mit Poren von 100 - 150 nm Durchmesser bilden. Fenestrae sind dynamische Strukturen, deren Öffnungsweite auch durch vasoaktive Verbindungen, Toxine oder auch durch den Blutdruck verändert werden kann. Dadurch kann der Transport größerer Komplexe, wie etwa der Chylomikronen-Reste reguliert werden, wobei der Austausch von Proteinen und anderer kleinerer Verbindungen nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Zwischen den Endothelzellen und den Hepatocyten liegt der Disse'sche Raum. Auch wenn durch die Fenestrae eine freie Diffusion zwischen dem sinusoidalen Raum und dem Disse'schen Raum gewährleistet ist, könnten jedoch Gradienten für verschiedene Parameter auftreten, vor allem weil keine dynamische Durchmischung der beiden Bereiche existiert (Prinzip eines "Unstirred Layers").

### **1. 5. 2. 3. Kupfferzellen**

Kupfferzellen sind Makrophagen, die sich auf die lumenale Seite des Endothels an Fenestrae anheften. Sie sind meistens in der Zone 1 des Acinus anzutreffen; ihre wesentlichste Aufgabe ist die Immunabwehr innerhalb der Leber. Sie sind endocytisch sehr aktiv und verfügen über verschiedene Rezeptoren zur Aufnahme von Verbindungen (Mannose-Rezeptor, Galaktose-, Particle-Rezeptor,...).

### **1. 5. 2. 4. Ito-Zellen**

Ito-Zellen sind fettspeichernde Zellen, die sich im Disse'schen Raum befinden. Sie enthalten Fetttröpfchen und stellen auch einen Vitamin A-Speicher dar.

### **1. 5. 2. 5. Pit-Zellen (granuläre Lymphocyten)**

Diese Zellen sind in engen Kontakt mit Endothel- und Kupfferzellen, verfügen über cytotoxische Fähigkeiten, und üben deshalb Funktionen bei Immunreaktionen in der Leber aus.

Die beschriebenen fünf wesentlichen Zellarten der Leber sind in Abb. 1. 13. wiedergegeben.

Abb. 1.13.

Die fünf wesentlichen Zelltypen der Leber (nach Ramadori et al., 1993).

### **1. 5. 3. FUNKTIONEN DER LEBER**

### **1. 5. 3. 1. Metabolische Funktionen**

Ein großer Teil der metabolischen Prozesse des Körpers läuft in der Leber ab. Im Kohlenhydratmetabolismus hat die Leber vor allem die Aufgabe den Blutglukose-Spiegel konstant zu halten. Dies wird durch Speicherung der Glukose in Form von Glykogen erzielt, bzw. durch den Abbau dieser Speicher. Zusätzlich kann die Leber Glukose aus Laktat oder Alanin synthetisieren (Glukoneogenese). Eine weitere wesentliche Funktion liegt im Fettstoffwechsel. Die Leber ist in der Lage Fettsäuren, Phosphatide und Neutralfette zu synthetisieren, die in Form von Lipoproteinen (Very Low Density Lipoproteins, VLDL) in den Blutkreislauf abgegeben werden. Ebenso kann sie überschüssige Fettsäuren aufnehmen.

Im Hungerstoffwechsel übernimmt die Leber die Aufgabe Acetacetat zu synthetisieren, das die Funktion der Glukose einnehmen kann. Die Leber ist auch der Hauptort der Cholesterin-Biosynthese. Dieses wird einerseits über Lipoproteine in den Blutkreislauf abgegeben, andererseits auch mit der Galle ausgeschieden. Über das Cholesterin erfolgt auch die Synthese von Vitamin D<sub>3</sub>-Vorstufen, sowie die Bildung von Gallensäuren. Der Abbau von Steroidhormonen wird ebenso von der Leber durchgeführt, wie wesentliche Entgiftungsfunktionen. Dabei werden meistens OH- oder COOH-Gruppen enzymatisch an die zu entfernenden Verbindungen angefügt und diese danach mit Glukuronsäure, Sulfat, Acetat oder auch Aminosäuren gekoppelt. Solcherart veränderte Verbindungen können durch aktive Transportsysteme in die Galle ausgeschieden werden. Beim Abbau von Erythrocyten entsteht aus der Hämgruppe des Hämoglobins über Zwischenstufen Bilirubin, das ebenfalls durch die Leber ausgeschieden wird (Karlson, 1984; Silbernagl & Despopoulos, 1983).

### **1. 5. 3. 2. Die biliäre Sekretion**

Die Galleproduktion beträgt beim Menschen ca. 0,7 l/Tag. Die Bestandteile der Galle sind neben Wasser und Elektrolyten vor allem Gallensäuren, Cholesterin, Lezithin, Bilirubin und Steroidhormone.

Bei den Gallensäuren unterscheidet man zwischen den primären Gallensäuren, die direkt in der Leber synthetisiert werden (z.B. Cholsäure),

den sekundären die durch die Darmflora gebildet werden (z.B. Desoxycholsäure), sowie den konjugierten Gallensalzen, die durch Rückresorption in die Leber und Konjugation mit Taurin, Glyzin oder anderen Verbindungen entstehen. Ein großer Teil der Gallensäuren wird wieder rückresorbiert und erneut zur Gallesekretion verwendet. Dadurch wird der enterohepatische Kreislauf zwischen Leber, Galle, Darmtrakt und Pfortader gebildet, den die Gallensäuren etwa viermal pro Tag durchlaufen können. Die wesentlichste Funktion der Gallensäuren ist die Emulgierung der Nahrungsfette, die für deren Resorption notwendig ist (Silbernagl & Despopoulos, 1983).

Der Mechanismus der Gallensekretion ist komplex und inkludiert den transzellulären Transport kleiner Moleküle (aktiv oder passiv), einen vesikulären transzellulären Transport (Transcytose), sowie einen parazellulären Weg.

Die Aufnahme kleinerer Moleküle an der basolateralen Membran wird in vielen Fällen über den elektrochemischen Gradienten, der durch eine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufgebaut und aufrechterhalten wird, angetrieben, und läuft über Transportproteine, die z.B. Gallensäuren und  $\text{Na}^+$  in einem Kotransport durch die Membran schleusen. Diese Verbindungen können nach Diffusion durch die Zelle an der canaliculären Membran wiederum durch Transportproteine in den Gallengang sezerniert werden. Zu diesen Transportproteinen zählen vor allem ein aktiver Gallensäuren-Carrier, ein unspezifischer Anionen-Transporter (Multiple Organic Anion Transporter, MOAT), sowie das P-Glykoprotein, das organische Kationen transportieren kann. Durch den aktiven Transport verschiedener Verbindungen wird auch ein osmotisch bedingter Gallefluß induziert. Das Prinzip des transzellulären Transports kleinerer Moleküle, sowie der parazelluläre Transport sind in der Abb. 1. 14. dargestellt (Meier, 1993).

#### Abb. 1. 14.

Transportsysteme, die für die Gallesekretion wesentlich sind.  
(nach Boyer et al., 1992)

Es wird geschätzt, daß der Anteil des Galleflusses, der auf einen vesikulären Transport zurückgeführt werden kann, nicht mehr als 10% ausmacht. Dieser Weg ist jedoch für die Gesamtheit an Makromolekülen (>1800 Da) in der Galle verantwortlich. Der Mechanismus dieses Prozesses, die Transcytose, ist unter Punkt 1. 3. erklärt.

#### **1. 5. 3. 3. Endocytose und Abbau von Asialoglykoproteinen**

Asialoglykoproteine können aus Glykoproteinen mit komplexen N-Glykan-Seitenketten im Verlauf der Alterung dieser Proteine entstehen. Dabei gehen terminale Sialinsäure-Reste verloren, wodurch Galaktose-Reste exponiert werden. Die Leber verfügt über einen sehr effizienten Mechanismus, diese Asialoglykoproteine aus dem Blutkreislauf zu entfernen, und zwar über die Rezeptor-vermittelte Endocytose und den Abbau in Lysosomen.

Der Asialoglykoprotein-Rezeptor wird in hoher Dichte in die Zelloberfläche der Hepatocyten eingebaut; die Affinitätskonstante gegenüber Glykoproteinen mit terminalen Galaktose-Resten beträgt etwa  $10^8 - 10^9$ . Verbindungen mit der höchsten Affinität zum Rezeptor haben eine triantennäre Struktur (3 terminale Galaktose-Reste). Der Rezeptor weist eine hetero-oligomere Struktur aus zwei unterschiedlichen Proteinen auf (H1 und H2), die beide nur eine transmembrane Sequenz haben. Eine wahrscheinliche Zusammensetzung des Oligomers ist ein "Kern" aus drei Einheiten des H1-Typs, der von zwei flankierenden Einheiten des H2-Typs umgeben ist (Lodish, 1991).

Die H1-Einheit enthält auf der cytoplasmatischen Domäne alle für die Endocytose essentiellen Signale (Geffen et al., 1989).

Die Endocytose und intrazelluläre Prozessierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes erfolgt wie unter 1. 2. 2. 1. 1. und den folgenden Punkten allgemein beschrieben ist.

### **1. 5. 3. 4. Transcytose von polymerem IgA**

IgA ist ein bedeutendes sekretorisches Immunglobulin, das sich aus schweren Ketten des  $\alpha$ -Typs und leichten Ketten des  $\lambda$ - oder  $\kappa$ -Typs zusammensetzt, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die monomeren Einheiten bilden in Gegenwart einer Verbindungskette ("joining = J-chain") Dimere und Polymere (Kerr, 1990).

Diese IgA-Komplexe binden spezifisch an Rezeptoren (pIgA-Rezeptoren). Der pIgA-Rezeptor aus Kaninchen hat eine große extracytoplasmatische Domäne (645 Aminosäuren), die fünf Immunglobulin-ähnliche Sequenzen und zwei N-Glykosylierungsstellen aufweist; er ist durch eine einzelne transmembrane Sequenz aus 23 Aminosäuren in der Membran verankert und verfügt über eine cytoplasmatische Domäne aus 103 Aminosäuren (Mostov et al., 1984).

In der Rattenleber entsteht der Rezeptor durch Synthese am rauhen ER und kotranslationale N-Glykosylierung als Endoglykosidase H-sensitive 105 kDa-Form. Im Golgi-Apparat erfolgt eine Umwandlung in eine 116 kDa-Form (Endoglykosidase H-resistent), im TGN oder nach Transport zur Cytoplasmamembran wird der Rezeptor durch Phosphorylierung von Serin-Resten in eine 120 kDa-Form umgewandelt (Sztul et al., 1985; Larkin et al., 1986); eine höher phosphorylierte Form (124 kDa) ist vor allem unter cholestatischen



Bedingungen detektierbar (Larkin & Palade, 1991), tritt jedoch auch unter normalen Bedingungen auf (Stefaner, 1994). Die Halblebenszeit des pIgA-Rezeptors beträgt etwa 1,1 h und ist damit deutlich kürzer als jene von Plasmamembran-Proteinen, die im Bereich von 4 - 9 Tagen liegt (Scott & Hubbard, 1992).

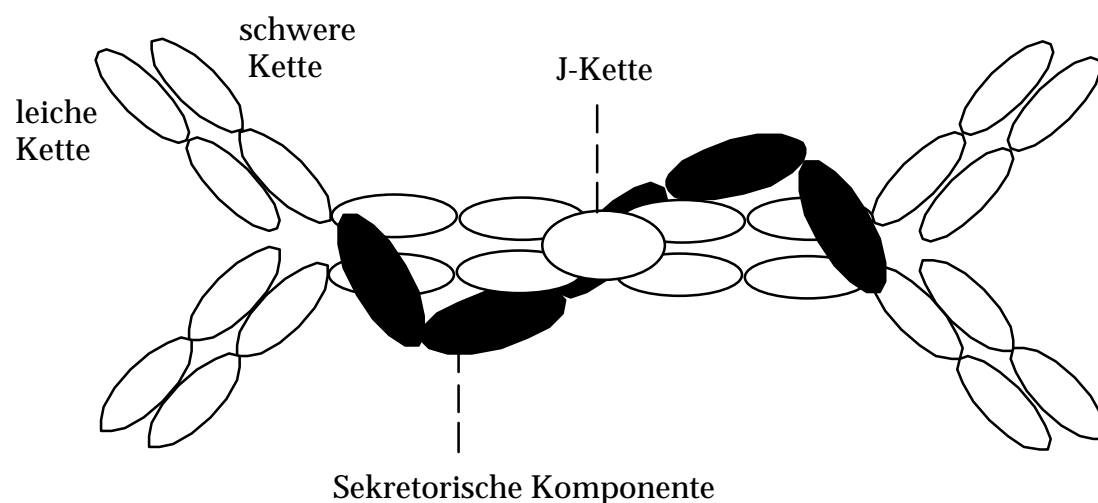
Nach Auftreten des Rezeptors an der Zelloberfläche kann er nun entweder konstitutiv oder mit gebundenem Liganden transcytiert werden. In MDCK-Zellen, die mit dem Gen für den pIgA-Rezeptor transfiziert wurden, wurde gezeigt, daß für eine Transcytose des Rezeptors ohne Ligand die Phosphorylierung eines Serinrestes der cytoplasmatischen Domäne (Ser-664) notwendig ist, während dies nicht der Fall ist, wenn der Rezeptor einen Liganden gebunden hat (Hirt et al., 1993). Zahlreiche andere Struktur-/Funktionsbeziehungen des Rezeptors, die für den intrazellulären Transport wesentlich sind, wurden ebenfalls in transfizierten MDCK-Zellen, aufgeklärt. Auch wenn möglicherweise die-selben Mechanismen bei der Transcytose in Hepatocyten existieren, besteht doch die Möglichkeit, daß die genauen Abläufe in Hepatocyten anders als in MDCK-Zellen sind. Aus diesem Grund werden die entsprechenden Befunde unter Punkt 1. 3. 1. behandelt.

Nach Aufnahme des pIgA-Rezeptors in Hepatocyten durch Clathrin-umhüllte Vesikel, gelangt er in frühe Endosomen, die auch Transferrin- und Asialoglykoprotein-Rezeptoren enthalten. In diesen frühen endocytischen Kompartimenten erfolgt eine Sortierung; der pIgA-Rezeptor wird samt seinem Liganden vom lysosomalen, sowie vom Rezyklisierungsweg abgezweigt. Ein wesentlicher Faktor dabei ist die Tatsache, daß pIgA unter den milden sauren Bedingungen innerhalb der frühen Endosomen nicht von seinem Rezeptor abdissoziiert. Der Komplex gelangt anschließend in transcytotische Vesikel, die einen Durchmesser von 110 - 160 nm aufweisen. Bereits in einem Zeitraum von 3 - 10 min können diese transcytotischen Vesikel in pericanaliculären Bereich gefunden werden, wo sie jedoch akkumulieren und erst relativ spät mit der apikalen Membran (der Gallengangsmembran) fusionieren (Hoppe et al., 1985). Für eine *in situ*-Transcytose wurde beschrieben, daß erst nach etwa 20 min pIgA in der Galle detektiert werden kann und das Maximum bei 30 - 60 min liegt (Hoppe et al., 1985); Ergebnissen unserer eigenen Arbeitsgruppe zufolge tritt pIgA bereits nach 10 min in der Galle auf, und das Maximum ist nach etwa 30 min erreicht. In der isoliert perfundierten Leber wurde eine ähnliche Kinetik beschrieben (Perez et al., 1988). Die Rezeptor-vermittelte Transcytose kann bei einer Temperatur von 16°C in frühen Endosomen blockiert werden;

sobald jedoch der transcytotische Marker die frühen Endosomen verlassen hat, ist er nicht mehr dieser Transport-Blockierung bei 16°C unterworfen und gelangt in die Galle (Klapper et al., 1992; Schmid et al., 1992).

Eine Mikrotubuli-Abhängigkeit der Transcytose konnte durch die Mikrotubuli-depolymerisierenden Verbindungen Colchicin und Nocodazol nachgewiesen werden. Die Beladung einer perfundierten Leber mit pIgA in Gegenwart des reversibel wirkenden Agens Nocodazol konnte den Transport in die Galle blockieren; bei einer anschließenden Nocodazol-freien Perfusion gelangte dieses pIgA jedoch nicht mehr in die Galle, während eine zweite Beladung mit einem anders markierten pIgA unter diesen Bedingungen eine normale Transcytose zeigte. Dies deutet darauf hin, daß pIgA in Abwesenheit von Mikrotubuli aus den frühen Endosomen heraus in ein Kompartiment transportiert wird, das hinter der Abzweigung zum transcytotischen Weg liegt (Perez et al., 1988).

Der polymere IgA-Rezeptor wird nach der Transcytose und Einbau in die apikale Membran durch eine dort vorhandene Protease auf der extracytoplasmatischen Seite gespalten, wodurch es zur Freisetzung der EctoDomäne des Rezeptors mit einem Molekulargewicht von 80 kDa kommt. Diese Form wird als sekretorische Komponente bezeichnet; bei einer Transcytose des pIgA-Rezeptors mit einem gebundenen Liganden bleibt der Komplex mit der EctoDomäne aufrecht und wird als sekretorisches IgA bezeichnet (Musil & Baenziger, 1988). Die Struktur dieses Komplexes ist in der Abb. 1. 15. schematisch dargestellt.



### Abb. 1. 15.

Schema der Struktur von sekretorischem IgA (nach Kerr, 1990; modifiziert)

Sekretorisches IgA kann mehrere Funktionen erfüllen. Erstens dient es dazu, Antigen-Komplexe durch Transcytose aus dem Blutkreislauf zu entfernen und dem Verdauungstrakt zuzuführen; und zweitens kann sekretorisches IgA, das ohne Antigen sezerniert wurde, im Intestinaltrakt Antigene binden und damit einen immunologischen Schutz dieses Raumes übernehmen (Kaetzel et al., 1991).

Die sekretorische Komponente übernimmt dabei die Aufgabe pIgA gegen Proteolyse im Darm zu schützen.

Allerdings wird nur in Ratten und Kaninchen pIgA effizient durch Hepatocyten transcytiert; in anderen Säugetieren, wie auch im Menschen wird nur wenig pIgA transcytiert, und dieser Transport läuft hauptsächlich über intestinale und biliäre Epithelzellen anstatt über Hepatocyten ab (Brown & Kloppel, 1989).

### **1. 5. 3. 5. Nicht-Rezeptor-vermittelte Transcytose**

Im Gegensatz zur Rezeptor-vermittelten Transcytose von pIgA ist noch sehr wenig über die Transcytose von Verbindungen bekannt, die ohne Rezeptor internalisiert werden, bzw. für die keine Interaktion mit Bestandteilen der Cytoplasma-Membran beschrieben wurde.

Neben inerten Markern, wie fluoreszenzmarkierten, hochmolekularen Dextranen, wurde in vielen Fällen das in geringen Mengen nachzuweisende Enzym Peroxidase (Horse Radish Peroxidase, HRP) eingesetzt, um diesen Transportvorgang zu charakterisieren. Dieses Enzym (Molekulargewicht: 40 kDa, hydratisierter Durchmesser: 5,34 nm, isoelektrischer Punkt: 7,5) wird jedoch in einer biphasischen Kinetik in die Galle sezerniert, mit einem Maximum nach etwa 4 min, sowie einem zweiten nach etwa 15 - 20 min. Aufgrund der Tatsache, daß das erste Maximum mit dem Auftreten kleinerer Verbindungen, wie z.B. <sup>14</sup>C-markierter Saccharose zusammenfällt, und das zweite Maximum mit der Sekretion von pIgA, wurde postuliert, daß der rasche Transport auf einen parazellulären Weg zurückzuführen ist, und der

langsame Transport auf einen transzellulären (Hardison & Lowe, 1989). Marker mit relativ kleinem Molekulargewicht, wie z.B. Saccharose, können jedoch nicht nur auf einer parazellulären, sondern auch auf einer transzellulären Route in die Galle transportiert werden (LeSage et al., 1990; Fuchs, persönliche Mitteilung). Trotz dieser Tatsache und dem Faktum, daß die beiden Transportwege von HRP nicht genau definiert waren, wurde HRP in vielen Studien als Modellsubstanz für die biliäre Sekretion eingesetzt, wobei der schnelle Transportweg einem parazellulären und der langsame Transport einem transzellulären Mechanismus zugeschrieben wurde. Es wurde gezeigt, daß das erste HRP-Maximum bei höherer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Perfusionslösung erhöht ist (Hardison & Lowe, 1989). Das Hormon Vasopressin, das die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verändert, führt ebenfalls zu einer Stimulierung des raschen Transportweges. Die elektronenmikroskopische Analyse der HRP-Lokalisation zeigte nach einer kurzen Markierung mit HRP (1 min) unter Kontrollbedingungen kein Enzym in den Canaliculi, dafür jedoch HRP-Reaktionsprodukt auf der sinusoidalen Seite, sowie auf der lateralen Seite bis zu den "Tight junctions". Ein Durchdringen der Tight Junctions konnte nicht detektiert werden. Nach einer Markierung in Gegenwart von Vasopressin war das HRP-Reaktionsprodukt jedoch eindeutig auch innerhalb der Canaliculi sichtbar (Lowe et al., 1988). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß der schnelle Transportweg nur in Gegenwart von Vasopressin parazellulär verläuft. In einer anderen Arbeit führte eine Zunahme des intrazellulären Calciums durch Einsatz eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors zur Stimulierung beider Transportwege (Kan & Coleman, 1988). In der Folge wurde gezeigt, daß auch die Ladung des HRP-Moleküls für den Transport wesentlich ist; bei einem anionisch derivatisiertem HRP ( $\text{pI} < 3,5$ ) waren beide Transportwege deutlich reduziert (Hardison et al., 1989).

Morphologische Untersuchungen mit größeren Konzentrationen an HRP konnten schließlich zeigen, daß bereits sehr bald nach der Markierung (nach 2min) Vesikel im pericanaliculären Bereich (innerhalb von  $1 \mu\text{m}$ ) auftreten, daß jedoch keine Permeation durch Tight Junctions detektierbar ist. Die Autoren schlossen, daß zwei unterschiedliche transzelluläre Transportwege für HRP existieren, wobei der schnellere Weg Colchicin-insensitiv, und damit Mikrotubuli-unabhängig ist. Beide Transportrouten werden durch Taurocholat stimuliert (Hayakawa et al., 1990). Der Phosphodiesterase-Inhibitor Papaverin hemmt den langsamen Transport-Weg, sowie die biliäre Sekretion von Lipiden (unabhängig von zyklischen Nucleotiden - Hayakawa et al.,

1992). Cyclosporin A führt sowohl zu einer Verzögerung, als auch zu einer Reduktion der HRP-Transcytose (Roman et al., 1990).

## **2. ZIEL DER STUDIE**

Endocytose-Prozesse sind von eminenter zellbiologischer Bedeutung, da sie für zahlreiche zelluläre Funktionen, wie etwa die Aufnahme essentieller Verbindungen, den Abbau von Makromolekülen, für Immunreaktionen, für die Interaktion mit anderen Zellen, sowie für die Regulation verschiedener Zellfunktionen verantwortlich sind.

In polarisierten Zellen, die eine basolaterale und eine apikale Seite aufweisen, existiert neben dem Endocytose-Weg noch ein weiterer intrazellulärer Transportvorgang, bei dem Makromoleküle von einem Zellpol zum gegenüberliegenden geschleust werden können, nämlich die Transcytose. Die Mechanismen, nach denen diese wichtigen Vorgänge ablaufen, wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht, wobei jedoch in den meisten Studien transformierte, immortalisierte Zelllinien außerhalb des Organismus kultiviert und zur Untersuchung herangezogen wurden. Ob in verschiedenen differenzierten Gewebezellen die gleichen Abläufe vor sich gehen, ist hingegen noch nicht geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einige dieser Mechanismen in Ratten-Hepatocyten zu untersuchen, also in untransformierten Leberparenchym-Zellen, die ebenfalls zu den komplexen polarisierten Zelllinien zählen. Die Tatsache, daß Hepatocyten ihre physiologische, funktionelle Polarität nur im intakten Organverband aufrechterhalten, erschwert den experimentellen Zugang. Dies ist offensichtlich die Ursache dafür, daß noch relativ wenig über die unterschiedlichen endocytischen und transcytotischen Wege in Hepatocyten bekannt ist.

Im folgenden sind die Teilbereiche der Endocytose und Transcytose in Hepatocyten angeführt, die in dieser Arbeit untersucht werden sollten:

### **1. Untersuchung der apikalen Endocytose**

In einem Teil der vorliegenden Arbeit wurde versucht ein System zu etablieren, das die Markierung apikaler Endocytose-Vorgänge im intakten Organ erlaubt, um die dabei entstehenden apikalen Endosomen zu charakterisieren.

### **2. Untersuchung eines apikal-basolateralen Transports**

Unter Einsatz des für die apikale Endocytose aufgebauten Systems sollte der Transport von der apikalen zur basolateralen Seite der Hepatocyten, also vom Gallengangssystem zum sinusoidalen Raum studiert werden.

### **3. Charakterisierung von basolateral-apikalen Transcytosewegen**

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der Endocytose-Vorgänge, die an der sinusoidalen Seite ablaufen, sowie die damit verbundenen Transcytosewege vom basolateralen zum apikalen Zellpol. Es sollte festgestellt werden, ob Clathrin-unabhängige Endocytose- und Transcytosemechanismen existieren und welche Charakteristika sie aufweisen.

In diesem Zusammenhang sollte zwischen Rezeptor-vermittelter und Fluid-Phase-Internalisierung unterschieden werden.

### **4. Rekonstituierung von Fusionsprozessen *in vitro***

Die Ergebnisse der *in vivo*-Experimente sollten mit Studien verglichen werden, in denen Teilschritte intrazellulärer Transportprozesse *in vitro* rekonstituiert werden. Einer dieser Schritte, die *in vitro* nachvollzogen werden können, ist die Fusion von Zellkompartimenten. Während für einige Zellkulturlinien bereits Ergebnisse mit geeigneten experimentellen Systemen vorliegen, wurden bisher noch keine Fusionstests mit Endosomen von Gewebezellen, wie Hepatocyten, durchgeführt.

Demnach wurde versucht, derartige Fusionen zwischen gleichartigen, sowie unterschiedlichen endocytischen Kompartimenten zu etablieren, um damit auch Einblicke in die Regulation endocytischer Transportwege zu erhalten. In diesem Hinblick war es von besonderem Interesse, ob Endosomen unterschiedlicher Stadien miteinander, bzw. mit Lysosomen fusionieren können. Weiters sollte neben dem auch von anderen Arbeitsgruppen eingesetzten Versuchsprinzip eine neue Untersuchungstechnik zur Analyse der Fusionsprozesse etabliert werden, nämlich die Durchfluß-Analyse einzelner Zellorganellen, um damit zusätzliche Aussagen treffen zu können.

## **3. MATERIALIEN UND METHODEN**

### **3. 1. MATERIALIEN**

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Materialien von Sigma bezogen (Peroxidase, HRP: Sigma P8250, Lot: 68F9600).

FITC-Dextran wurde, wenn nicht anders angeführt, mit einem Molekulargewicht von 70 kDa eingesetzt (Sigma FD-70S); in einigen Experimenten wurde jedoch 40 kDa-FITC-Dextran verwendet (Sigma FD-40S). Texas Red - BSA war von Molecular Probes Inc., Eugene, USA (A-824, Lot: 98), Biotin (NHS-LC-Biotin) wurde von der Firma Pierce gekauft, Avidin von der Canadian Lysozyme Inc., Mikrotiterplatten für ELISA von Greiner (Kat.Nr. 655161), HRP-gekoppelte Anti-Avidin Antikörper von Dako, Dänemark (Nr. P 360, Lot 115), HRP-gekoppelter Mouse-Anti-Rabbit-IgG Antikörper von Dianova, Hamburg (Nr.211-035-109, Jackson Immuno Research Laboratories Inc.).

Als Spender für die isoliert perfundierten Lebern wurden männliche Ratten des Stammes Louvain (von der Versuchstierzucht der Universität Wien, Himberg, Niederösterreich) mit einem Körpergewicht von 200 - 250 g eingesetzt. Die Tiere hatten unbeschränkten Zugang zu Wasser und Futter und wurden in einem 12 h-Licht-/Dunkelrhythmus gehalten.

Die Zusammensetzung der Puffersysteme, die eingesetzt wurden sind, falls sie nicht im Text angegeben sind, dem Anhang A zu entnehmen.

### **3. 2. METHODEN**

#### **3. 2. 1. ALLGEMEINE METHODEN**

##### **3. 2. 1. 1. Die Methode der isoliert perfundierten Rattenleber**

###### **3. 2. 1. 1. 1. Organentnahme**



Die totale Hepatektomie erfolgte im wesentlichen wie bei Bartosek et al. (1973) beschrieben.

Männliche Louvain-Ratten wurden durch Injektion (intraperitoneal) von etwa 25 mg Thiopental in 1 ml A. bidest. narkotisiert. Nach Erreichen der Vollnarkose wurde das Peritoneum geöffnet und das Bindegewebe zwischen Leber und Diaphragma durchtrennt. Bei Transzytose-Experimenten wurde eine Kanüle (PE-10) in den Gallengang eingeführt und darauf geachtet, daß während der weiteren Operation der Gallefluß nicht unterbrochen wird. Die Bindegewebsanteile, die zwischen Leber und Magen liegen, wurden vorsichtig durchschnitten und die Arteria gastrica dextra samt dem Oesophagus jeweils knapp unterhalb der Leber und knapp über dem Magen ligiert und durchtrennt. Die Vena cava inferior wurde zwischen Leber und Niere zweimal ligiert, wobei die weiter unten liegende Ligation direkt an der Abzweigung der Vena renalis erfolgte. Nach Durchschneiden der Vena cava inferior zwischen den beiden Ligationen wurde das Bindegewebe zwischen der großen Hohlvene und der Leber soweit entfernt, daß der kleine Leberlappen dadurch freigelegt wurde. Danach wurde die Pfortader oberhalb der Abzweigung zur Vena lienalis mit einer Schlinge versehen, sowie mit einer zweiten Schlinge weiter unterhalb. Nach vorsichtigem Freipräparieren der Pfortader wurden etwa 400 µl Heparin (ca. 1500 IE, von der Firma Novo Industri, Wien) in die Milz injiziert und ca. 1 min gewartet um die Blutgerinnung ausreichend zu blockieren. Mit der weiter unten liegenden Schlinge wurde die Pfortader ligiert und zwischen den beiden Schlingen vorsichtig angeschnitten. Mit einer feinen gebogenen Spitzpinzette wurde der Schnitt offengehalten, während eine handgefertigte Glaskanüle mit abgeschrägter Spitze, deren Kanten abgerundet waren, (Innendurchmesser an der Spitze: ca. 1,5 mm) an der Pinzette entlang in die Pfortader hineingeschoben wurde. Die obere Schlinge wurde nun so zugeschnürt, daß die Kanülenspitze damit in der Pfortader fixiert war. Es wurde darauf Bedacht genommen, daß der Operationsvorgang nach Ligation der Pfortader, bis zur Perfusion der isolierten Leber möglichst schnell abläuft (unter 5 min), um eine Sauerstoff-Unterversorgung des Organs zu verhindern. Nach der Kanülierung wurde die Pfortader und das sie umgebende Gewebe durchtrennt, wobei in den Fällen, in denen der Gallengang ebenfalls kanüliert worden war, darauf geachtet wurde, daß dieser dabei unversehrt blieb. Danach wurde das Diaphragma durchstoßen, der Thoraxraum davon ausgehend durch einen lateral angelegten Schnitt geöffnet, das Diaphragma weiter aufgeschnitten, und der Brustkorb nach einem weiteren auf der anderen Seite liegenden Schnitt nach oben gedrückt. Daraufhin wurde das rechte Atrium

angeschnitten und eine zweite handgefertigte Glaskanüle in die Vena cava inferior oberhalb der Leber eingeführt und mit einer Schlinge angebunden. Das noch verbliebene, die Leber fixierende Bindegewebe wurde durchtrennt und die somit freigelegte Leber entnommen. Nach Wägung der Leber (unter Subtraktion der Kanüलगewichte) wurde das Organ so rasch als möglich an die vorbereitete Perfusionsapparatur angeschlossen und perfundiert.

### **3. 2. 1. 1. 2. Leberperfusion bei verschiedenen Temperaturen**

Die Perfusion wurde nach der Methode von Graf & Peterlik (1976) durchgeführt.

Für 37°C-Leberperfusion wurde der Krebs-Henseleith-Puffer (KHB, siehe Anhang A) aufgrund von empirischen Befunden auf 41°C temperiert, um die Abkühlung der Perfusionslösung zwischen Wasserbad und dem Organ durch die niedrigere Umgebungstemperatur (etwa 23°C) zu kompensieren. Der Puffer wurde ab Beginn der Temperierung und etwa 1 h vor Beginn der Perfusion mit einem befeuchteten Gasgemisch (Oxymix, von der Haus-eigenen Gaszentrale) aus 93% O<sub>2</sub> und 7% CO<sub>2</sub> begast, um eine Sauerstoff-Sättigung der Lösung zu erzielen, und gleichzeitig durch Bikarbonat-Pufferung den pH-Wert der Lösung auf ca. 7,4 einzustellen. Der CO<sub>2</sub>-Anteil des Gases war mit 7% höher als der üblicherweise verwendete Anteil von 5%. Er wurde aufgrund von Ergebnissen von Felberbauer (1992) so gewählt, da die für eine 37°C-Leberperfusion notwendige Temperierung des Puffers auf 41°C eine höhere CO<sub>2</sub>-Konzentration zur pH-Einstellung erfordert.

Für 16°C-Leberperfusionen, die eingesetzt wurden, um den intrazellulären endozytischen Transport nach kinetisch frühen Endosomen zu blockieren, wurde der Puffer auf 14°C temperiert und mit 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> begast.

Die Perfusion erfolgte bei einer Rate von 3 - 4 ml/(min.g) über die Pfortader-Kanüle. Vor jeglicher Markierung, bzw. vor einer Abkühlung der Leber auf 16°C, wurde das Organ 15 min bei 37°C vorperfundiert, um einen physiologischen Gleichgewichtszustand zu erreichen. Bei einigen Experimenten wurde der Temperaturverlauf der perfundierten Leber mit einem Thermosensor und angeschlossenem Schreiber gemessen und aufgezeichnet, um gewährleisten zu können, daß die erwünschte Temperatur vor der Zugabe der Markierungsverbindung zur Perfusionslösung bereits erreicht ist. Eine Erwärmung der Leber von 16°C auf 37°C dauerte bei der Perfusion etwa 2 - 3 min, wobei eine Temperatur von 30°C bereits nach 40 sec. erreicht war.

Bei Experimenten, in denen der Transport einer Substanz von der sinusoidalen (basolateralen) Seite in die Galle gemessen werden sollte, wurde die Gallengangskanüle an einen Fraktionskollektor (Redifrac, Pharmacia) angeschlossen und die Galle tropfenweise gesammelt. Der Fraktionskollektor wurde über den Ereigniszähler ("Event Mark") mit Hilfe eines "Mouse-Interfaces" mit einem Macintosh Plus verbunden, der dazu benutzt wurde, über die Häufigkeit von Galletropfen, das gemessene Tropfengewicht und das Lebergewicht, den Gallefluß während des Experimentes auszurechnen und zu speichern. Über diese "online-Analyse" des Galleflusses war eine indirekte Beurteilung des physiologischen Zustandes der Leber möglich. Bei 37°C betrug der Gallefluß  $1,3 \mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$ , bei 16°C etwa  $0,3 \mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$  und bei 11°C etwa  $0,17 \mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$ .

Bei Experimenten, in denen apikale Endocytose-Vorgänge, bzw. apikal-basolaterale Transportprozesse untersucht werden sollten, wurde die Leber nach der Vorinkubation (37°C für 15 min) auf 4°C abgekühlt (durch Perfusion von eiskaltem KHB) und es wurden 200  $\mu\text{l}$  einer Markerlösung (HRP: ca. 25 mg/ml; Texas Rot-Albumin: 3 mg/ml; FITC-Dextran: 35 mg/ml) innerhalb von 2 min unter Verwendung einer Infusorpumpe (Perfusor Secura, Firma Braun-Melsungen AG, BRD) in den kanülierten Gallengang injiziert. Die infundierte Menge entspricht der Angabe von Matter et al. (1969). Es wurde 40 - 60 min bei 4°C weiter perfundiert; danach wurde die Leber durch Perfusion mit 41°C-temperiertem KHB (beim Lebereingang: 37°C) für 2 min erwärmt, und anschließend wieder auf 4°C abgekühlt. Die kontinuierliche Temperatur-Registrierung ergab, daß das Temperatur-Maximum der Leber unter diesen Bedingungen bei 32,5°C lag, daß 1,2 min lang eine Temperatur von mehr als 30°C bestand, und daß 2,8 min lang eine Temperatur über 16°C bestand.

Nach der Abkühlung wurde entweder durch eine Perfusionsfixierung die Leber für morphologische Studien fixiert, oder homogenisiert, um weitere Präparationen vornehmen zu können.

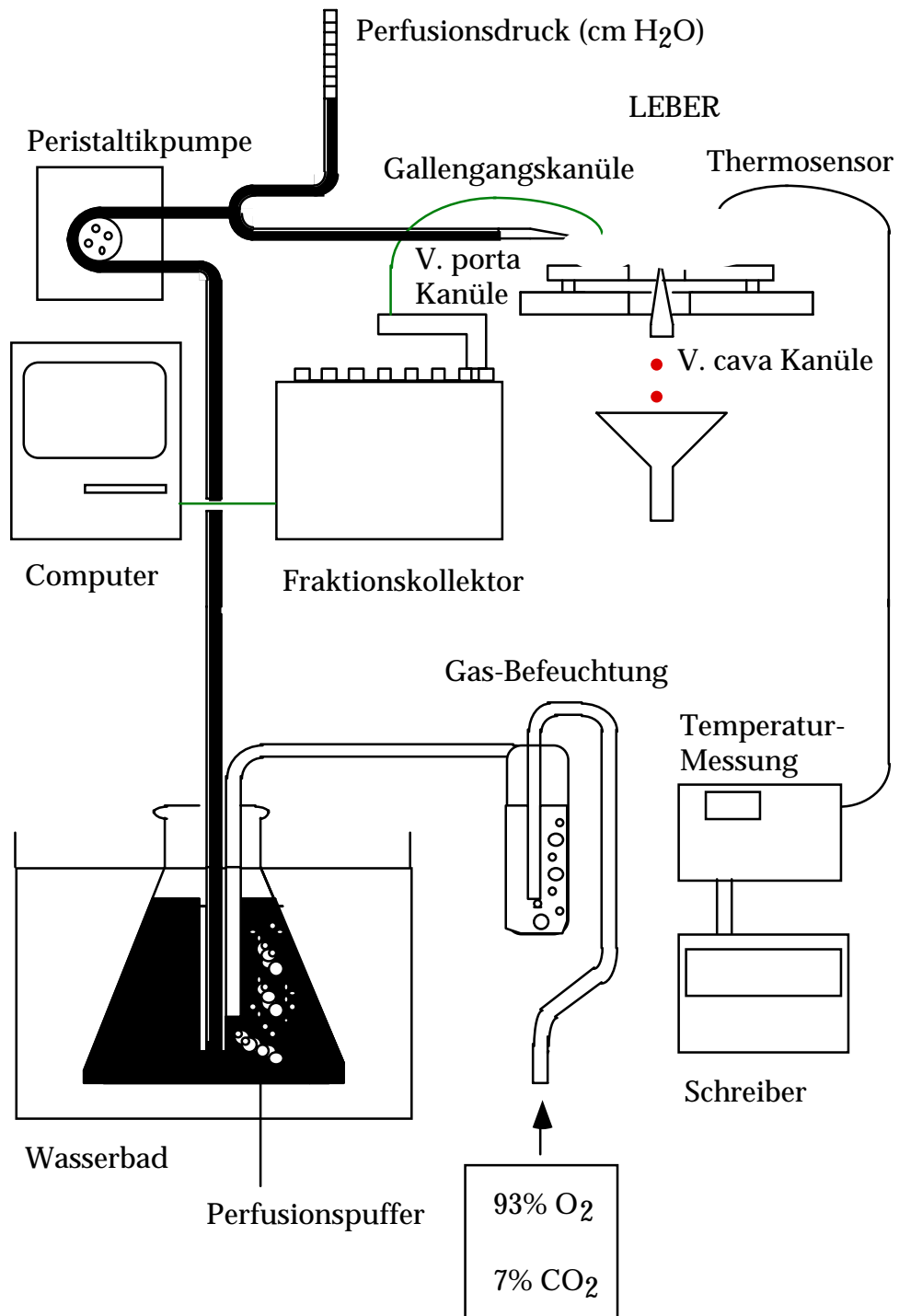


Abb. 3. 1.  
 Schema der isolierten Leber-Perfusion

### **3. 2. 1. 1. 3. Hypertone Leberperfusion**

Eine hypertone Leberperfusion wurde durchgeführt, um die Clathrin-abhängige Endocytose, bzw. Transcytose zu hemmen. Nach einer normalen Vorperfusion bei 37°C wurde die Leber 5 min bei 37°C mit KHB perfundiert, der je nach Experiment 0,03 - 0,2 mol/l Saccharose enthielt.

Danach wurde 1 min bei 37°C mit der Markerlösung (mit der gleichen Saccharose-Konzentration) perfundiert und weitere 4 min unter hypertonen Bedingungen ohne Marker. Anschließend wurde wieder mit isotonem KHB perfundiert (bis zum Ende des Versuchs); die hypertone Perfusion beschränkte sich somit auf 10 min. Der Perfusionsdruck stieg nur bei höheren Saccharose-Konzentrationen (0,2 mol/l) an (um etwa 5 cm Wassersäule); bei 0,1 mol/l blieb er in etwa gleich. Während der hypertonen Perfusion kam der Gallefluß (durch osmotischen Rückstrom vom canaliculären in das sinusoidale System) zum Erliegen; nach Zurückschalten auf isotonen KHB kam es zu einer ausgeprägten choleretischen Phase mit einem Gallefluß bis zu  $5 \mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$ . Das Maximum der Choleresese war 2 - 3 min nach dem Umschalten (somit etwa 7 min nach der Markierung) erreicht; ca. 12 min nach der Markierung (7 min nach dem Umschalten) hatte sich der Gallefluß wieder auf den Ausgangswert stabilisiert.

### **3. 2. 1. 1. 4. Kalium-freie Leberperfusion**

Eine Kalium-freie Leberperfusion wurde ebenfalls durchgeführt, um die Clathrin-abhängige Endocytose zu inhibieren.

Nach 15 min Vorperfusion bei 37°C unter normalen Bedingungen wurde auf K<sup>+</sup>-freien Perfusionspuffer (Zusammensetzung wie KHB, jedoch NaCl statt KCl, und NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> statt KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) umgeschaltet. Es wurde 6 min Kalium-frei perfundiert, anschließend wurde die Leber 1 min mit Markern in Kalium-freien Puffer beladen, und weitere 3 min Kalium-frei ohne Marker perfundiert. Danach wurde wieder auf normalen KHB umgestellt und unter diesen Bedingungen für die weitere Versuchsdauer (ca. 40 min) perfundiert. Der Perfusionsdruck änderte sich bei diesen experimentellen Manipulationen kaum. Der Gallefluß sank unmittelbar nach Umschalten auf Kalium-freien Puffer um etwa  $0,2 \mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$ , stieg kurzfristig wieder um etwa  $0,1 \mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$  an, um dann wieder um ca.  $0,3 \mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$  abzufallen; das Maximum des interimistischen Anstiegs lag bei ca. 5 min nach Umschalten auf Kalium-freie

Bedingungen. Bei der folgenden normalen Perfusion stabilisierte sich der Gallefluß rasch wieder auf einen normalen Wert.

### **3. 2. 1. 1. 5. Perfusionsfixierung**

#### **a) McLean-Fixierung (nach McLean & Nakane, 1974)**

Diese Fixierung wurde vor allem für Leberproben eingesetzt, die mit FITC-Dextran oder anderen fluoreszierenden Markern beladen wurden.

Die Fixierungslösung enthielt:

0,01 mol/l NaJO <sub>4</sub>
0,75 mol/l Lysin
0,0375 mol/l Na-Phosphatpuffer
2% Paraformaldehyd

Sie wurde unmittelbar vor Gebrauch durch Mischen von 3 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B unter Zugabe von 0,01 mol/l NaJO<sub>4</sub> hergestellt:

Lösung A: 0,1 mol/l Lysin, 0,05 mol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf pH 7,4 eingestellt; Lösung B: 8% Paraformaldehyd: frisch hergestellt durch Suspendierung des Paraformaldehyds in A. bidest., Erwärmung auf 60°C unter Rühren, Zugabe einiger Tropfen 1 mol/l NaOH bis zur Klärung und Filtrierung der Lösung. Beide Lösungen wurden auf 4°C abgekühlt, bevor die Zugabe des NaJO<sub>4</sub> erfolgte. Beim Mischen der beiden Lösungen sinkt der pH-Wert auf ca. 6,2. Nach Abkühlung der Leber auf 4°C am Ende des Versuches wurde zuerst ca. 2 min nicht-rezirkulierend mit der Fixierungslösung bei 4°C perfundiert und anschließend 13 min rezirkulierend. Von der durch die Fixierung hart gewordenen Leber wurden Würfel mit ca. 0,5 cm Kantenlänge herausgeschnitten und in der Fixierungslösung bei 4°C bis zur Entwässerung aufbewahrt (nicht länger als 48 h).

In einigen Fällen wurden die Gewebeproben unmittelbar nach der Fixierung in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf -20°C überführt.

#### **b) Glutaraldehyd-Fixierung (für Elektronenmikroskopie)**

Puffer: 4% Paraformaldehyd  
0,25% Glutaraldehyd  
in 0,1 mol/l Kakodylat-Puffer pH 7,3

Die Fixierung elektronenmikroskopischer Proben wurde nach Karnovsky (1965) durchgeführt.

Das Paraformaldehyd wurde in Kakodylatpuffer (ca. 8/10 des Endvolumens) suspendiert, unter Rühren aufgeköcht, filtriert, auf etwa 4°C abgekühlt, 25%iges Glutaraldehyd zugegeben (1/10 des Endvolumens) und auf das Endvolumen mit Kakodylatpuffer aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung ist niedriger als der Anfangswert.

Die Leber wurde nach der Abkühlung auf 4°C 2 min nicht-rezirkulierend und 12 min rezirkulierend mit eiskaltem Karnovsky-Puffer perfundiert. Der Perfusionsdruck steigt dabei nicht über 7 cm Wassersäule. Nach der Perfusionsfixierung wurden kleine Gewebestücke herausgeschnitten und in 4°C kalten Kakodylatpuffer überführt.

### **3. 2. 2. MORPHOLOGISCHE METHODEN**

#### **3. 2. 2. 1. Elektronenmikroskopie**

Die Präparation der Proben und die Elektronenmikroskopie wurden am Institut für Histologie und Embryologie, Ordinariat 2, Universität Wien, unter der Leitung von Herrn Prof. Ellinger durchgeführt.

Die Diaminobenzidin-Methode zur Lokalisation der HRP erfolgte nach den Angaben von Graham & Karnovsky (1966).

#### **3. 2. 2. 3. Präparation von Proben für die Fluoreszenzmikroskopie**

### 3. 2. 2. 3. 1. Gefrierschnitte

Fixierte oder unfixierte Leberproben wurden in flüssigem Stickstoff so rasch als möglich eingefroren und anschließend auf  $-20^{\circ}\text{C}$  im Tiefkühlschrank oder in der auf  $-20^{\circ}\text{C}$  temperierten Gefrierschneide-Maschine (Cryocut, Microm, Heidelberg) äquilibriert. Die temperierte Probe wurde nach Fixierung auf dem kühlbaren Objekthalter bei  $-20^{\circ}\text{C}$  auf 5 - 7  $\mu\text{m}$ -Dicke geschnitten; die Schnitte wurden mit sauberen Objektträgern bei Raumtemperatur aufgenommen. In einigen Fällen (vor allem bei nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbungen) wurden die Schnitte noch 2 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit Methanol und 5 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit Aceton fixiert (oder 5 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit Aceton : Ethanol = 1 : 1). Die Einbettung der Schnitte erfolgte entweder in PBS (auf pH 8 eingestellt) : Glycerin (88%ig) = 1 : 9 oder in Moviol (6 g Glycerin/2,4 g Moviol 4-88/6 ml A. bidest.: 2 h bei Raumtemperatur gerührt; + 12 ml 0,2 mol/l Tris/HCl pH 8,5: 1 h bei  $50^{\circ}\text{C}$  gerührt, 15 min bei 500 g zentrifugiert, nach Zugabe von 0,015%  $\text{NaN}_3$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt).

### 3. 2. 2. 3. 2. Paraffinschnitte

Die perfusionsfixierte Leberprobe wurde noch 48 h in der McLean-Fixierlösung bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Danach wurde das Gewebe durch eine Alkoholreihe und Methylbenzoat entwässert und anschließend in geschmolzenem Paraffin mit zwei unterschiedlichen Schmelzpunkten inkubiert (Die folgenden Zeitangaben sind Mindestwerte für eine würfelförmige Probe mit etwa 0,5 cm Kantenlänge):

70% Ethanol	2 h
80% Ethanol	2 h
96% Ethanol	2 h
100% Ethanol	2 h
Methylbenzoat	2 h
Methylbenzoat	1 d
Benzol	10 - 15 min
Paraffin ( $40^{\circ}\text{C}$ )	12 h
Paraffin ( $60^{\circ}\text{C}$ )	2 h

Nach Aushärtung des Paraffins wurden auf einem Schlittenmikrotom etwa 7  $\mu\text{m}$ -dicke Schnitte angefertigt, die auf der Oberfläche eines  $45^{\circ}\text{C}$  warmen



Wasserbades gespreitet, auf Objektträger aufgenommen und durch kurze Erwärmung über den Schmelzpunkt (auf einem Heizblock) auf dem Objektträger fixiert wurden.

### **3. 2. 2. 3. 3. Glykolumethylacrylat-Schnitte**

Zur Einbettung der Probe in das Kunstharz Glykolumethylacrylat war keine Entwässerung des Gewebes notwendig. Das fixierte Gewebestück wurde in folgenden Glykolumethylacrylat-Konzentrationen inkubiert:

33%	30 min - 1 h
66%	30 min - 1 h
100%	15 min unter Zentrifugation bei 1000 g
100%	UV-induzierte Polymerisation des Kunstharzes

Glykolumethylacrylat-Schnitte wurden in einer Dicke von 1 - 2  $\mu\text{m}$  trocken auf einem Ultramikrotom geschnitten, mit A. bidest. benetzt, geblättert und wieder getrocknet.

### **3. 2. 2. 3. 4. Immunfluoreszenzfärbungen**

Immunfluoreszenzfärbungen waren bei Kunstharz-eingebetteten Proben nicht möglich; sie wurden normalerweise an Gefrierschnitten oder an paraffinierten Schnitten nach einer Entparaffinierung und Hydratisierung durchgeführt. Bei Proben mit endocytisierten Markern konnte die übliche Entparaffinierung mit Xylol nicht eingesetzt werden, da es dabei zu einer Diffusion des Endocytose-Markers kam. Die Entparaffinierung erfolgte deshalb entweder durch Einlegen der Schnitte in Benzol (5 min) und Ethanol (5 min), oder durch Inkubation in Ethanol (15 min) und Ethanol/Aceton (15 min). Die letztere Variante führte nur zu einer ineffizienten Entparaffinierung, minimierte dafür aber die Diffusion endocytisierter Fluoreszenzmarker. Die Hydratisierung erfolgte mit einer absteigenden Ethanol-Reihe (umgekehrt wie unter 3. 2. 2. 3. 2., jedoch nur für jeweils 5 min).

Die Schnitte wurden nach folgenden Schritten gefärbt:

- a) Waschen in PBS: 30 min

- b) bei McLean-fixierten Schnitten: Blockierung freier Aldehydgruppen durch Inkubation in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS (zweimal je 5 min).
- c) Blockierung unspezifischer Bindungsstellen: 1% BSA in PBS: 30 min; wenn noch eine Permeabilisierung nötig war: Zugabe von 0,005% Saponin
- d) Waschen: zweimal je 5 min in PBS
- d) Inkubation mit erstem Antikörper: 30 min bei 37°C (im Feuchtraum)
- e) Waschen: dreimal je 10 min mit PBS
- f) Inkubation mit zweitem Antikörper: FITC-Goat-Anti-Rabbit IgG 1 : 60
- g) Waschen: dreimal je 10 min in PBS
- h) Einbetten in PBS : Glyzerin = 1 : 9 (pH 8)

Bei höheren Hintergrundfluoreszenzen wurden die Waschvorgänge mitunter verlängert.

### **3. 2. 2. 4. Fluoreszenzmikroskopie**

Die Mikroskopie der eingebetteten Proben wurde mit einem Olympus AH-2 Mikroskop durchgeführt.

FITC-Fluoreszenz wurde mit dem Standard-Filtersatz mikroskopiert, wobei jedoch ein zusätzlicher Anregungsfilter (EY 455) zur Schmalband-Anregung, und ein zusätzlicher Sperrfilter ( G520 - Short Pass-Filter) zur Blockierung von Wellenlängen über 520 nm, eingesetzt wurde, um die Spezifität der Anregung für FITC zu erhöhen, und die Fluoreszenz von TRITC oder Texas-Rot zu blockieren.

Texas-Rot oder TRITC-Fluoreszenz wurde mit dem Standard-Filtersatz für Grün-Anregung beobachtet, und zwar unter Verwendung eines zusätzlichen Sperrfilters, der unterhalb von 610 nm blockiert (R610 - Long Pass-Filter); in manchen Fällen wurde auch ein zusätzlicher Anregungs-filter (EO530) eingesetzt.

Als Filmmaterial wurde entweder Kodak Schwarz/Weiß-Film (T<sub>max</sub> 1600) verwendet, oder Ektachrom-Diafilm P800/1600.

Die Empfindlichkeit wurde meist auf 1600 ASA eingestellt, und der Film entsprechend entwickelt. Der Korrekturfaktor zur Kompensation des Schwarzschild-Effektes (Reciprocity Factor) betrug beim Ektachrom-Diafilm 6, beim T<sub>max</sub>-Film war er bei 3.

Der Belichtungsmodus wurde bei der Photographie von Fluoreszenz-Aufnahmen auf 2,50 - 3,20 eingestellt (Exposure Adjustment), bei

Doppelbelichtung auf 4,00. Es wurden in der Regel 60-fach und 100-fach vergrößernde Öl-Immersionsojektive (SPlanApo 60 PL und SPlanApo 100, Numerische Apertur jeweils 1,40) mit einer 2,5-fachen Nachvergrößerung verwendet.

### **3. 2. 2. 5. Digitale Bildverarbeitung**

Mikroskopische Aufnahmen wurden unter Verwendung einer Videokamera mit einem vorgeschalteten Objektiv in ein Computer-System zur digitalen Bildverarbeitung (Vidas 2.1., Firma Kontron) übertragen. Die Aufnahme eines Objektmikrometers wurde ebenso transferiert und damit die Darstellungseinheiten des Bildschirms (Pixel) für die jeweilige Vergrößerung in  $\mu\text{m}$  geeicht. Die digitalisierten Proben-Aufnahmen wurden zuerst einer Optimierung der Graustufen unterzogen; danach wurde mathematisch ein Hintergrund-Bild generiert, das vom Originalbild subtrahiert werden konnte. Durch einen interaktiven Binarisierungsprozeß, bei dem Originalbild und Hintergrund-Bild verglichen wurden, konnte das Graustufen-Bild in ein Schwarz-Weiß-Bild umgewandelt werden, daß die markierten Strukturen weiß vor schwarzem Hintergrund zeigte. Dieser Prozeß ist eine Voraussetzung für eine morphometrische Auswertung der markierten Strukturen. Das binäre Bild konnte noch bearbeitet werden, indem etwa Reste an nicht-markierten Strukturen, die bei der Binarisierung nicht eliminiert worden waren, gelöscht wurden (z.B. fluoreszierende Staubpartikel). Ebenso konnten nahe aneinanderliegende vesikuläre Strukturen, die vom Computer nicht als getrennte Objekte erkannt wurden entsprechend separiert werden. Von den bearbeiteten binären Bildern wurden verschiedene Objekt-Parameter gemessen (Durchmesser, Umfang, Fläche, Form etc...) und anschließend statistisch ausgewertet.

### **3. 2. 3. PRÄPARATIVE METHODEN**

#### **3. 2. 3. 1. Präparation von FITC-Dextran**

Kommerziell erhältliches FITC-Dextran mit 70 kDa (Sigma) wurde in einer Konzentration von 35 mg/ml in A. bidest. aufgelöst und mehrfach dialysiert. Es

wurde zuerst 2 - 3 mal gegen je 200 Volumen TBS dialysiert, danach 4 - 6 mal gegen je 200 Volumen PBS. Jeder Dialyse-Schritt dauerte mindestens 2 h. Der letzte Dialyse-Schritt wurde über Nacht durchgeführt. Bei Verwendung als Marker im Perfusionssystem wurde als letzter Dialysepuffer KHB eingesetzt. Die Reinheit eines unter diesen Bedingungen dialysierten FITC-Dextrans wurde durch Gelfiltration auf einer Sephacryl S200 High Resolution-Säule (Pharmacia) überprüft. Es konnte keine Kontamination mit freiem FITC detektiert werden (Dies war bei nicht-dialysiertem FITC-Dextran schon der Fall).

### **3. 2. 3. 2. Präparation von Asialo-Orosomuroid (ASOR)**

Humanes  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein (Sigma G-9885, Lot: 57F-9319) wurde mit immobilisierter Neuraminidase (0,0025 units/mg  $\alpha_1$ -saurem Glykoprotein) nach der Vorschrift von Dunn et al., (1979) desialyliert. Dazu wurden die Neuraminidase-beads (Sigma N-4883, Lot: 31H-9595) 10 min bei 12000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge pelletiert, in 1 ml 0,1 mol/l Acetatpuffer (pH = 5,0) suspendiert, wiederum zentrifugiert und durch dreimalige Wiederholung des Vorganges gewaschen. Das  $\alpha_1$ - saure Glykoprotein wurde in Acetatpuffer aufgelöst und das letzte Neuraminidase-Pellet darin suspendiert. Die Desialylierung erfolgte durch Inkubation bei 37°C für 48 h, wobei die immobilisierte Neuraminidase durch ununterbrochene Rotation des Reaktionsgefäßes in Suspension gehalten wurde. Danach wurden die Neuraminidase-beads durch zweimalige Zentrifugation (je 10 min 12000 rpm) entfernt.

### **3. 2. 3. 3. Biotinylierung von Asialo-Orosomuroid**

Das nach Abzentrifugierung der Neuraminidase-beads im Überstand enthaltene Asialoglykoprotein (ASOR) wurde für die Biotinylierung in 50 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (pH 8,5) überführt. Dazu wurde hydratisiertes Sephadex G25 (Pharmacia) in einer kleinen Säule (ca. 10-faches Probenvolumen) mit dem NaHCO<sub>3</sub>-Puffer äquilibriert (mit mindestens 5 Säulenvolumen), 5 min bei 300 g zentrifugiert, das im Acetatpuffer gelöste ASOR auf das obere

Säulenende aufgebracht, und die Säule wiederum unter exakt den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dabei wird das ASOR in das NaHCO<sub>3</sub>-Zentrifugat überführt. Die Biotinylierungsreaktion wurde nun mit NHS-LC-Biotin von Pierce mit einem molaren Verhältnis Biotin : ASOR = 10 : 1 bei 4°C für 2 h durchgeführt. Durch Zentrifugation des Reaktionsgemisches in einer Sephadex G25-Säule, die mit PBS äquilibriert worden war, wurde ungebundenes Biotin entfernt und das biotinylierte ASOR (BASOR) in PBS überführt.

### **<sup>125</sup>J-Jodierung von Proteinen**

Für die Jodierung von Proteinen wurde eine kurze Pasteur-Pipette mit Anionen-Austauscher gefüllt (Dowex 1x2, 400, Sigma) und mit PBS/1% BSA äquilibriert; danach wurde mit PBS gespült. 1 mCi <sup>125</sup>JNa (in 100 µl PBS) wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem in PBS gewaschenen, auf Filterpapier getrocknetem Iodo bead (Firma Pierce) 10 min bei R.T. inkubiert, dann wurden 50 µl Proteinlösung in PBS (50 µg) zugesetzt und 30 min bei R.T. jodiert. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem das Reaktionsgemisch auf die Anionen-Austauschsäule aufgetragen und mit 500 µl Portionen PBS eluiert wurde. Es wurden 500 µl-Fraktionen gesammelt, und die Radioaktivität, die TCA-Präzipitierbarkeit, sowie die spezifische Aktivität (cpm/µg Protein) wurden für jede Fraktion bestimmt (wie unter 3. 2. 4. 6. beschrieben). Für die verschiedenen Versuche wurde jene Fraktion eingesetzt, die die höchste spezifische Aktivität und die höchste Präzipitierbarkeit aufwies.

### **3. 2. 3. 4. Präparation von galaktosyliertem Avidin**

Die Synthese eines 3-(2-Aminoethylthio)propyl-β-D-Galaktopyranosids und dessen Konjugation an Avidin wurden am Institut für Chemie der Universität für Bodenkultur von Andreas Reiter unter der Leitung von Prof. P. Kosma durchgeführt.

Als Ausgangssubstanz wurde 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-galaktopyranosyl-Bromid verwendet, das durch eine Helferich-Glykosidierung mit Allyl-Alkohol und Hg(CN)<sub>2</sub> in Allyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-Galaktopyranosid umgesetzt

wurde. Durch eine Zemplén-Verseifung wurden die Acetyl-Schutzgruppen abgespalten. Das entstandene Allyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid wurde in Ethanol auskristallisiert. An diese Verbindung wurde unter UV-Bestrahlung (durch eine Michael-Addition) Cysteamin-Hydrochlorid angelagert. Dabei entsteht 3-(2-aminoethylthio)propyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid, das durch Ionenaustausch-Chromatographie auf einer Dowex 50-Säule (bis zu einem pH-Wert von 5,0 mit 0,1 mol/l  $\text{NH}_3$  vorgespülter  $\text{H}^+$ -Kationenaustauscher) vom Reaktionsgemisch abgetrennt wurde. Die Fraktionen mit dem Reaktionsprodukt wurden zusammengeführt, eingengt und lyophilisiert. Das Produkt wurde durch  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR identifiziert. Das gereinigte 3-(2-aminoethylthio)propyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid wurde durch Thiophosgen in Chloroform aktiviert. Dabei entsteht 3-(2-isothiocyanoethylthio)propyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid, das für die Konjugation mit Avidin eingesetzt wurde. Es wurden drei verschiedene Avidin-Konjugate synthetisiert, in denen die molaren Verhältnisse des aktivierten Galaktopyranosids zum Avidin bei der Synthese ca. 40:1, 75:1 und 300:1 waren. Die Konjugation wurde in 0,1 mol/l  $\text{NaHCO}_3$  für 48 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Einengung der Lösungen wurden die Konjugate durch Gelchromatographie (Sephadex G25 in 0,01 mol/l  $\text{NaHCO}_3$ ) von der nicht umgesetzten aktivierten Galaktopyranosid-Verbindung abgetrennt. Zur Ermittlung der Ligand-Belegung der drei verschiedenen Konjugate wurden der Protein- und der Zuckergehalt gemessen. Die Protein-Bestimmung wurde nach der BCA-Methode der Firma Pierce mit Avidin als Standard durchgeführt; für die Zucker-Bestimmung wurde ein Orcintest mit Allyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid als Standard eingesetzt (Methode nach Bial). Für die beiden Konjugate mit höherem molarem Verhältnis des  $\beta$ -D-Galaktopyranosid-Derivats zum Avidin während der Synthese (75:1 und 300 : 1) wurde eine Ligand-Belegung nahe am theoretisch möglichen Wert von 65 : 1 festgestellt, beim Konjugat mit der schwächsten Belegung wurde ein Wert von ca. 40 : 1 gemessen.

### **3. 2. 3. 5. Beladung von Endosomen und Lysosomen**

#### **3. 2. 3. 5. 1. Beladung früher Endosomen mit Biotin-ASOR, Avidin oder FITC-Dextran**

Kinetisch frühe Endosomen von Hepatozyten konnten spezifisch mit BASOR markiert werden, das über Rezeptor-vermittelte Endozytose via

Asialoglykoprotein-Rezeptoren aufgenommen wird. Dazu wurde die Leber nach der Vorperfusion 3 min bei 37°C mit 250 - 500 µg BASOR in 120 ml KHB + 2 mg/ml BSA beladen.

Die Markierung früher Endosomen mit Avidin erfolgte über Fluid-Phase Endozytose durch rezirkulierende Perfusion bei 16°C für 2 h mit 200 ml KHB, dem 0,5 - 1 mg/ml Avidin, 0,5 - 1 mg/ml Mannan und 2 mg/ml BSA zugesetzt wurden. Das Mannan wurde zugefügt, um die Mannose-abhängige Bindung von Avidin an Makrophagen oder Endothelzellen zu unterbinden.

Die Beladung früher Endosomen durch FITC-Dextran wurde ebenfalls durch Fluid-Phase-Endozytose erreicht. Dabei wurde jedoch die Leber bei 37°C für 1 min markiert (mit 10 mg/ml).

### **3. 2. 3. 5. 2. Beladung später Endosomen mit Biotin-ASOR, <sup>125</sup>J-ASOR oder gal-Avidin**

Die Beladung kinetisch später Endosomen mit BASOR oder <sup>125</sup>J-ASOR wurde erzielt, indem nach einer Pulsmarkierung bei 37°C für 1 min mit 500 µg BASOR, bzw. 14 x 10<sup>6</sup> cpm <sup>125</sup>J-ASOR (TCA-Präzipitierbarkeit: 97%) weitere 10 min bei 37°C ohne Marker perfundiert wurde.

Die Selektivität der angegebenen Markierungsbedingungen für frühe, bzw. späte Endosomen wurde mit Hilfe von trägerfreier Elektrophorese (Free-Flow Electrophoresis) und morphologischer Untersuchungen gezeigt.

Um späte Endosomen spezifisch mit einem Avidin-Derivat markieren zu können, wurde galaktosyliertes Avidin verwendet, das ebenfalls über den Asialoglykoprotein-Rezeptor endozytiert wird (dies wurde durch Kompetitierungsversuche mit ASOR überprüft). Die Markierung wurde 3 min bei 37°C mit 1 mg/ml gal-Avidin (R1-Fraktion) + 2 mg/ml Mannan, + 2 mg/ml BSA durchgeführt, gefolgt von 10 min Perfusion bei 37°C ohne Marker.

### **3. 2. 3. 5. 3. Beladung von Lysosomen mit Biotin-Dextran und FITC-Dextran**


Die Beladung von Lysosomen wurde erreicht, indem 10 mg Biotin-Dextran und 20 mg FITC-Dextran (in 0,8 ml PBS gelöst) intravenös in das narkotisierte Versuchstier injiziert wurden. Die Aufnahme erfolgte ca. 2 h *in situ*; danach wurde 1 h *in situ* bei 37°C mit Marker-freiem KHB perfundiert, damit der Anteil des Markers, der sich noch in Endosomen befindet, zu den Lysosomen weitertransportiert wird.

### **3. 2. 3. 6. Homogenisierung der Leber**

Nach jedem Markierungsvorgang wurde die Leber sofort durch Perfusion mit 200 ml eiskaltem Hanks-Puffer + 5 mmol/l EGTA abgekühlt (das EGTA wurde zugegeben, um extrazellulär gebundene Liganden des Asialoglyko-protein-Rezeptors zu entfernen). Danach wurde mit 50 ml eiskaltem KAcSHM-Puffer, dem 2 µg/ml Leupeptin, 0,7 µg/ml Pepstatin und 50 µg/ml PMSF als Protease-Inhibitoren zugesetzt waren, perfundiert. Die Leber wurde anschließend in etwa 1 cm große Stücke zerschnitten; pro g Leber wurden 3 ml KAcSHM-Puffer + Protease-Inhibitoren zugegeben und nach Überführung in einen 40 ml Glas-Dounce Homogenisator wurden die Leberstücke durch 5 bis 7 Stöße des locker sitzenden Stößels ("loose-fitting") und 1 bis 2 Stöße des fester sitzenden ("tight-fitting") homogenisiert.

Für Lysosomen-Präparationen wurde KCISHM- anstatt KAcSHM-Puffer verwendet.

### **3. 2. 3. 7. Präparation von postnukleärem Überstand, Mikrosomen, Endosomen-angereicherten Golgi-Fractionen und Lysosomen**

Das Leber-Homogenisat wurde in einem Festwinkelrotor (Sorvall SS-34) bei 1  g 10 min zentrifugiert, und der Überstand im gleichen Rotor nochmals 10 min bei 3400 g zentrifugiert. Dabei wurden Gewebeteile, nicht aufgebrochene Zellen, sowie Zellkerne abgetrennt. Der zweite Überstand wurde als postnukleärer Überstand (postnuclear supernatant: PNS) bezeichnet, und konnte aufgrund seines Cytosolgehaltes direkt bei *in vitro*-Fusionsexperimenten eingesetzt werden.

Mikrosomen wurden aus dem postnukleären Überstand präpariert, indem die Membrankomponenten bei 42000 g für 70 min pelletiert wurden. Nach Absaugen des Cytosol-Überstandes wurde das Membran-Pellet in den entsprechenden Puffer aufgenommen und durch 6 Stöße in einem "tight-fitting" Dounce-Homogenisator (7 ml Fassungsvermögen) resuspendiert. Dafür wurde normalerweise nur ein Sechstel bis ein Viertel des ursprünglichen PNS-Volumens verwendet, um eine höhere Vesikelkonzentration zu erreichen.

Endosomen-angereicherte Golgi-Fractionen wurden durch eine sogenannte "Float-up Gradientenzentrifugation" präpariert. Dafür wurde das mikrosomale



Pellet in 4 ml 1,15 mol/l (Endkonzentrationen) Saccharose resuspendiert (unter Verwendung des "tight-fitting" Dounce-Homogenisators), und diese Suspension in einem Zentrifugationsröhrchen mit je 4 ml 1,0 mol/l Saccharose und 4 ml 0,25 mol/l Saccharose überschichtet. Dieser Stufengradient wurde in einem Ausschwingrotor (Sorvall TH-641 oder Beckman SW-41) 1,5 h bei 40000 rpm (200000 g) zentrifugiert. Endosomen steigen unter diesen Bedingungen bis zur Interphase zwischen 1,0 und 0,25 mol/l Saccharose auf. Das Membranmaterial der Interphase wurde mit Hilfe einer Spritze abgesaugt und mit dem entsprechenden Fusionspuffer (normalerweise KAcSHM-Puffer) auf etwa 25 ml aufgefüllt. Diese Suspension wurde nochmals 70 min bei 42000 g im SS-34 Rotor zentrifugiert, das Pellet in etwa 1 ml Fusionspuffer aufgenommen und in einem 2 ml "tight-fitting" Dounce-Homogenisator durch 6 Stöße resuspendiert. Die letzte Zentrifugation erfolgte, um eine unkontrolliert hohe Saccharose-Konzentration, die die Fusion stören könnte, zu verhindern. Diese Endosomen-angereicherte Golgi-Fraktion wird in der Folge im Sinne einer Vereinfachung als Endosomen-Fraktion bezeichnet.

Für eine Lysosomen-Präparation wurde das Leberhomogenisat nur einmal bei 500 g für 10 min zentrifugiert (um nicht zu viele Lysosomen im Pellet zu verlieren). Der Überstand wurde im SS-34 Rotor 10 min bei 27000 g zentrifugiert; das lysosomale Pellet wurde in KCISHM-Puffer + Protease-Inhibitoren (einem Sechstel des ursprünglichen PNS-Volumens) aufgenommen und durch 4 Stöße in einem "loose-fitting" Dounce-Homogenisator (7 ml) resuspendiert.

Die verschiedenen Membranpräparationen wurden in 50 - 300 µl Aliquots (in 500 µl Eppendorf-Gefäßen) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt. Es konnte keine Reduktion der Fusionsfähigkeit im Lauf der Lagerung (innerhalb von 2 Jahren) nachgewiesen werden.

### **3. 2. 3. 8. Cytosol-Präparation**

Nach 10 min Vorperfusion bei 37°C wurde die isolierte Leber durch Perfusion mit eiskaltem KHB für etwa 7 min auf 4°C abgekühlt und anschließend mit 50 ml des entsprechenden kalten Fusionspuffers (KAcSHM, KCISHM, SHM oder KCIHM) perfundiert. Die Leber wurde in kleine Stücke geschnitten, und nach Zugabe von Fusionspuffer (2-2,5 ml/g Leber) mit 6 Stößen im "loose-fitting" und 2 Stößen im "tight-fitting" Dounce homogenisiert.

Protease-Inhibitoren wurden nicht zugegeben, um Proteasen, die bei der Fusion möglicherweise eine Rolle spielen (siehe Pitt & Schwartz, 1991), nicht zu beeinträchtigen. Das Homogenisat wurde 10 min bei 12000 g im SS-34 Rotor zentrifugiert und der Überstand nochmals 60 min bei 100000 g (in einem Ausschwingrotor: Sorvall AH-629 mit 29000 rpm). Das auf der Oberfläche schwimmende Fett wurde abgesaugt, der klare Zentrifugationsüberstand (=Cytosol) aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Die Proteinkonzentration dieser Cytosol-Präparation lag bei etwa 30 - 45 mg/ml.

### **3. 2. 3. 9. Präparation peripherer Membranproteine**

(nach Colombo et al., 1991, modifiziert)

Die Präparation erfolgte aus Mikrosomen, bzw. aus Endosomen-Fractionen. Die Membransuspension (6 x 175 µl) wurde zuerst 5 min bei 50000 g in der Airfuge (Beckman) zentrifugiert, das Pellet wurde zum Öffnen der Vesikel mit hypotonem Puffer gewaschen (20 mmol/l HEPES-KOH, pH 7,0; 0,5 mmol/l EGTA) und 15 min bei 200000 g nochmals pelletiert. Die Pellets dieser zweiten Zentrifugation wurden zusammengefaßt und in 175 µl KCl-Puffer suspendiert (0,5 mol/l KCl in 20 mmol/l HEPES-KOH pH 7,0/0,5 mmol/l EGTA, wie oben); somit 6-fach konzentriert und 30 min auf Eis inkubiert. Bei dieser Inkubation unter hohen Salzkonzentrationen werden periphere Membranproteine von ihren Membranen abgelöst. Die Suspension wurde noch einmal 15 min bei 200000 g in der Airfuge zentrifugiert, der Überstand (KCl-Extrakt) wurde durch Zentrifugation über eine 2 ml G25 Sephadex-Säule (in KAcSHM-Puffer äquilibriert) entsalzt, und die periphere Membranprotein-Präparation wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Bei Mikrosomen als Ausgangsmaterial war die Proteinkonzentration dieser Präparation ca. 2,9 mg/ml, bei Endosomen als Ausgangsmaterial ca. 0,25 mg/ml.

### **3. 2. 3. 10. Präparation polymerisierter Mikrotubuli**

a) Bei Fusionstest wurde der Einfluß polymerisierter Mikrotubuli untersucht, indem das endogene Tubulin des Cytosols durch Taxol (20 µmol/l; aus 2

mmol/l Stammlösung in DMSO) polymerisiert wurde (nach Bomsel et al., 1990: jedoch 9 mg/ml Cytosol an Stelle von 0,5 mg/ml)

b) Beim Versuch die Segregation von ASOR und pIgA *in vitro* zu rekonstituieren wurden polymerisierte Mikrotubuli nach der Methode von Goltz et al. (1992) präpariert.

900 µl Cytosol (35 mg/ml) wurden in Gegenwart von 1 mmol/l GTP; 10 µmol/l Taxol, 1 mmol/l DTT, 2 µg/ml Leupeptin und 50 µg/ml PMSF 30 min bei 37°C inkubiert; die entstandenen Mikrotubuli wurden 15 min bei 19000 g pelletiert, und das Pellet wurde in der Versuchslösung, die DTT, Taxol, Leupeptin und PMSF in der gleichen Konzentration enthielt, suspendiert.

### **3. 2. 4. ANALYTISCHE METHODEN**

#### **3. 2. 4. 1. Proteinbestimmung nach Bradford**

Das Bradford-Reagens wurde hergestellt, indem 100 mg Coomassie G250 in 50 ml 95% Ethanol unter Rühren über Nacht gelöst wurden, nach Zugabe von 100 ml 85% (w/v) Phosphorsäure die Lösung auf 1000 ml mit A. bidest. verdünnt und filtriert wurde.

Für den normalen Testansatz wurden 1 - 10 µg Protein in 100 µl eingesetzt (10 - 100 µg/ml); 1 ml Bradford-Reagens wurde zur Probe zugemischt; frühestens nach 2 min (spätestens nach 60 min) wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Standard wurde BSA verwendet.

Für die Messung auf 96-well Platten wurden 0 - 20 µl Probe pro Reaktionsfeld vorgelegt (Protein: absolut etwa 0 - 5 µg), es wurden 200 µl Bradford-Reagens (mit der Multikanal-Pipette) zupipettiert und nach etwa 5 min wurde die Extinktion mit einem ELISA-Meßgerät (Dynatech MR7000) bei 630 nm im Einzelwellenlängen-Modus gemessen. Als Standard wurde BSA (1 - 7 µg) eingesetzt; die Standardkurve wurde nach einem optimierten Algorithmus

errechnet (Geräte-Einstellung: beste Kurven-Anpassung = "Auto-curve fitting"). In den meisten Fällen errechnete sich eine semilogarithmische Standardkurve.

### **3. 2. 4. 2. Bestimmung der Peroxidase (HRP)**

Zur Bestimmung der Peroxidase-Aktivität wurden die Proben in 96-well Platten vorgelegt. Als Puffer wurde Citrat-/Phosphatpuffer verwendet (3.65 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.82 g Citronensäure-Monohydrat in 500 ml A. bidest. - auf pH 5.0 eingestellt). Als Substrat wurde o-Phenylendiamin (1 mg/ml) unmittelbar vor der Messung im Puffer aufgelöst, anschließend wurden 0,4  $\mu\text{l}/\text{ml}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugemischt und 200  $\mu\text{l}$  der Lösung mit der Mehrkanal-Pipette im Zeittakt zu den Proben pipettiert. Die Proben wurden etwa 2 - 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, und die Reaktion im gleichen Zeittakt wieder abgestoppt, indem je 50  $\mu\text{l}$  2 mol/l  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zupipettiert wurden. Als Standards wurden HRP-Proben (0 - 4 ng) verwendet, die im gleichen Puffer wie die Proben verdünnt waren. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde mit einem Dynatech MR 7000 ELISA-Reader die Extinktion der Proben bei 490 nm mit einer Referenzmessung bei 630 nm bestimmt.

Es konnte keine Beeinflussung der HRP-Bestimmung durch in der Probe vorhandenes FITC-Dextran detektiert werden.

### **3. 2. 4. 3. Messung der $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase-Aktivität**

$\beta$ -N-Acetylhexosaminidase ist ein lysosomales Enzym, das jedoch auch in Endosomen in aktiver Form vorliegen kann. Es wurde als Marker-Enzym für die Position von Lysosomen und Endosomen in Percoll-Gradienten eingesetzt. Die Enzymbestimmung wurde in 96-well Platten durchgeführt. Als Substrat wurde p-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-Gluko-pyranosid in einer Konzentration von 10 mmol/l verwendet (3,43 mg/ml in 0,1 mol/l Na-Citrat/0,04%  $\text{NaN}_3$ -Puffer mit pH 4,6). 20  $\mu\text{l}$  Probe wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Substrat-Puffergemisch bis zu 60 min bei 37°C inkubiert (wobei bei Percoll-Gradienten eine Trübung auftritt), und die Reaktion wurde durch 100  $\mu\text{l}$  1 mol/l Glycin/NaOH (pH 10,4) abgestoppt (beim Vermischen verschwindet die Percoll-Trübung wieder). Die Extinktion der Proben bei 405 nm wurde in einem ELISA-Reader (Dynatech MR 7000) gemessen. Es konnte ein Reagenzien-Leerwert (Citratpuffer + Glycinlösung), ein Enzym-Leerwert (Probe +

Citratpuffer ohne Substrat + Glycinlösung) und ein Substrat-Leerwert (Substratpuffer + Glycinlösung, ohne Enzym) ermittelt werden.

#### **3. 2. 4. 4. Fluorimetrische Messung von FITC und Texas Rot**

Es wurde ein Spektralfluorimeter FP-777 der Firma Jasco (Japan) verwendet.

Die für dieses Gerät optimalen Anregungs- und Emissionswellenlängen von FITC und Texas-Rot wurden iterativ ermittelt.

Dabei wurde das Emissionsspektrum bei der in der Literatur angegebenen Anregungswellenlänge aufgezeichnet; die Wellenlänge des Emissionsmaximums wurde bestimmt (über das Maximum-Suchprogramm des Gerätes) und bei dieser Wellenlänge wurde das Anregungsspektrum aufgezeichnet. Bei der Wellenlänge mit der maximalen Anregung wurde dann wieder das Emissionsspektrum aufgenommen und mit der ersten Messung verglichen. Die erzielten Werte waren in der Regel nahe an den Literaturwerten.

FITC-Dextran wurde bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm (Bandbreite 10 nm) und einer Emissionswellenlänge von 520 nm (Bandbreite 10 nm) gemessen. Die Spannung des Sekundärelektronen-Vervielfachers (Photo Multiplier Tube, PMT) wurde manuell auf 0,4 kV eingestellt; die Dauer der Mittelung des Meßwerts auf 2 sec. Es wurde eine Standardkurve mit 8 Standards zwischen 0 und 0,35 µg/ml FITC-Dextran aufgenommen und gemeinsam mit den Meßparametern auf Diskette gespeichert. Die folgenden Messungen wurden unter exakt den gleichen Bedingungen durchgeführt und die gespeicherte Standardkurve wurde bei jedem Versuch überprüft.

Texas-Rot-Albumin wurde bei einer Wellenlänge von 585 nm angeregt und die Emission bei 605 nm gemessen. Die Einstellung der Bandbreiten, des Verstärkers und der Meßdauer war wie bei der FITC-Dextran-Messung. Es wurde ebenso eine Standardkurve aufgenommen und gespeichert.

Proben (z.B. Galletropfen) wurden normalerweise in 2 ml PBS (genau pH 7,4) + 0,1% Triton X100 in Kunststoff-Küvetten gemessen. Bei der Messung von Galleproben wurde mit jener Galle, die vor der Markierung gebildet wurde, der Nullwert definiert.

#### **3. 2. 4. 5. Messung der Azidifizierungsfähigkeit von Endosomen**

Endosomen oder Lysosomen wurden durch Perfusion der Leber mit FITC-Dextran markiert und präpariert (wie unter 3. 2. 3. 5. und 3. 2. 3. 7. beschrieben). Für die Messung der Azidifizierung wurden nur gereinigte Fraktionen verwendet. Von den Endosomen wurde sowohl die 0,86/1,0 mol/l Saccharose-Interphase, als auch die 0,86/0,25 mol/l Saccharose-Interphase eingesetzt.

10 - 100 µl der Präparation (je nach Fluoreszenzsignal) wurden in 2,0 ml Azidifizierungspuffer (20 mmol/l HEPES pH 7,4; 5 mmol/l MgSO<sub>4</sub>; 150 mmol/l KCl) suspendiert und äquilibriert (2 h auf Eis). Anschließend wurde der Fluoreszenzverlauf dieser Probe über die Zeit kontinuierlich im Fluorimeter gemessen (Time Scan-Modus; Anregung: 488 nm ± 1,5 nm; Emission: 520 nm ± 5 nm; Sekundärelektronen-Vervielfacher: manuell auf 0,7 kV eingestellt; Integrationsdauer: 2 sec.). Nach etwa 15 min wurden 10 µl Dikalium-ATP-Lösung (Vanadat-frei; 500 mM; titriert auf pH7,4) zugegeben (Endkonzentration: 2,5 mmol/l). Durch die Ansäuerung des Lumens aufgrund der Aktivierung der H<sup>+</sup>-ATPase kommt es zu einer Abnahme der FITC-Fluoreszenz. Nach Erreichen eines Gleichgewichts (5 - 10 min nach der ATP-Zugabe) wurde ein Ionophor zugesetzt (4 µl 500 µmol/l Nigericin), wodurch der Innere pH-Wert mit dem äußeren gleichgeschaltet wird, und die Fluoreszenz wieder ansteigt. Im Fall von FITC-Dextran als Marker war der Anteil der extra-vesikulären Fluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz allerdings signifikant. Durch Messung der Probe in Ionen-freien HEPES- und MES-Puffern verschiedener pH-Werte konnte dieser Anteil errechnet werden, da unter diesen Bedingungen die intravesikuläre Fluoreszenz konstant bleibt. Der Abzug der errechneten extravesikulären Fluoreszenz von der Gesamtfluoreszenz ergab jedoch nur ein geringes Restsignal, aus dem aufgrund der Variabilität des Signals nicht mit ausreichender Sicherheit ein pH-Wert für das endosomale Lumen bestimmt werden konnte. Deshalb wurde aus diesen Experimenten nur der qualitative Schluß gezogen, ob markierte endocytische Kompartimente in der Lage sind, ihr Inneres anzusäuern, oder nicht.

### **3. 2. 4. 6. Messung der TCA-präzipitierbaren und nicht-präzipitierbaren <sup>125</sup>J-Radioaktivität**

Die Radioaktivität <sup>125</sup>J-markierter Proben wurde in einem γ-Strahlen-Meßgerät (1282-Compugamma CS, LKB) nach Überprüfung des Energie-spektrums der jodinierten Proben durch Messung der Kanäle 30 - 130 quantifiziert. (Die Strahlungsenergie von 10 - 2000 keV ist auf diesem Gerät logarithmisch in 256

Kanäle eingeteilt). Die Hintergrundstrahlung von 20 cpm wurde bei der Messung abgezogen. Je nach Aktivität der Proben wurden verschiedene Zählprogramme mit einer Messung zwischen 30 sec. und 10 min benutzt. Zur Bestimmung der Protein-gebundenen Radioaktivität wurde das Eiweiß der Proben 30 min bei 0°C mit Trichloressigsäure (TCA: Endkonzentration: 10%) gefällt; das Präzipitat wurde 15 min bei 13000 g in einer auf 4°C gekühlten Mikrozentrifuge pelletiert und vom Überstand wurde das halbe Ausgangsvolumen entnommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert. Die Radioaktivitäten der beiden Proben-Teile wurden gemessen. Der summierte Wert der beiden Proben ergab die Gesamt-Aktivität, die Aktivität der Präzipitat-Probe (Pellet + 1/2 Überstand) minus dem Wert der Probe des halben Überstands ergab die präzipitierbare Aktivität, die in Prozent der Gesamt-Aktivität ausgedrückt werden konnte.

### **3. 2. 4. 7. SDS-PAGE**

Das Prinzip der Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde von Lämmli (1970) beschrieben.

Für die Na-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde das Phastsystem der Firma Pharmacia verwendet. Es wurden fertige Gele derselben Firma mit 7,5% und 12,5% Polyacrylamid-Anteil im Trenngel eingesetzt. (Sammelgel: jeweils 5% und 6%). Das Puffersystem der Gele bestand aus 0,112 mol/l Acetat und 0,112 mol/l Tris/HCl pH 6,5. Die SDS-Pufferstreifen, die auch den Kontakt zu den Elektroden herstellten, enthielten 0,2 mol/l Tricin, 0,55% SDS und 0,2 mol/l Tris/HCl pH8,1. Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen (nicht-reduzierend: 6,25 ml 1 mol/l Tris pH 6,8; 25 ml 4% SDS (w/v in A. bidest.); 5 ml Glycerin; 5 mg Bromphenol-Blau und 13,8 ml A. bidest.; reduzierend: + 11,3 ml A. bidest. + 2,5 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol oder + 13,8 ml A. bidest. + 50  $\mu$ l 2,6 mol/l DTT) und 3 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde nach den Firmenangaben, sowohl unter reduzierenden, als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen bei 15°C durchgeführt bis 65 - 70 Voltstunden erreicht waren. Die Grenzwerte für Spannung, Stromstärke und Leistung wurden auf 250 V, 10 mA und 3 W eingestellt. Der Probenauftrag erfolgte bei 1 mA.

Als Molekulargewichtsmarker wurde eine Mischung folgender Proteine verwendet:

$\alpha_2$ -Makroglobulin	180.0 kDa
$\beta$ -Galaktosidase	116.0 kDa
Fructose-6-Phosphat-Kinase	84.0 kDa
Pyruvat-Kinase	58.0 kDa
Fumarase	48.5 kDa
Laktat-Dehydrogenase	36.5 kDa
Triose-Phosphat-Isomerase	26.6 kDa

### 3. 2. 4. 8. Silberfärbung

Die Färbung der Proteine wurde ebenfalls mit dem Phastsystem der Firma Pharmacia unter Einsatz des Programmes "Sensitive Silver-Stain" nach folgenden Schritten durchgeführt:

- 1) Waschen des Gels in 50% Ethanol/10% Essigsäure: 2 min bei 50°C
- 2) Sensitivierung des Gels in 8,3% Glutaraldehyd: 6 min bei 50°C
- 3) Waschen in A. bidest.: zweimal jeweils: 2 min bei 50°C
- 4) 0,25% AgNO<sub>3</sub> in A. bidest. 13 min bei 40°C
- 5) Waschen in A. bidest.: zweimal jeweils: 0,5 min bei 30°C
- 6) 0,015% Formaldehyd/2,5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (frisch): 0,5 min bei 30°C
- 7) 0,015% Formaldehyd/2,5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 4 min bei 30°C
- 8) 5% Essigsäure: 2 min bei 50°C
- 9) 10% Essigsäure/5% Glycerin 3 min bei 50°C

Die Sensitivität dieser Färbung liegt bei 0,3 - 0,5 ng Protein/Bande.

### 3. 2. 4. 9. Auswertung der SDS-PAGE

Die gefärbten Gele wurden einer densitometrischen Auswertung auf einem Ultrosan XL (Pharmacia) unterzogen. Unter Verwendung eines Computers und einer entsprechenden Software (Gelscan XL, Pharmacia) wurden die Positionen der Standards ermittelt, daraus eine Standardkurve (Logarithmus



des Molekulargewichts gegen die Wanderungsstrecke) errechnet, und das Molekulargewicht der Probenbanden nach dieser Standardkurve bestimmt. Die relativen Anteile der einzelnen Protein-Banden wurden nach Integration der entsprechenden Intensitätskurven-Bereiche ermittelt.

### **3. 2. 4. 10. *In vitro*-Fusionstest**

Der Fusionstest wurde normalerweise in KAcSHM-Puffer ausgeführt, der 0,2% BSA, 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l DTT, 20 µmol/l EGTA und 50 µg/ml Biocytin enthielt. Das Biocytin wurde zugesetzt, um alle freien Bindungsstellen von extravasikulärem Avidin zu blockieren, damit es zu keinem Artefakt-Fusionssignal mit extravasikulärem BASOR (bzw. Biotin-Dextran) kommt. Cytosol wurde in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (0 - 25 mg/ml). Um die für die Fusion notwendige Reaktionsenergie zur Verfügung zu stellen, wurde ein ATP-regenerierendes System zugesetzt (Endkonzentrationen: 1 - 2,5 mmol/l Kalium-ATP, 5 - 8 mmol/l Phosphokreatin und 11 units/ml Phosphokreatin-Kinase). Um die ATP-Abhängigkeit der Fusion zu zeigen, wurde zu einigen Proben ein ATP-verzehrendes Reaktionssystem zugefügt (5 units/ml Hexokinase, 10 mmol/l Deoxy-Glukose), diese Proben dienten auch als Leerwert der Fusionsreaktion.

Nach Mischung aller notwendigen Reagenzien (auf Eis), wurde zehnfach konzentrierter Fusionspuffer in dem Ausmaß zugegeben, daß die gewünschte normale Endkonzentration erreicht wurde, und somit die Osmolarität im physiologischen Bereich lag. Danach wurde die Avidin-hältige Endosomen-Präparation hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die BASOR, bzw. Biotin-Dextran hältige Probe wurde erst nach etwa 5 min zugemischt, um zu gewährleisten, daß das extravasikuläre Avidin bereits vorher durch Biocytin-Bindung blockiert ist.

Zur Untersuchung des Einflusses von N-Ethylmaleinimid (NEM) wurden die Proben 20-30 min bei 0°C mit NEM (1,5-3 mmol/l; Stammlösung: 300 mmol/l in Ethanol) inkubiert und überschüssiges NEM durch Zugabe von DTT (3-6 mmol/l) inaktiviert. Es wurde entweder die gesamte Fusionsprobe vor dem Starten der Fusion mit NEM behandelt, oder auch die einzelnen Membranpräparationen bzw. das Cytosol vor dem Zumischen zur Fusionsprobe.

Um zu untersuchen, ob Ionen-Gradienten einen Einfluß auf die *in vitro* Fusion ausüben, wurden einige Fusionstests in Gegenwart des K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Ionophors Nigericin durchgeführt (2,5 µmol/l; Stammlösung 500 µmol/l in Ethanol).

Die Fusion wurde durch Inkubation in einem 37°C-Wasserbad gestartet und zu den entsprechenden Zeitpunkten (üblicherweise zwischen 0 und 30 min) durch heftiges Mischen mit 10-fach konzentriertem Stop-Puffer (10% Triton-X100, 1% SDS, 0,5 mg/ml Biocytin) beendet. Dabei wurden die Membranen aufgebrochen, das frei werdende Avidin jedoch sofort durch den Biocytin-Überschuß abgesättigt. Der durch die Fusion komplementär markierter Kompartimente entstandene BASOR/Avidin-Komplex (bzw. Biotin-Dextran/Avidin-Komplex) wurde mittels ELISA quantifiziert.

### **3. 2. 4. 11. ELISA**

(Schema: siehe Abb. 3. 2.)

96-well Mikrotiterplatten der Firma Greiner (Nr. 655161) wurden mit Antikörper gegen α<sub>1</sub>-sures Glykoprotein, gegen Dextran oder gegen die κ-Kette von IgA beschichtet. Der Anti-Dextran-Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Kraft, Inst. für Allg. und Exp. Pathologie, Univ. Wien, zur Verfügung gestellt (Gehalt: 5,2 mg/ml spezifischer Antikörper). Anti-α<sub>1</sub>-sures Glykoprotein (= Anti-ASOR, Sigma A-3418) wurde 1 : 750 oder 1 : 1000 verdünnt, Anti-Dextran 1 : 2000 und Anti-IgA (Serotech, AAM-08, England) 1 : 1000.

Alle Verdünnung erfolgten mit 50 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>-Puffer pH 9,6. Zur Beschichtung wurden die Platten 3 h bei 37°C (in einer Feuchtkammer) oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurden 200 µl der Antikörperlösung/Feld eingesetzt. Nach der Beschichtung wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen, 1 h bei 37°C mit Block-Puffer inkubiert und danach im Kühlschrank aufbewahrt.

Block-Puffer: 0,05 mol/l NaCl, 0,01 mol/l Tris/HCl pH 7,4, 0,001 mol/l EDTA, BSA (0,2%) SDS (0,1%), Triton X100 (1%).

Die beschichteten ELISA-Platten konnten bis zu einer Woche bei 4°C gelagert werden. Vor Verwendung wurden sie dreimal mit PBS gewaschen. Die Testlösungen, die die zu quantifizierenden Biotin-Verbindungen enthielten, wurden nach dem Abstoppen der *in vitro*-Fusion mit Block-Puffer auf 200 µl aufgefüllt und möglichst luftblasenfrei in die gewaschenen ELISA-Platten pipettiert. Zur Bindung des Biotin/Avidin-Komplexes an den

Beschichtungsantikörper wurde die Platte 3 h bei 37°C inkubiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen, 5 min bei R.T. mit Block-Puffer inkubiert und wiederum dreimal mit PBS gewaschen. An den Avidin-Anteil des Fusionsprodukts wurde nun ein HRP-gekoppelter Anti-Avidin Antikörper (Dako P360, je 200 µl 1:1000 in Block-Puffer) gebunden (durch Inkubation bei 37°C für 1 h), und der oben beschriebene Waschvorgang wurde wiederholt (3x PBS, 1x Block-Puffer, 3x PBS). In manchen Fällen wurde die Platte zur Signalverstärkung noch zusätzlich mit einem HRP-gekoppelten Mouse-Anti-Rabbit-IgG Antikörper (Dianova 1:10000 in Block-Puffer, 200 µl/well), der an den Anti-Avidin Antikörper bindet, inkubiert (1 h bei 37°C) und wie oben beschrieben gewaschen.

Die Bestimmung der HRP-Aktivität erfolgte wie unter 3. 2. 4. 2. beschrieben.

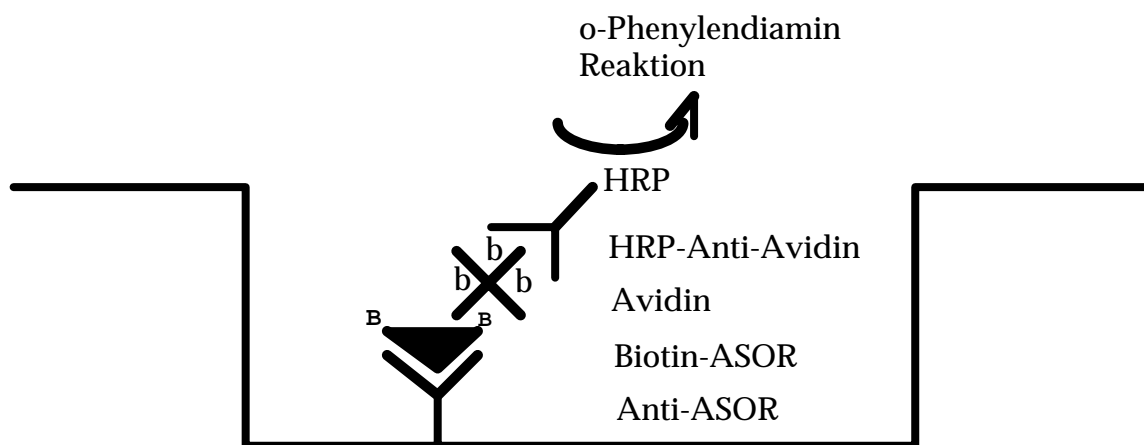


Abb. 3. 2.

Schema der ELISA-Quantifizierung von BASOR, bzw. des BASOR/Avidin-Komplexes, der bei der Endosomen-Fusion entsteht.

### **3. 2. 4. 12. Bestimmung von Marker-Konzentrationen und Latenz in Membran-Präparationen**


Für die Ermittlung der BASOR-Konzentration in verschiedenen Membran-Präparationen (PNS, Mikrosomen, Endosomen-Präparationen) wurden

verschiedene Mengen der Membransuspension (2, 5, und 10  $\mu\text{l}$ ) mit einem Avidin-Überschuß (50 ng/well) zur Reaktion gebracht (in einem 50  $\mu\text{l}$ -Volumen), und zwar in Anwesenheit von einfach konzentriertem Detergens, um die Gesamtkonzentration zu bestimmen, und in Abwesenheit von Detergens, um nur den extravasikulären BASOR-Anteil zu bestimmen. Die Differenz dieser beiden Werte diente zur Berechnung der Latenz des Markers, das heißt dem Prozentanteil des Markers der intravesikulär vorliegt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer BASOR-Standardkurve. Die Messungen ergaben eine BASOR-Konzentration von etwa 0,6 ng/ $\mu\text{l}$  für PNS, 1,3 ng/ $\mu\text{l}$  für Mikrosomen und 3,6 ng/ $\mu\text{l}$  für Endosomen-Präparationen, wobei jedoch massive Unterschiede, wahrscheinlich aufgrund von Variationen in der Endozytose des Markers, auftraten. Die Latenz von BASOR lag für PNS bei etwa 69%, für Mikrosomen, sowie für Endosomen bei ca. 80%.

Der gleiche experimentelle Ansatz wurde zur Bestimmung von Konzentration und Latenz der Avidin-markierten Membran-Präparationen angewandt (unter Verwendung eines BASOR-Überschusses: 20 ng/well). Die Messungen ergaben eine Konzentration von ungefähr 0,5 ng/ $\mu\text{l}$  für Avidin-PNS (mit einer Latenz von nur ungefähr 20-40%) und von ca. 1,2 ng/ $\mu\text{l}$  für Avidin-Mikrosomen (mit einer Latenz von etwa 40-50%).

Aus Avidin-markierten Membranen wurden keine gereinigten Endosomen präpariert, da beobachtet wurde, daß Fluid-Phase Marker während der Präparation (beim Resuspendieren, etc.) dazu tendieren, in den extravasikulären Raum auszutreten.

### **3. 2. 4. 13. Dichtegradientenzentrifugation nach der *in vitro*-Fusion**

Nach *in vitro* -Fusionsansätzen für 0, 30 , 60 und 90 min bei 37°C (je 350 - 400  $\mu\text{l}$  Ansatzvolumen) wurden die Proben in 5 ml eines eiskalten Puffers aus 53 mmol/l NaCl, 53 mmol/l KCl, 132 mmol/l Saccharose, 1,1 mmol/l EDTA und 5,3 mmol/l HEPES pH 6.8) suspendiert, 5,3 ml 66% Percoll (in 0,25 mol/l Saccharose) wurden zugemischt und nach Überführung in ein Zentrifugationsröhrchen wurde die Lösung mit ca. 1,5 ml 2,5 mol/l Saccharose unterschichtet. Anschließend wurde in einem Vertikalrotor (Beckman VTi 50) 30 min oder 60 min bei 25000 g zentrifugiert (bei langsamer Beschleunigung und Abbremsung: ergibt:  $5,49 \times 10^9$  oder  $1,18 \times 10^{10}$  rad<sup>2</sup>/sec). Nach der Zentrifugation wurden die Proben vom Boden beginnend abgesaugt und fraktioniert. Zum Aufbrechen  Membranen und als Vorbereitung für den

ELISA-Test wurde den Fraktionen Triton X100 in einer Endkonzentration von 1% zugesetzt, sowie 0,2% BSA und 0,1% SDS. Die Fraktionen wurden in Anti-ASOR beschichtete Platten pipettiert und es wurde ein ELISA wie beschrieben unter Verwendung von HRP-Anti-Avidin und Signalverstärkung durch HRP-Mouse-Anti-Rabbit durchgeführt. Bei sehr geringen Signalen wurde nicht die Farbreaktion für HRP eingesetzt, sondern eine Methode, die auf einer verstärkten Chemilumineszenz beruht (ECL, Enhanced Chemiluminescence). Dazu wurden die ECL-Lösungen der Firma Amersham (Lösung A und B) zu gleichen Teilen gemischt und je 70 µl/well in die ELISA-Platte pipettiert. Die Platte wurde ca. 5 min danach in der Dunkelkammer auf einen zugeschnittenen Amersham Hyperfilm ECL so aufgelegt, daß der Film so nah als möglich an die Platte kam. Der Film wurde nach den firmenüblichen Kriterien entwickelt und fixiert. Durch die Lichtfreisetzung aufgrund der ECL-Reaktion kam es zu einer Filmschwärzung an den Positionen der ELISA-wells, die in einer Standardkurve proportional zur eingesetzten BASOR-Menge war. Nach der Trocknung konnte der Film exakt auf eine ELISA-Platte aufgelegt und in einem Dynatech MR7000 ELISA-reader bei 630 nm gemessen werden.

Die Position der Membranen konnte durch Messung des Tyndall-Effektes bei 405 nm in einem ELISA-Reader bestimmt werden. Die Dichte der einzelnen Fraktionen wurde durch Messung des Brechungsindex und Vergleich mit der Standardkurve von Percoll in demselben Puffer ermittelt.

### **3. 2. 4. 15. Organellen-Durchflußanalyse (Single Organelle Flow Analysis, SOFA)**

Zur Durchflußanalyse einzelner fluoreszenzmarkierter Endosomen oder Lysosomen wurde ein FACScan der Firma Becton Dickinson verwendet. Folgende Parameter konnten gemessen werden:

Lichtstreuung nach vorne (5°):	Forward Scatter (FSC)
Lichtstreuung auf die Seite (90°):	Side Scatter (SSC)
FITC-Fluoreszenz:	FL1
Phycoerithrin-Fluoreszenz:	FL2

Die Geräte-Parameter wurden auf folgende Werte eingestellt:

Schwellenwert: beim FSC: 52

FSC-Detektor: E01

FSC-Verstärker: linear = 5,0  
SSC-Detektor: 450 Volt  
SSC-Verstärker: logarithmisch  
FL1-Detektor: 800 Volt  
FL1-Verstärker: logarithmisch  
Leerwert-Ereignisrate: 0 - 20/sec.  
FITC-Anregung: durch die 488 nm Linie eines Argon-Lasers  
Laser-Leistung: 15 mW

Es wurde der langsame Durchfluß-Modus gewählt (20 µl/min).

Der Schwellenwert wurde über den linear verstärkten Forward Scatter vorgegeben, um das elektronische Rauschen zu minimieren. Mit logarithmischer Verstärkung war die Hintergrund-Ereignisrate sehr hoch (ca. 8000/sec), während bei der linearen Verstärkung nur ein Wert von 0 - 20 pro Sekunde beobachtet wurde.

Zur Überprüfung der Parameter wurden Standardpartikel mit 0,364 µm, 0,624 µm, 1,3 µm und 1,6µm gemessen. Es hat sich gezeigt, daß die Größe der Partikel in diesem Bereich gut mit der 90°-Lichtstreuung korreliert ( $R^2 = 0,993$ ). Die Proben (5 - 10 µl) wurden in 300 - 500 µl des entsprechenden eiskalten Testpuffers (KAcSH, KCISH) suspendiert und bis zur Messung auf Eis aufbewahrt (in der Regel nicht länger als 1 h). Für eine Analyse wurden in der Regel 50000 Ereignisse (Partikel) gemessen. Bei einigen Messungen wurde ein Grenzwert für die minimale FITC-Fluoreszenz gesetzt ( $FL1 > 10^1$ ), ab der erst eine Messung erfolgen sollte ("Gate"). Dadurch wurde erreicht, daß hauptsächlich fluoreszenzmarkierte Kompartimente analysiert werden. Bei Verwendung von postnukleärem Überstand wurden durch diese Technik 50000 Kompartimente aus einer Zahl von etwa 150000 selektiert. Bei der Messung von gereinigten Endosomen war jedoch eine Zahl von 600000 Meßereignissen notwendig um nur 10000 Kompartimente zu erfassen, die die erforderliche Mindestfluoreszenz aufweisen. Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, daß bei der Präparation von Endosomen durch die wiederholte Resuspendierung zahlreiche kleine Fragmente entstehen, deren Fluoreszenz nicht ausreichend hoch ist.

## **4. ERGEBNISSE**

### **4. 1. APIKALE ENDOCYTOSE IN HEPATOCYTEN**

#### **4. 1. 1. ENTWICKLUNG EINES MARKIERUNGSSYSTEMS**

##### **4. 1. 1. 1. Optimierung der apikalen Markierung**

Aufgrund der Tatsache, daß in Hepatocyten laufend transcytotische Vesikel mit der apikalen Membran fusionieren, müssen apikale Endocytose-Mechanismen existieren, um die Membranoberfläche dieses Zellpols konstant zu halten. Diese apikalen Endocytose-Prozesse wurden jedoch bisher in der Leber kaum untersucht, da im Gegensatz zu Epithel-Zellen kein Zellkultur-System existiert, in dem die apikale Seite für Markierungen zugänglich ist, und in dem die Polarität der Hepatocyten aufrecht bleibt. Man ist aufgrund dessen darauf angewiesen, das gesamte Organ als Untersuchungsobjekt heranzuziehen. Im Organverband ist jedoch die Markierung der apikalen Seite durch die räumliche Anordnung der beiden Zellpole und durch den Gallefluß schwierig. Man ist dazu gezwungen, Markierungssubstanzen retrograd in das Gallengang-system zu injizieren. Aufgrund der Geschlossenheit des canaliculären Systems und der limitierten Aufnahme-Fähigkeit kann nur ein geringes Volumen der Markerlösung in den kanülierten Gallengang injiziert werden.

Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben ergeben, daß ein Druck von mehr als 20 cm Wassersäule für eine retrograde Infusion notwendig ist, und daß die Infusion von 200 µl der Markierungslösung gleichmäßig innerhalb von 2 min (durch eine Infusorpumpe) eine vertretbare Bedingung für die apikale Markierung darstellt. Dennoch kommt es dabei zur Öffnung von Zellverbindungen (Tight Junctions), und damit zu einem parazellulären Übertreten des Markers auf die basolaterale Seite, was durch ein sofortiges Erscheinen des Markers im Perfusat erkennbar ist (siehe Abb. 4. 1.) .

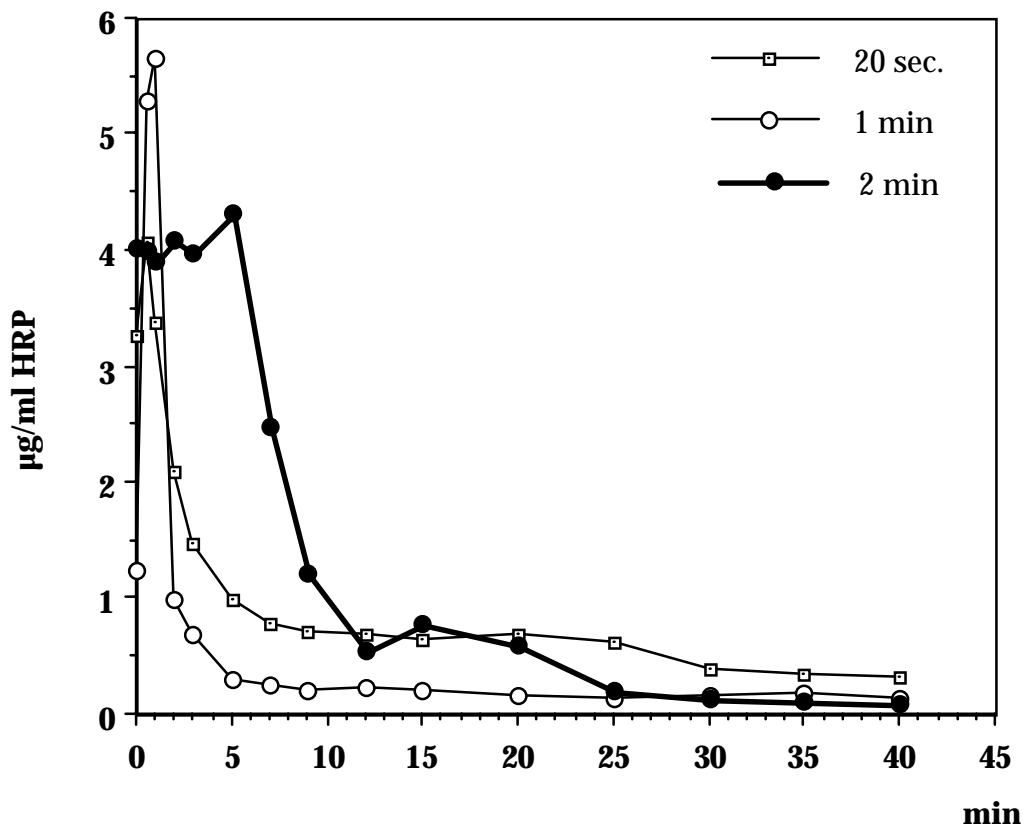


Abb. 4. 1.

Auftreten von HRP auf der basolateralen Seite (im Perfusat) nach Injektion von 200  $\mu$ l (25 mg/ml) innerhalb von a) 20 sec., b) 1 min, c) 2 min in den Gallengang (apikale Seite).

Aufgrund der Überlegung, daß bei einer niedrigen Temperatur (4°C) Endocytose-Vorgänge blockiert sind, wurde in weiterer Folge versucht, die apikale Markierung bei 4°C durchzuführen, um eine basolaterale Endocytose, die durch parazelluläres Übertreten des Markers verursacht werden könnte, auszuschließen. Das Auftreten von apikal bei 4°C injizierten Marker auf der basolateralen Seite wurde während der 4°C-Perfusion und nach Erwärmung auf 37°C untersucht. Dazu wurde die Leber zuerst bei 37°C für 15 min vorperfundiert und anschließend mit eiskaltem KHB für 20 min abgekühlt. Danach wurden 200  $\mu$ l des Markers mit einer Infusorpumpe



innerhalb von 2 min in den Gallengang injiziert und die Leber wurde 60 min bei 4°C weiterperfundiert. Der Gallengang wurde nach der Injektion offen gelassen, damit der Überschuß an Marker wieder abfließen kann, und der Druck vom canaliculären System wieder entfernt wird. (Dabei kam es zum Abfließen von ca. 80 µl der Markerlösung). Während der 4°C-Perfusion wurde der Marker auf der basolateralen Seite praktisch vollständig ausgespült. Nach der Erwärmung kam es dann zu einem erneuten Auftreten von Marker auf der sinusoidalen Seite (siehe Abb. 4. 2.).

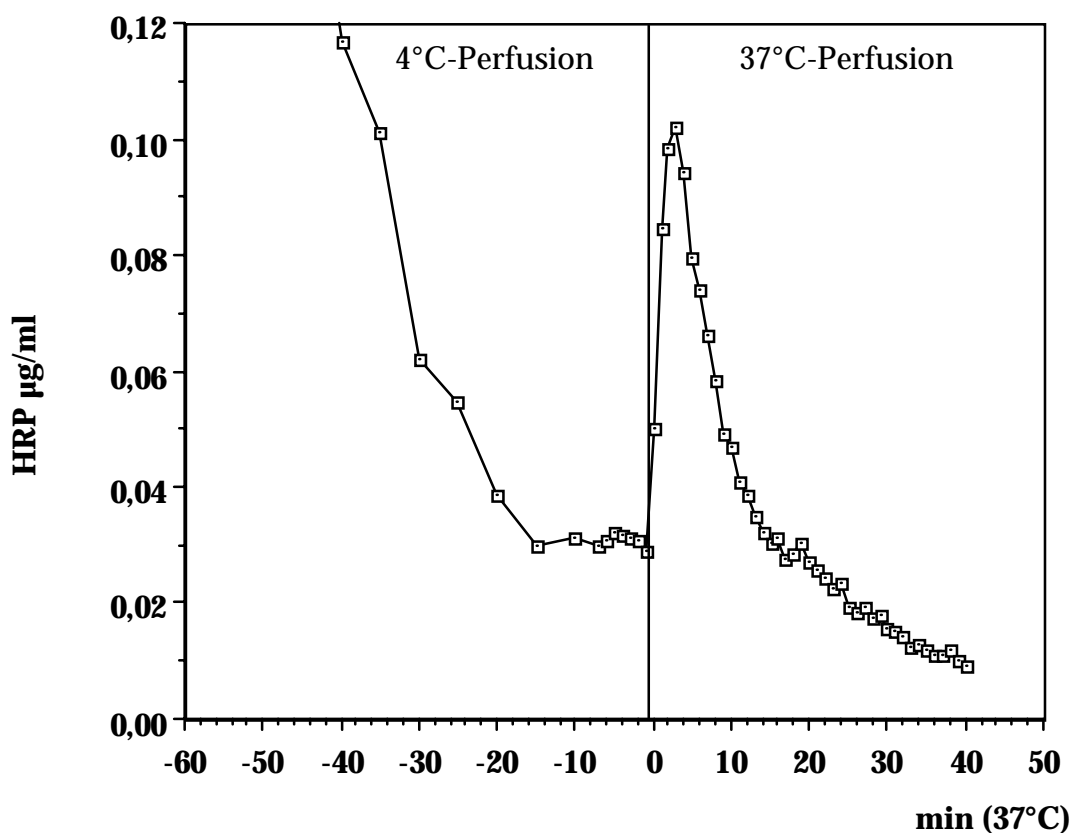


Abb. 4. 2.

Auftreten von HRP auf der basolateralen Seite nach Injektion von 200 µl Markerlösung (10 mg/ml) innerhalb von 2 min bei 4°C in den Gallengang; Ausspülen des Markers bei 4°C und Anstieg der Konzentration nach Erwärmung auf 37°C.

Trotz des Auftretens von Marker auf der basolateralen Seite, das entweder durch eine apikal-basolaterale Transcytose oder durch einen parazellulären Transport verursacht sein kann, ist die Konzentration des Markers auf dieser

Seite nach der Erwärmung so gering (ca. 0,1 µg/ml bei 10 mg/ml-Markierungskonzentration = 1/100000), daß eine signifikante basolaterale Endocytose des Markers ausgeschlossen werden kann.

Diese Markierungsbedingungen wurden dann auch für alle weiteren Untersuchungen der apikalen Endocytose eingesetzt.

#### **4. 1. 2. MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN**

##### **4. 1. 2. 1. Fluoreszenzmikroskopie apikaler Endosomen**

###### **4. 1. 2. 1. 1. Lokalisation apikaler Endosomen nach 2 min bei 37°C**

Das optimierte apikale Markierungssystem wurde für die Fluoreszenzmarkierung apikaler Endosomen mit Texas-Rot-konjugiertem Albumin eingesetzt. 200 µl des Markers (3 mg/ml) wurden bei 4 °C in den Gallengang injiziert. Nach einer weiteren Perfusion bei 4°C für ca. 1 h wurde zwei Minuten bei 37°C perfundiert und anschließend sofort wieder mit eiskaltem Puffer abgekühlt. Die Temperatur-Messung während der Perfusion ergab, daß ein Maximum von 32,5°C erreicht wurde; ferner daß die Leber 1,2 min lang eine Temperatur über 30°C und 2,8 min lang eine Temperatur über 16°C hatte .

Nach der Abkühlung wurde die Leber durch rezirkulierende Perfusion mit McLean-Lösung fixiert. Gewebeproben aus den zentraleren Bereichen der Leber wurden entwässert und paraffiniert. Die mikroskopische Untersuchung von 7 µm dicken Paraffinschnitten zeigte in vielen Bereichen der Probe eine vesikuläre Fluoreszenz im pericanaliculären Raum (siehe Abb. 4. 3.), während andere Bereiche des Schnittes nur eine gleichmäßige Hintergrund-Fluoreszenz aufwiesen. Dies läßt darauf schließen, daß nur ein Teil des Gallengangssystems vom Marker erreicht wurde. Die Lokalisation der Fluoreszenz nach dieser kurzen Endocytose-Phase läßt darauf schließen, daß keine basolateralen frühen Endosomen markiert wurden, sondern apikale Endosomen.

Abb. 4. 3.

Apikal mit Texas-Rot Albumin (3 mg/ml) markierte Endosomen mit 60x und 100x Ölimmersionsobjektiv vergrößert. (Endvergrößerung: ca. 600x und 1000x).

#### **4. 1. 2. 1. 2. Partielle Kolokalisation apikaler Endosomen und apikaler Membranproteine**

Paraffinschnitte von Gewebeproben, bei denen apikale Endosomen mit Texas-Rot-Albumin beladen waren, wurden entparaffiniert und rehydratisiert, und es wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Antikörper gegen ein residentes apikales Membranprotein (Dipeptidyl-Peptidase IV) durchgeführt.

Als zweiter Antikörper wurde FITC-konjugiertes IgG gegen den ersten Antikörper eingesetzt (FITC-Goat-Anti-Rabbit IgG 1 : 60 verdünnt). An einigen Stellen konnte eine Kolo-kalisation der apikalen Endosomen mit den gefärbten apikalen Membranproteinen detektiert werden (siehe Abb. 4. 4. und 4. 5.). Das Färbungsmuster der apikalen Membranproteine erschien jedoch anders als das normale Muster (siehe Abb. 4. 6.). Möglicherweise wurde durch die Injektion eine unphysiologische apikale Endocytose induziert, bei der die residentes Membranproteine nicht ausreichend zurückgehalten werden konnten.

Abb. 4. 4.

Apikal markierte Endosomen (Texas-Rot-Albumin, 2 min 37°C)

(Vergrößerung: ca. 1000 x)

Abb. 4. 5.

Immunfluoreszenz-Färbung apikaler Membranproteine (Vergrößerung: ca. 1000 x)

Abb. 4. 6.

Normales Färbungsmuster bei der Immunfluoreszenz-Färbung apikaler (canaliculärer) Membranproteine.

#### **4. 1. 2. 1. 3. Morphometrie apikaler Endosomen durch digitale Bildverarbeitung**

Mikroskopische Aufnahmen von Paraffinschnitten apikal beladener Gewebeproben wurden wie unter 3. 2. 2. 5. beschrieben mit Hilfe eines Computer-Systems zur digitalen Bildverarbeitung ausgewertet. Dabei wurde der mittlere Durchmesser der fluoreszierenden Strukturen gemessen und dessen statistische Verteilung ermittelt. Die Bildanalyse von 305 Kompartimenten ergab für den Durchmesser einen Mittelwert von 0,54  $\mu\text{m}$  (Median 0,48  $\mu\text{m}$ ) und eine Standardabweichung von 0,19  $\mu\text{m}$ . Das Ergebnis der Auswertung ist in Abb. 4. 7. dargestellt. Da sehr kleine Strukturen in der Fluoreszenzmikroskopie nicht exakt meßbar sind, könnte der tatsächliche mittlere Durchmesser eventuell noch unter dem angegebenen Wert liegen.

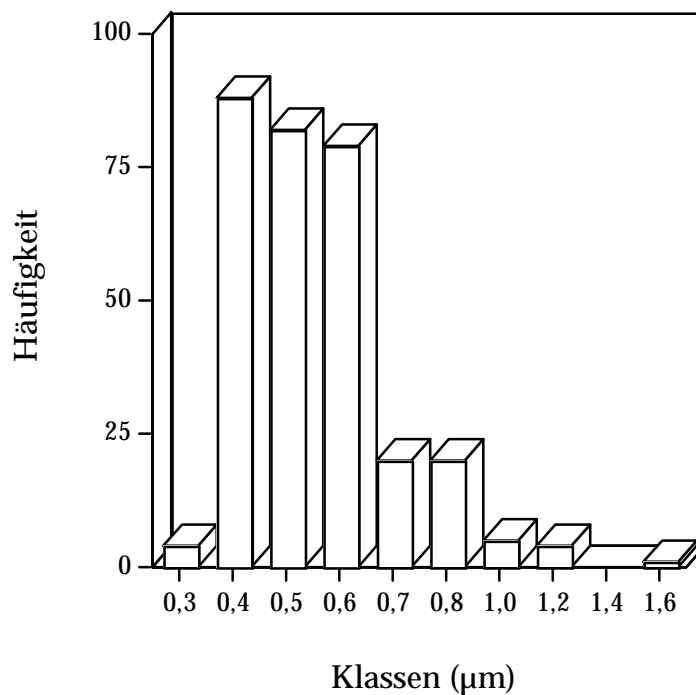


Abb. 4. 7.

Größenverteilung apikaler Endosomen

#### **4. 1. 2. 2. Elektronenmikroskopie apikaler Endosomen**

Für eine elektronenmikroskopische Untersuchung wurden apikale Endosomen unter den optimierten Beladungsbedingungen mit 50 mg/ml HRP markiert und die Leber wurde nach Punkt 3. 2. 1. 1. 5. perfusionsfixiert. Die Gewebeproben wurden am Institut für Histologie und Embryologie der Universität Wien für die Elektronenmikroskopie präpariert (wie unter 3. 2. 2. 1. beschrieben) und von Prof. A. Ellinger untersucht. Aufgrund der Tatsache, daß nur bestimmte Bereiche entsprechend markiert waren, um eine Überladung des canaliculären Systems zu vermeiden, konnten nur wenige HRP-positive Canaliculi und pericanaliculäre Vesikel gefunden werden. Allerdings waren auf der basolateralen Seite Kupferzellen ebenfalls markiert. Dies ist darauf zurückzuführen, daß diese Zellen Mannose-reiche N-Glykane von HRP binden können, und somit die Peroxidase, die bei der 4°C-Markierung auf die basolaterale Seite übergetreten ist, nicht ausgespült werden konnte.

Ein HRP-positiver Canaliculus, in dessen Nähe auch ein HRP-hältiges Vesikel zu sehen ist, ist in Abb. 4. 8. wiedergegeben.

Abb. 4. 8.

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines HRP-gefärbten Canaliculus, sowie eines HRP-positiven pericanaliculären Vesikels

(Vergrößerung: ca. 20 000 x)

**4. 1. 3. AZIDIFIZIERUNG ANGEREICHERTER APIKAL MARKIERTER ENDOSOMEN**



#### **4. 1. 3. 1. Vergleich mit den Azidifizierungseigenschaften von basolateralen frühen Endosomen und Lysosomen**

Apikale Endosomen wurden wie unter 3. 2. 1. 1. 2. beschrieben mit FITC-Dextran markiert, frühe Endosomen wie unter Punkt 3. 2. 3. 5. 1. und Lysosomen wie unter 3. 2. 3. 5. 3.

Für die Untersuchung der Azidifizierungseigenschaften konnten nur Endosomen-angereicherte Fraktionen eingesetzt werden (Endosomen-angereicherte Golgi-Fraktionen nach einer Flotationsgradienten-Zentrifugation; Lysosomen nach Präparation eines lysosomalen Pellets - siehe 3. 2. 3. 7.). Die Bestimmung der Azidifizierungsfähigkeit der untersuchten Kompartimente erfolgte wie unter 3. 2. 4. 5. angegeben.

Die Membransuspensionen wurden im entsprechenden Puffer äquilibriert (2 h auf Eis) und der Zeitverlauf der Fluoreszenz bei Raumtemperatur gemessen. Nach Zugabe von ATP (2,5 mmol/l; pH 7,4) wurde bei apikalen Endosomen, wie auch bei basolateral markierten frühen Endosomen und Lysosomen, eine Abnahme der FITC-Fluoreszenz durch die Ansäuerung des Lumens detektiert (Abb. 4. 9.).

Nach Zugabe eines Ionophors (Monensin: 13  $\mu\text{mol/l}$  oder Nigericin: 1  $\mu\text{mol/l}$ ) stieg die Fluoreszenz bei den Endosomen (apikal oder baso-lateral) wieder auf den Ausgangswert an, während bei den Lysosomen sogar ein über den Ausgangswert hinausgehender Fluoreszenz-Anstieg zu beobachten war, was darauf hinweist, daß ihr Innenraum nach der Äquilibrierung noch sauer war. Die Azidifizierungsfähigkeit apikaler Endosomen schien einen intermediären Wert zwischen dem von frühen Endosomen, und dem von Lysosomen einzunehmen. Eine Umrechnung der Fluoreszenz-Abnahme in einen entsprechenden pH-Wert wurde durch einen zu hohen Anteil an extravesikulärer Fluoreszenz nicht durchgeführt (siehe 3. 2. 4. 5.) und erschien mir auch aufgrund der Frage, ob das klassische pH-Konzept auf endosomale Strukturen angewandt werden sollte, nicht anstrebenswert (Schmid, 1994).

Abb. 4. 9.

Azidifizierung von A) apikalen Endosomen B) frühen basolateralen Endosomen und C) basolateral markierten Lysosomen nach ATP-Zugabe. Dissipierung des sauren Milieus durch Monensin oder Nigericin.

#### **4. 1. 4. *IN VIVO*-ZUSAMMENTREFFEN BASOLATERALER UND APIKALER ENDOCYTOSE-WEGE**

Das Vorhandensein endocytischer Prozesse auf beiden Seiten polarisierter Zellen und die Tatsache, daß Lysosomen von beiden Endocytose-Wege erreicht werden können, impliziert ein Zusammentreffen dieser unterschiedlichen intrazellulären Transportwege. Für MDCK-Zellen wurde gezeigt, daß sich die beiden Wege im Stadium von kinetisch späten Endosomen nach einer Lag-Phase von 5 - 10 min treffen (Parton et al., 1989).

Um die Kinetik des Zusammentreffens apikal und basolateral markierter Endosomen in Hepatocyten zu untersuchen, wurde in der isoliert perfundierten Leber bei 4°C Phycoerithrin-IgG in den Gallengang injiziert, weitere 50 min bei 4°C perfundiert und dann mit 37°C FITC-Dextran-Lösung (10 mg/ml) erwärmt (1 min) und ohne Marker bei 37°C weiterperfundiert. Kurz vor dem Erwärmen (vor der FITC-Dextran-Zugabe) wurde eine Biopsie entnommen, ebenso 2 min, 5 min, 10 min und 20 min nach der Erwärmung.

Die Gewebeproben wurden in KAcSH homogenisiert und es wurden postnukleäre Überstände und Endosomen-angereicherte Fraktionen präpariert (0,25/1,0 mol/l Saccharose-Interphase).

Die Membransuspensionen wurden durch Einzelorganellen-Durchfluß-Analyse auf einem FACScan (Becton-Dickinson) hinsichtlich FITC- und Phycoerithrin-Fluoreszenz analysiert (10 µl Suspension in 250 µl KAcSH ± 1 µmol/l Nigericin). Bei der 5-Minuten-Probe, sowie bei den folgenden Proben trat eine deutliche Population von Vesikeln auf, die beide Fluoreszenz-Marker enthielten, während diese Population bei 0 min und 2 min nach der Erwärmung nicht detektiert werden konnte (siehe Abb. 4. 10.). Die Quantifizierung ergab, daß von 50000 gemessenen Ereignissen (wobei unter den gegebenen Bedingungen, ohne Vorgabe eines Grenzwertes auch zahlreiche nicht-markierte Partikel gezählt werden) bei der 5 min-Probe 1500 Kompartimente auftreten, in denen die beiden Marker kolokalisieren, während diese Zahl bei der 2 min-Probe nur 143 beträgt. Aus diesen Werten läßt sich eine Kinetik für das Zusammentreffen der basolateralen und apikalen Endocytose-Wege bestimmen. Es besteht eine Lag-Phase von mindestens 2 min, danach kommt es zu einer sehr raschen Konvergenz der beiden Wege, die bereits nach 5 min nahezu abgeschlossen ist (siehe Abb. 4. 11.).

Abb. 4.10.

SOFA von gereinigten Endosomen: Die Leber wurde gleichzeitig mit FITC-Dextran basolateral und mit Phycoerithrin apikal beladen. Proben wurden nach 0, 2, 5, 10 und 20 min entnommen. FL1: FITC-Dextran-Fluoreszenz; FL2: Phycoerithrin-Fluoreszenz.

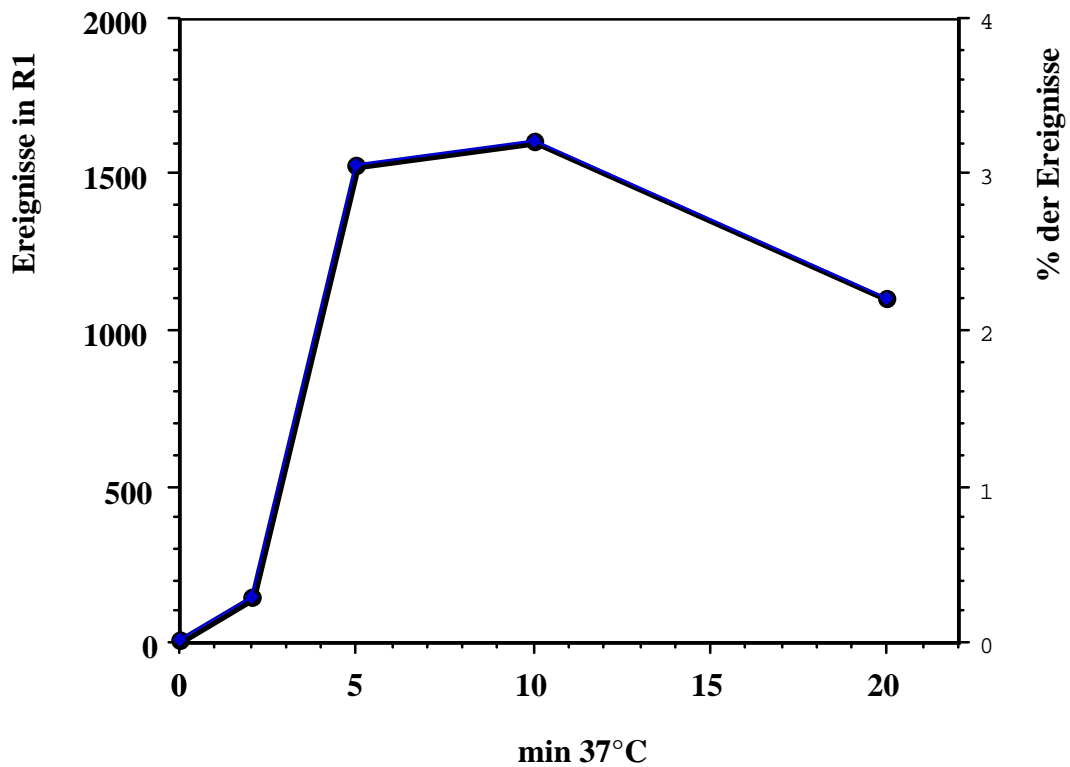


Abb. 4. 11.

Kinetik des *in vivo*-Zusammentreffens apikaler und basolateraler Endocytose-Wege (Zahl der kolocalisierenden Kompartimente in Region R1 der vorhergehenden Abb.)

Die Analyse der 90°-Lichtstreuung (Side Scatter) und ein Vergleich mit einer Standardkurve (siehe Punkt 4. 4. 5. 1.) ergibt für die Kompartimente, in denen sich apikale und basolaterale Endocytose-Wege treffen, einen Durchmesser von 0,4 - 0,45  $\mu\text{m}$ .

## 4. 2. APIKAL-BASOLATERALER TRANSPORT

Wie bereits bei der Optimierung der apikalen Markierungsbedingungen beschrieben wurde (4. 1. 1.), kommt es nach einer retrograden Infusion von Markerlösung in das canaliculäre System (gegen den Gallefluß) zu einem sehr raschen Übertreten von Marker auf die sinusoidale Seite (auch bei 4°C), was aller Wahrscheinlichkeit nach auf einen parazellulären Transport durch "Tight Junctions" zurückzuführen ist. Aufgrund des hohen elektrischen Widerstandes des Gallengangssystems ist es nicht möglich, das Öffnen der Tight Junctions durch eine Widerstandsmessung nachzuweisen (Graf, persönliche Mitteilung).

Ein Versuch, die Potentialdifferenz zwischen apikaler und basolateraler Seite der Hepatocyten (ca. 3 mV) als Meßprinzip zur Untersuchung der Integrität der Zellverbindungen heranzuziehen, war aufgrund der Störsignale durch die Perfusionspumpe nicht erfolgreich.

Das Verhalten von Marker nach einer apikalen Injektion bei 4°C (Ausspülen des auf die sinusoidale Seite übergetretenen Markers bei 4°C und neuerliches Auftreten auf dieser Seite nach der Erwärmung auf 37°C) ließ es möglich erscheinen, daß es bei der 4°C-Perfusion wieder zu einem Schließen der geöffneten Zellverbindungen kommt (nachdem auch der unter Überdruck stehende Marker ausfließen konnte). Der beobachtete apikal-basolaterale Transport könnte in diesem Fall durch einen transzellulären Transportweg (eine apikal-basolaterale Transcytose) verursacht sein. Die beiden Marker HRP und FITC-Dextran erschienen mit der gleichen raschen Kinetik auf der basolateralen Seite. Das Maximum war 3 - 5 min nach der Erwärmung erreicht (siehe Abb. 4. 12.). Dieser schnelle Transport scheint zwar eher für einen parazellulären Mechanismus zu sprechen, er könnte jedoch auch auf einer schnellen Transcytose-Route, wie sie für die basolateral-apikale Richtung postuliert wurde (Hayakawa et al., 1990), beruhen. Die insgesamt bei 37°C transportierte Menge betrug für beide Marker etwa 350 µg (bei Injektion von ca. 200 µl mit 35 mg/ml) - somit errechnet sich eine apikale Aufnahme von etwa 10 µl (1µl/g Leber). Dieser Wert ist den für die basolaterale Seite ermittelten Werten von FITC-Dextran ähnlich (0,35 - 0,6 µl/g bei einer Markierung für 1 min).

Man muß allerdings annehmen, daß nicht die gesamte apikale Membranoberfläche markiert wurde; andererseits war das Gallengangssystem deutlich länger als 1 min bei 37°C der Markierung ausgesetzt (10 - 15 min). Die Ergebnisse sind somit nicht direkt vergleichbar. Festzustellen ist jedoch, daß

die nach Erwärmung von 4°C auf 37°C von der apikalen auf die basolaterale Seite transportierte Menge an Marker in einer Größenordnung liegt, die nicht nur durch einen parazellulären, sondern auch durch einen transcytotischen Mechanismus erklärbar wäre.

Aufgrund der Tatsache, daß es letztendlich nicht möglich war, nachzuweisen, welcher der beiden Mechanismen für den apikal-basolateralen Transport unter den gegebenen Bedingungen verantwortlich ist, wurde dieses Transport-Phänomen nicht mehr näher untersucht.

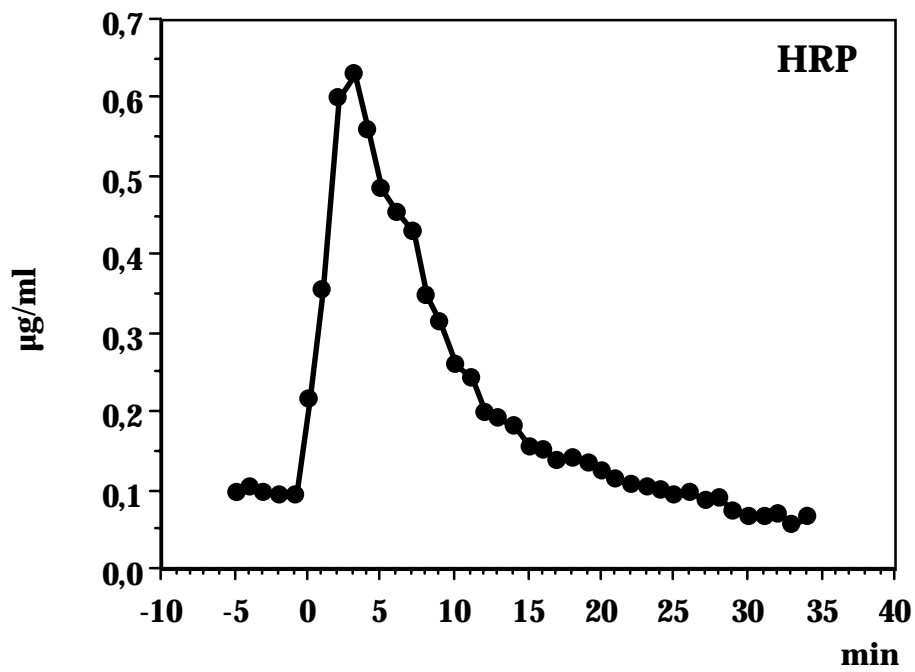
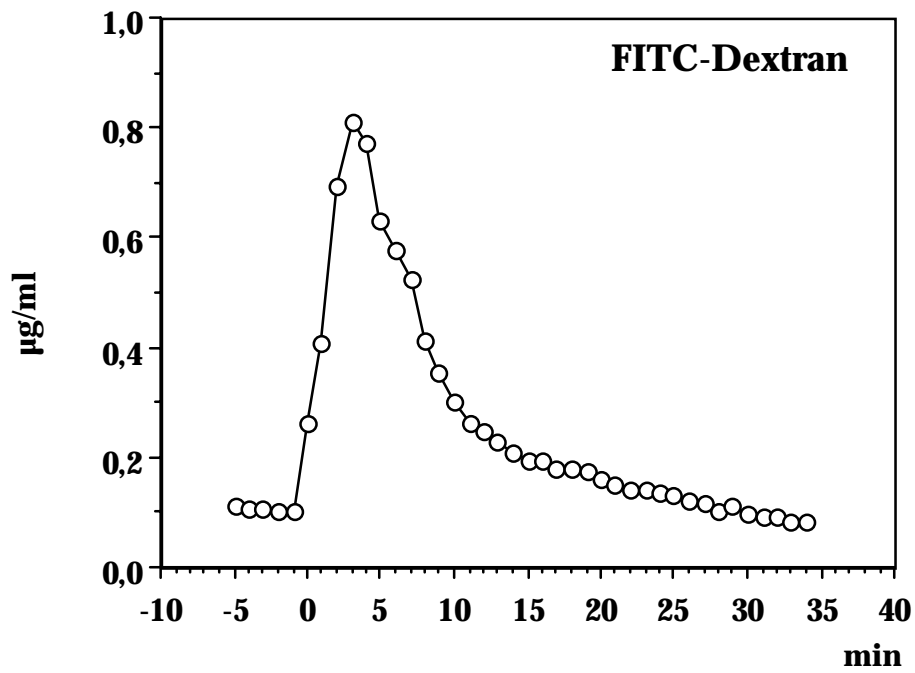


Abb. 4. 12.

Apikal-basolateraler Transport von FITC-Dextran und HRP nach retrograder Infusion bei 4°C in den Gallengang, Ausspülen bei 4°C und Erwärmung auf 37°C. Die x-Achse gibt die Minuten nach der Erwärmung an.



### **4. 3. BASOLATERAL-APIKALE TRANSCYTOSE**

In Hepatocyten existiert, so wie in anderen polarisierten Zelllinien, ein eigener intrazellulärer Transportweg, der makromolekulare Verbindungen von einem Zellpol zum anderen transportiert. Die physiologisch relevante Richtung für einen derartigen transzellulären Transport ist in den Hepatocyten die Übertragung von der basolateralen (sinusoidalen) Seite, die dem Blutkreislauf zugewandt ist, zur apikalen (canaliculären) Seite, an der die Galle-Sekretion abläuft. Genauer charakterisiert ist in diesem Hinblick die Rezeptor-vermittelte Transcytose von polymerem IgA (Hoppe et al., 1985; Brown & Kloppel, 1989); während die intrazellulären Mechanismen der Transcytose von Markern, von denen allgemein angenommen wird, daß sie ohne Bindung an die Zell-Oberfläche abläuft (Fluid-Phase-Marker) kaum untersucht sind.

#### **4. 3. 1. REZEPTOR-VERMITTELTE TRANSCYTOSE VON <sup>125</sup>J-ASOR**

Die Endocytose von Asialoglykoproteinen wie ASOR ist genau charakterisiert und läuft über Clathrin-abhängige, Rezeptor-vermittelte Internalisierung. Nach der Dissoziation des Liganden vom Rezeptor in frühen endocytischen Kompartimenten kommt es jedoch nicht zu einer 100%igen Sortierung zum lysosomalen Abbau-Weg. Ein Teil des internalisierten ASOR gelangt auf den transcytotischen Weg und wird in die Galle sezerniert. Deshalb kann ASOR auch als Marker für die Clathrin-abhängige Transcytose eingesetzt werden. Die Aufnahme und biliäre Sekretion des Transcytose-Markers pIgA wurde bisher hauptsächlich *in situ* studiert; in der isoliert perfundierten Leber ist sie nur sehr ineffizient und deshalb für die Untersuchung dieser Studie nicht geeignet.

##### **4. 3. 1. 1. ASOR-Transcytose unter normalen und hypertonen Bedingungen**

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit bestand darin, zu untersuchen, ob Clathrin-unabhängige Endocytose und Transcytose-Wege in der Leber existieren, und wie sich diese im Vergleich zu Rezeptor-vermittelten, Clathrin-abhängigen Transport-Routen verhalten. Zu diesem Zweck mußte ein System etabliert

werden, daß die Clathrin-abhängige Endocytose hemmt. Im Zellkultursystem konnte dies bei einigen Zelllinien durch Anwendung modifizierter Inkubationsbedingungen bereits erzielt werden. So konnte z.B. ein hypotoner Schock gefolgt von einer Kalium-freien Inkubation (Madshus et al., 1987) oder die Kultivierung in einem hypertonen Medium (Heuser & Anderson, 1989) die Ausbildung intakter Clathrin-umhüllter Membran-Einstülpungen verhindern. Ein ähnlicher inhibitorischer Effekt wurde in saurem Medium beobachtet (Davoust et al., 1987; Sandvig et al., 1989), der jedoch auf eine Hemmung der Abschnürung Clathrin-umhüllter Vesikel zurückzuführen war.

In der vorliegenden Studie wurde nun versucht auch im System der isoliert perfundierten Leber Bedingungen zu finden, unter denen die Clathrin-abhängige Endocytose gehemmt ist.

In verschiedenen Experimenten konnten in der Folge Versuchsparameter entwickelt werden, bei denen das gewünschte Ergebnis unter minimaler oder nicht erkennbarer Beeinträchtigung des physiologischen Zustandes der Leber erreicht wurde. Es hat sich gezeigt, daß eine Perfusion mit saurem Puffer (pH 5,0) nicht geeignet ist, da es zu einer Schädigung der Leber kommt. Ebenso war die Kombination eines hypotonen Schocks mit einer Kalium-freien Perfusion ungünstig. Eine Kalium-freie Perfusion alleine rief jedoch einen deutlichen Hemmungseffekt hervor, der größtenteils reversibel war. Das gleiche Phänomen wurde bei Perfusion mit hypertonem KHB (unter Zusatz von Saccharose) beobachtet.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Zellkultursystemen konnte in der isoliert perfundierten Leber bereits bei relativ niedrigen Saccharose-Konzentrationen (0,1 mol/l) für nur kurze Zeit (10 min) eine Hemmung der Clathrin-abhängigen Endocytose bemerkt werden (mit ASOR als Marker für die Rezeptor-vermittelte Endocytose); die Transytose schien unter den gleichen Bedingungen noch stärker gehemmt zu werden (siehe auch 4. 3. 3.). Der Zusammenhang zwischen Saccharose-Konzentration im Perfusionspuffer (KHB) und der Osmolarität ist in Abb. 4. 13. dargestellt.

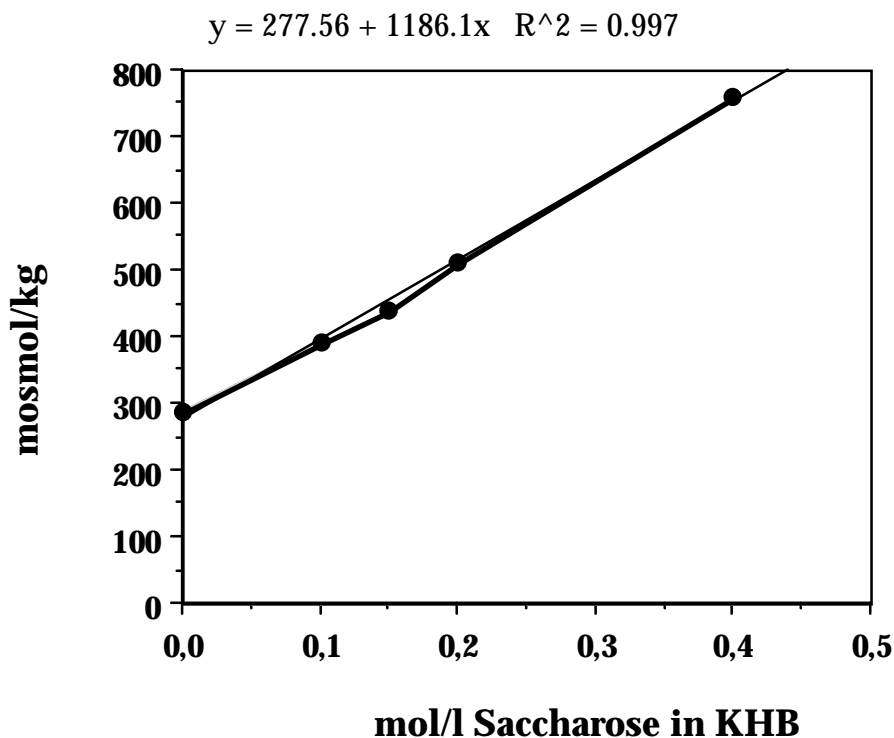


Abb. 4. 13.

Zusammenhang zwischen der Saccharose-Konzentration im KHB und der Osmolarität des Perfusionspuffers

Da der Gallefluß während der hypertonen Perfusion durch den osmotischen Gradienten zwischen Galle und Perfusat nahezu zum Stillstand kommt, wurden Bedingungen ausgearbeitet, bei denen die hypertone Perfusion auf 10 min beschränkt war. 5 min vor der Impuls-Markierung mit den entsprechenden Markern wurde auf hypertonen Perfusionspuffer umgeschaltet, die Markierung selbst erfolgte für 1 min ebenfalls mit hypertonem Puffer. Danach wurde noch 4 min unter hypertonen Bedingungen weiterperfundiert, und anschließend wieder auf den normalen Perfusionspuffer zurückgeschaltet. Durch die Rückschaltung auf den normalen Puffer kam es zu einer deutlichen Stimulierung des Galleflusses, und anschließend wieder zur Stabilisierung auf den normalen Wert (Abb. 4. 14.).

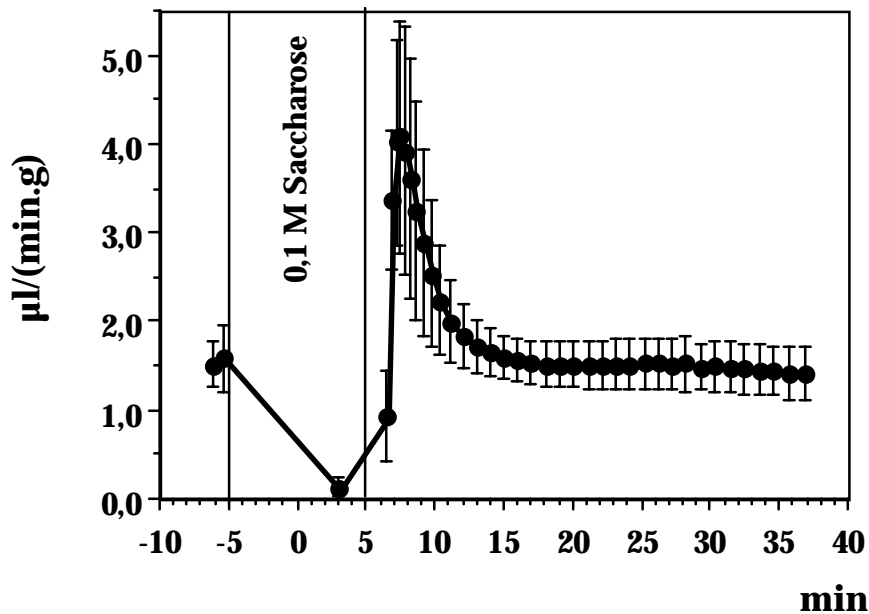


Abb. 4. 14.

Gallefluß ( $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) nach hypertoner Perfusion (KHB + 0,1 mol/l Saccharose) für 10 min: Zum Zeitpunkt 0 wurde 1 min mit Marker beladen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Versuchen und die Bandbreite der Werte (Range).

Zur Untersuchung der Rezeptor-vermittelten Transcytose wurde  $^{125}\text{J}$ -ASOR mit einer spezifischen Aktivität von  $6,16 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{m}$  Protein und einer TCA-Fällbarkeit von 93,8% eingesetzt. Unter normalen Bedingungen wurden 87 - 89% des angebotenen Asialoglykoproteins aufgenommen. (Nachdem eine signifikante Rezyklisierung erst etwa 6 min nach der Beladung einsetzt, wurde jene Menge an ASOR, die in diesem Zeitraum aus dem Perfusat verschwindet, als aufgenommen betrachtet). 2 - 4% der aufgenommenen Radioaktivität wurden in die Galle sezerniert. Ein Großteil davon war TCA-präzipitierbar (70 - 77%) und folglich nicht nach lysosomalem Abbau in die Galle gelangt. Das Sekretionsmaximum war nach etwa 15 min erreicht und war somit kinetisch mit dem langsamen Transportweg von HRP ident (siehe 4. 3. 2.) Eine Beladung unter hypertonen Bedingungen führte zu einer deutlichen Reduktion der Endocytose, wobei eine lineare Korrelation zwischen der Saccharose-Konzentration im Puffer (der Osmolarität des Puffers) und der internalisierten Menge bestand (siehe Abb. 4. 15.). Dieser

Effekt deutet darauf hin, daß die eingesetzten Versuchsparmeter geeignet sind die Clathrin-abhängige Endocytose zu hemmen.

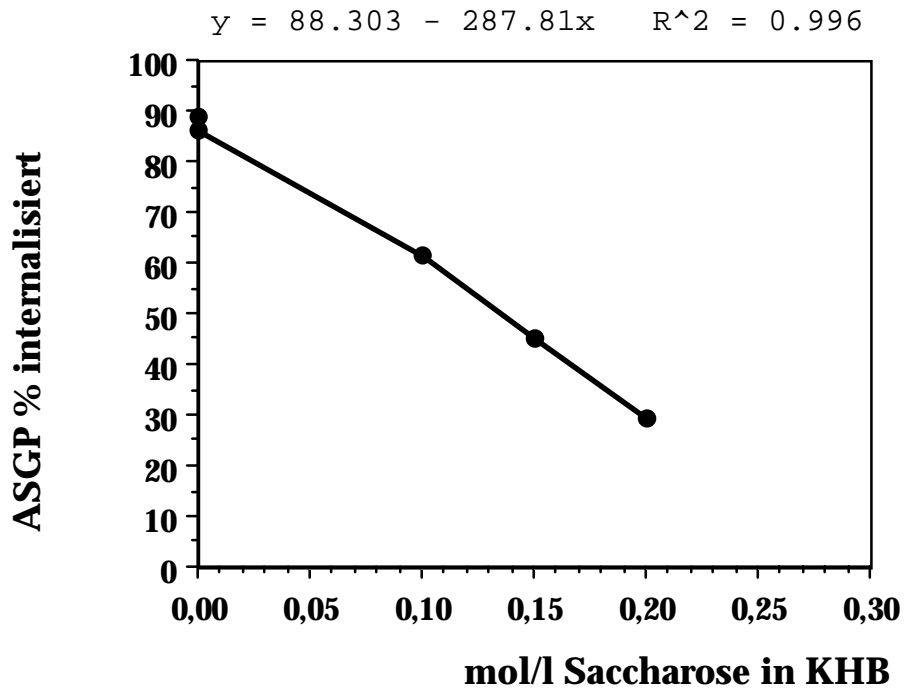


Abb. 4. 15.

Hemmung der ASOR-Endocytose durch hypertone Bedingungen.

Die Beladung unter hypertonen Bedingungen führte nicht nur zu einer Hemmung der Endocytose, sondern auch ebenso zu einer Verringerung der Transcytose von ASOR (siehe Abb. 4. 16.).

Abb. 4. 16.

Transcytose von  $^{125}\text{J}$ -ASOR: Vergleich zwischen hypertonen Bedingungen (0,15 mol/l Saccharose) und Kontrollbedingungen.

#### **4. 3. 2. TRANSCYTOSE VON HRP UND FITC-DEXTRAN**

#### 4. 3. 2. 1. Transcytose unter normalen Bedingungen (bei 37°C)

Die Kinetik des basolateral-apikalen Transports von HRP und FITC-Dextran wurde in der isoliert perfundierten Leber untersucht, indem nach der Vorperfusion bei 37°C für 1 min mit den Markern perfundiert wurde, gefolgt von einer Marker-freien Perfusion. Durch die kurze Markierung kommt es zu einer impulsartigen Internalisierung und in der Folge zu einem wellenartigen transzellulären Transport. Die Markierungs-substanzen treten entsprechend ihrer Transportkinetik in die Galle aus und können dort gemessen werden. FITC-Dextran und HRP zeigten in diesem System eine unterschiedliche Charakteristik. Das Maximum von FITC-Dextran in der Galle lag bei 4 - 7 min nach der Beladung. Es konnte nur ein Maximum beobachtet werden. HRP wurde hingegen biphasisch in die Galle transportiert, mit einem Maximum bereits nach ca. 4 min und einem zweiten nach etwa 14 min (siehe Abb. 4. 17.). Das erste Maximum der HRP-Sekretion fiel in vielen Fällen nicht mit dem Maximum von FITC-Dextran zusammen, auch wenn mit den beiden Markern zugleich beladen wurde. Versuche mit nur einer der Markierungssubstanzen zeigten keinen Unterschied zu den Experimenten, in denen beide gemeinsam angeboten wurden. Ebenso konnte kein Unterschied in der biliären Sekretion zwischen 40 kDa und 70 kDa-Dextran detektiert werden. Interessanterweise war ein deutlicher Unterschied zwischen HRP und FITC-Dextran hinsichtlich der sezernierten Menge zu beobachten (bei gleicher Beladungskonzentration). Die errechnete Menge an Markierungs-lösung, die pro min und g Leber transcytiert wurde, betrug bei FITC-Dextran im Maximum etwa 12 nl, während der gleiche Parameter von HRP bei 1,5 - 2 nl lag.

Diese Transportrate ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{nl min}^{-1} \text{ gLeber}^{-1} = (\text{ng} / \mu\text{l}) \cdot (\mu\text{l min}^{-1} \text{ g}^{-1}) / (\text{ng/nl})$$

ng/μl: Markerkonzentration in der Galle

μl min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>: Gallefluß pro min und g Leber

ng/nl: Markierungskonzentration bei der Beladung

Die Gesamtsekretion errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{nl/g} = \text{ng}(\text{transportiert}) / ((\text{ng/nl})_{\text{Markierungskonzentration}} \times \text{gLeber})$$

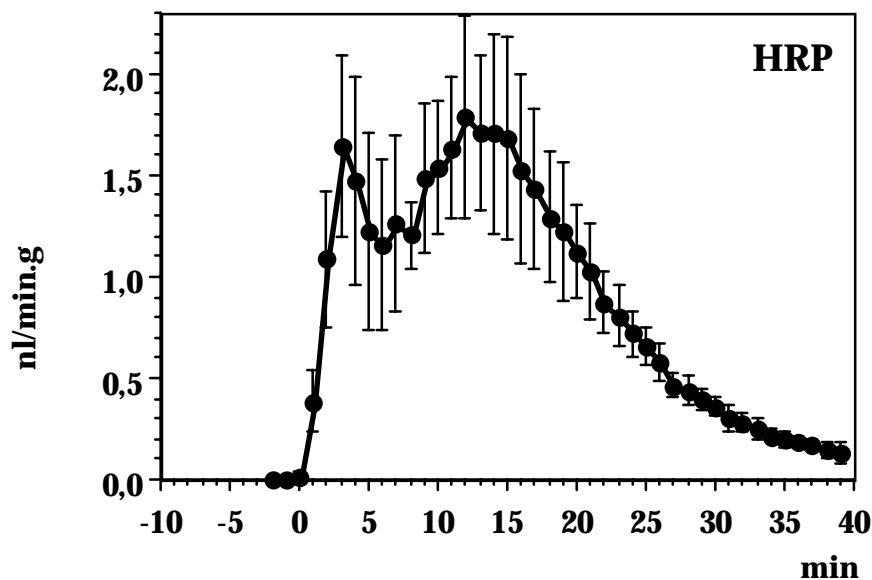
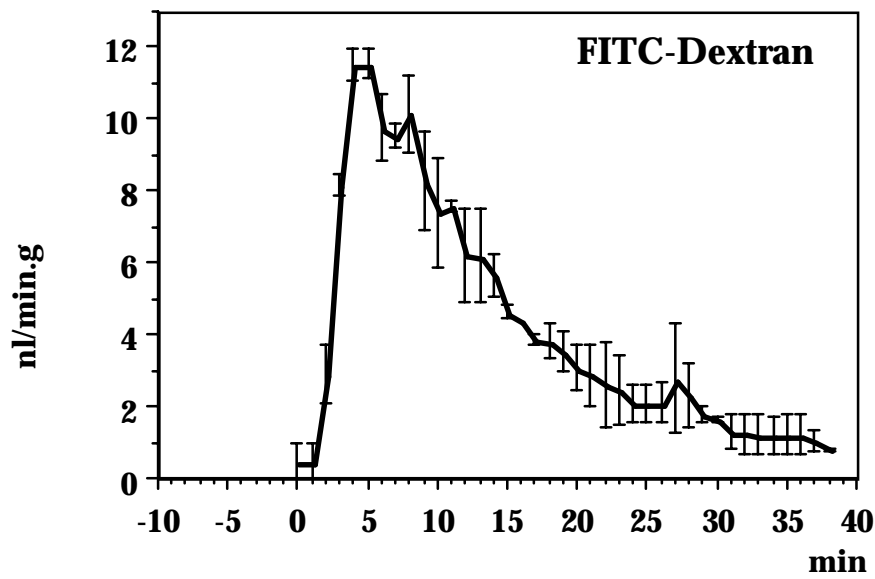


Abb. 4. 17.

Transcytose von FITC-Dextran und HRP bei 37°C: Die Kurve stellt die Mittelwerte von drei Versuchen und die Standardabweichungen dar.

Y-Achse: nl der Markerlösung, die pro min und g Leber transcytiert wurden.

Markierungskonzentration: ungefähr 0,8 mg/ml (wurde bei jedem Versuch genau quantifiziert: Kleine Unterschiede wurden durch Beziehung der Transportrate auf die Beladungskonzentration berücksichtigt)



#### 4. 3. 2. 2. Transcytose bei 16°C und 37°C

Der nächste Schritt in der Charakterisierung der Transcytose von HRP und FITC-Dextran war die Untersuchung der Temperatur-Sensitivität des Transportvorganges. Da bereits vorher bekannt war, daß die Rezeptor-vermittelte Transcytose von pIgA bei 16°C im Stadium früher Endosomen blockiert wird, bei dieser Temperatur jedoch keine Blockierung der biliären Sekretion auftritt, wenn der Marker frühe Endosomen bereits verlassen hat (Klapper et al., 1992), wurde untersucht, wie sich HRP und FITC-Dextran unter diesen Bedingungen verhalten.

Nach einer 37°C-Vorperfusion (15 min) wurde die Leber auf 16°C abgekühlt, und nach Erreichen dieser Temperatur wurde das Organ mit den beiden Verbindungen für 1 min bei 16°C beladen. Danach wurde ohne Marker bei 16°C weiter perfundiert (60 - 80 min) und schließlich wieder auf 37°C erwärmt.

Die Galle wurde tropfenweise gesammelt und die FITC-Dextran-Fluoreszenz, sowie die HRP-Aktivität darin gemessen. Da sich beim Umschalten von 16°C auf 37°C die Autofluoreszenz der Galle ändert, wurde diese in einem eigenen Versuch bestimmt und von der FITC-Fluoreszenz abgezogen. Der Gallefluß war bei der 16°C-Perfusion naturgemäß deutlich reduziert und lag bei etwa 0,2 - 0,3  $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$ . Nach der Erwärmung stieg er stark an und zeigte eine choleretische Phase (siehe Abb. 4. 18.).

Die biliäre Sekretion von FITC-Dextran war bei 16°C vollständig blockiert (Abb. 4. 19.) nach der Erwärmung auf 37°C kam es dann zur Sekretion des fluoreszenten Dextrans mit einem Maximum nach etwa 15 min (Transportrate ca. 2 nl pro min und g Leber). Dies weist darauf hin, daß es bei 16°C aufgenommen wurde, aber intrazellulär akkumulierte. Morphologische Untersuchungen zeigten, daß FITC-Dextran unter diesen Bedingungen in peripheren basolateralen Endosomen lokalisiert ist.

HRP zeigte eine völlig abweichende Charakteristik; das Enzym wurde bereits bei 16°C in die Galle sezerniert, wobei das Maximum 10 - 15 min nach der Impuls-Markierung erreicht war. Bei dieser Temperatur trat jedoch nur ein Maximum auf; die maximale Transportrate betrug bei 16°C ungefähr 0,09  $\text{nl min}^{-1} \text{g}^{-1}$ . Nach der Erwärmung kam es zur Sekretion eines zweiten HRP-Anteils mit einem Maximum bei etwa 15 min nach dem Temperatur-Wechsel (Höhe des Maximums: 0,02  $\text{nl min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ). Aufgrund der Beobachtung, daß dieser Transport kinetisch mit dem langsameren Transportweg bei der 37°C-Beladung ident war, wurde geschlossen, daß der langsamere Transcytose-

Prozeß bei 16°C blockiert wird, während der raschere Transportweg dabei nur verzögert und mengenmäßig reduziert wird (von etwa 1,7 nl min<sup>-1</sup> g<sub>Leber</sub><sup>-1</sup> auf ungefähr 0,09 nl min<sup>-1</sup> g<sub>Leber</sub><sup>-1</sup> - siehe Abb. 4. 19.).

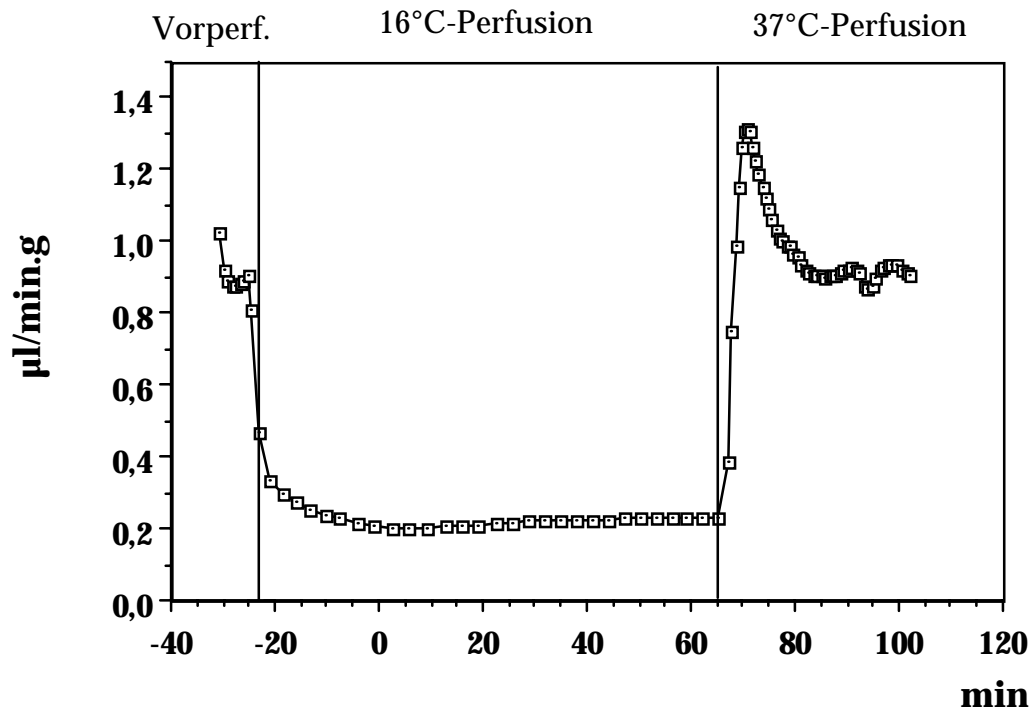


Abb. 4. 18.

Gallefluß bei der 16°C/37°C-Perfusion

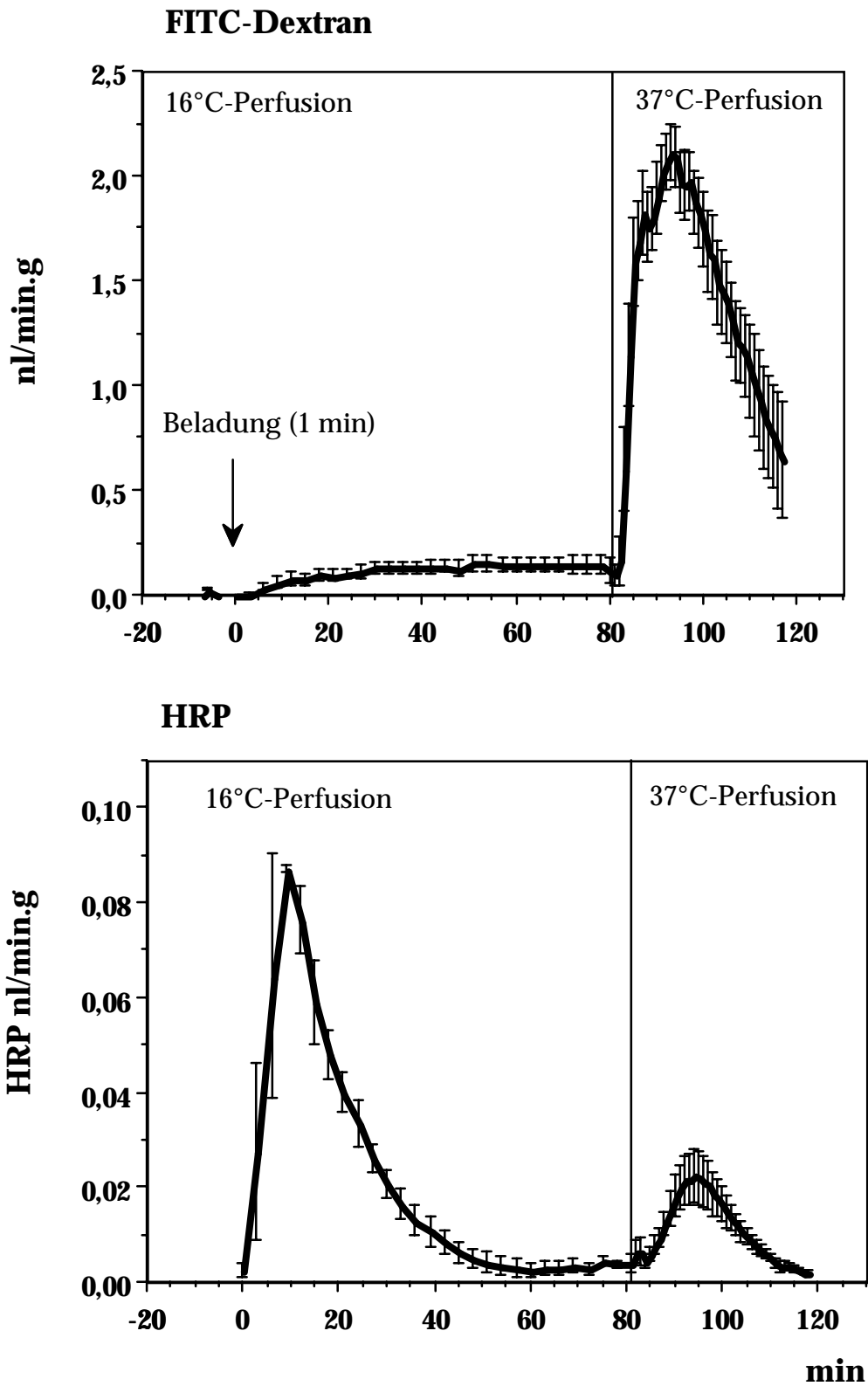


Abb. 4. 19.

Basolateral-apikaler Transport von FITC-Dextran und HRP nach 1 min Beladung bei 16°C, Perfusion bei 16°C und Erwärmung auf 37°C. Die Kurven stellen die

Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchen und die Standard-Abweichung der Mittelwerte dar.

#### **4. 3. 2. 3. Transcytose von HRP bei 11°C, 16°C und 37°C**

Nachdem der schnellere der beiden Transportwege, mit denen HRP in die Galle sezerniert wird, bei 16°C nicht blockiert wurde, wurde noch eine niedrigere Temperatur getestet. Nach der 37°C-Vorperfusion wurde zu diesem Zweck die Leber auf 11°C abgekühlt; danach wurde für 2 min bei dieser Temperatur mit HRP (3 mg/ml) beladen und es wurde 40 min ohne Marker bei 11°C weiter perfundiert. Anschließend wurde auf 16°C aufgewärmt und 75 min später auf 37°C.

Bei der 11°C-Perfusion sank der Gallefluß rasch auf ca.  $0,15 \mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ; es konnte aber bei dieser Temperatur bereits eindeutig ein Transport von HRP in die Galle nachgewiesen werden. Das Maximum lag zwischen 11 und 25 min nach der Markierung, trat also deutlich später als die Beladung auf und war auch gegenüber dem schnellen 37°C-Transportweg, der auch bei 16°C nicht blockiert wird, verzögert. (Der Totraum der Gallengangskanüle wurde bei der Zeitmessung des Transports berücksichtigt). Dies spricht dafür, daß dieser HRP-Anteil nicht durch eine parazelluläre Route in die Galle gelangt. Eine Zusammenstellung der Sekretionskurven nach Beladung bei 11°C, 16°C oder 37°C ist in Abb. 4. 20. wiedergegeben.

Aus den Integralen unter den Kurvenbereichen des ersten und des zweiten HRP-Transportweges lassen sich die absoluten Mengen errechnen, die auf der jeweiligen Route sezerniert wurden, und daraus die Temperatur-Abhängigkeit der beiden unterschiedlichen Transportwege. Daraus ist zu ersehen, daß der schnellere, bei niedrigerer Temperatur nicht blockierbare Weg eine geringere Temperatur-Abhängigkeit zeigt als der zweite Weg (siehe Abb. 4.21.).

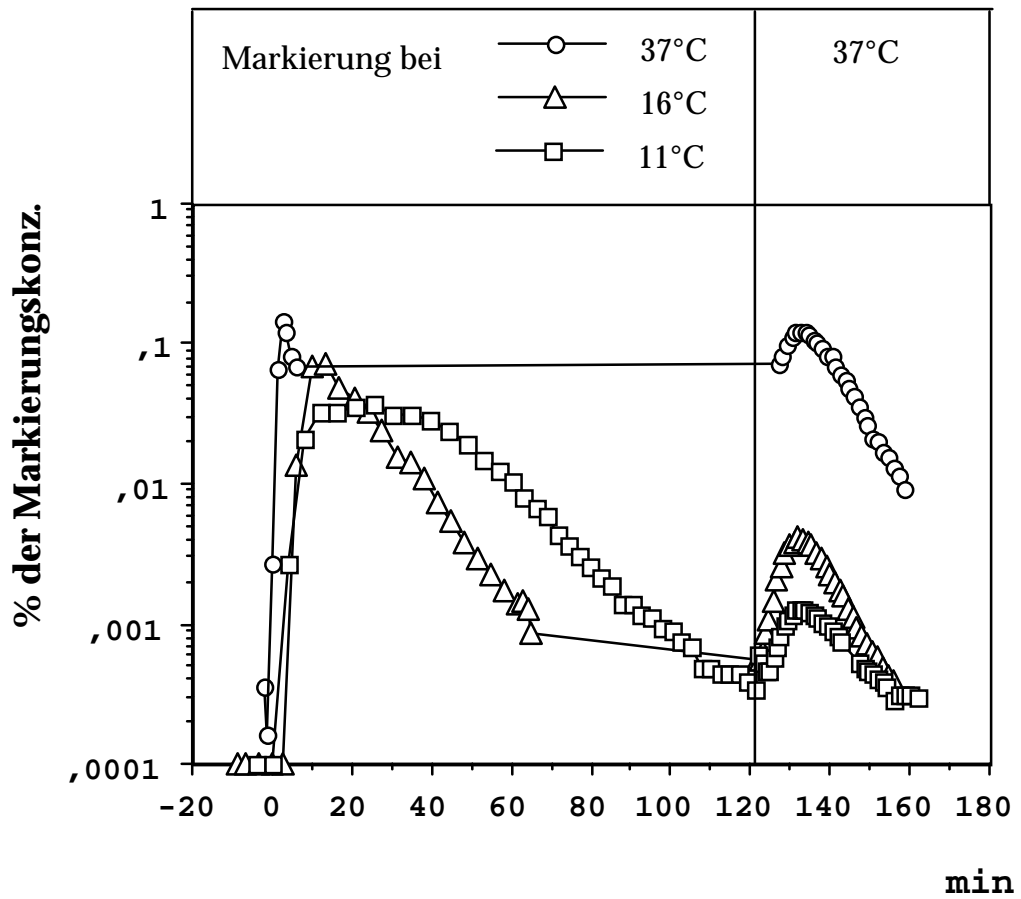


Abb. 4. 20.

Vergleich des basolateral-apikalen Transports von HRP nach Aufnahme bei 11°C, 16°C und 37°C.

### Temperatur-Abhängigkeit von HRP-Endocytose und Transcytose

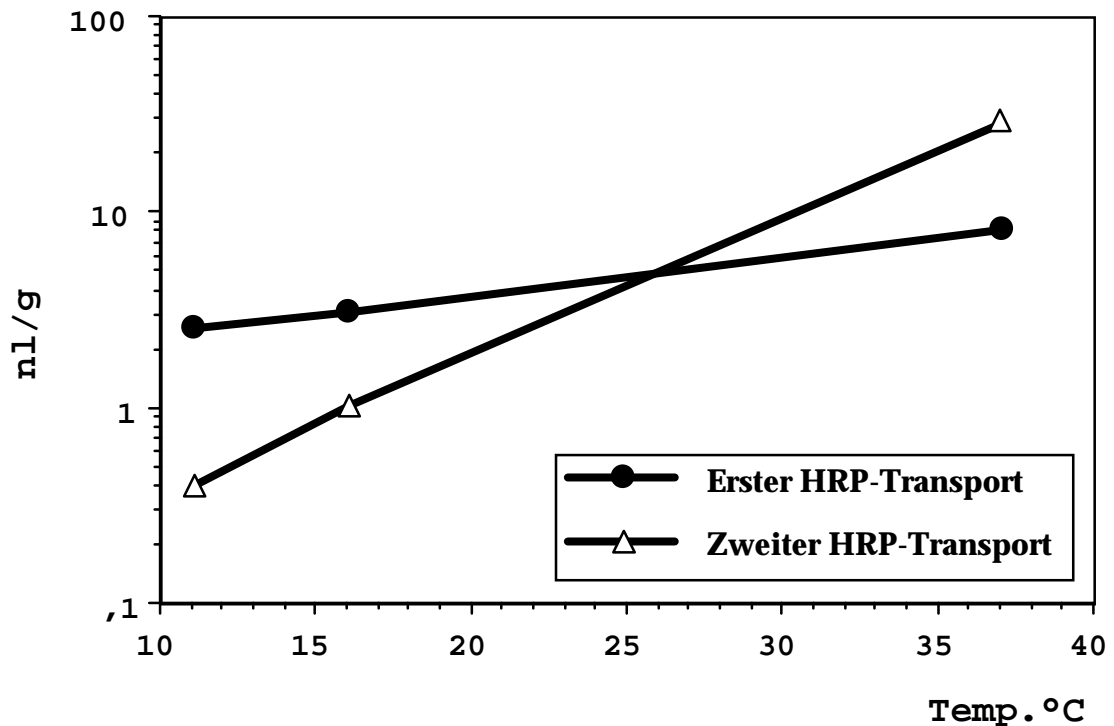


Abb. 4.21.

Temperaturabhängigkeit des Aufnahme-Vorganges der dem ersten bzw. dem zweiten HRP-Transportmechanismus vorausgeht. (Entspricht einem Arrhenius-Diagramm, jedoch mit °C anstatt  $K^{-1}$ ).

Die y-Achse (nl/g) entspricht dem pro g Leber aufgenommenen und insgesamt transcytierten Volumen in nl

#### 4. 3. 2. 4. Transcytose von HRP nach Beladung bei 4°C und Erwärmung auf 37°C

Das nächste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Verhalten von HRP und FITC-Dextran nach einer Beladung bei 4°C zu untersuchen, also unter Bedingungen bei denen es zu keiner Endocytose kommen kann. Es wurde sowohl eine rezyklisierende 4°C-Beladung, als auch eine Impuls-Markierung eingesetzt, gefolgt von Marker-freier Perfusion bei 4°C und Erwärmung auf 37°C. Unter beiden Versuchsbedingungen konnte kein nennenswerter Transport von FITC-Dextran (weder mit 70 kDa, noch mit 40 kDa) in die Galle beobachtet werden. Die Schlußfolgerungen daraus sind, daß die

Zellverbindungen bei dieser Temperatur für Moleküle dieser Größe nicht permeabel werden, und daß FITC-Dextran bei 4°C nicht an die Zelloberfläche binden kann. Im Gegensatz dazu konnte HRP nach der Erwärmung in einem signifikanten Ausmaß in die Galle sezerniert werden, wobei das Maximum bereits nach etwa 3 min erreicht war (siehe Abb. 4. 22.). Die insgesamt transportierte Menge betrug nach einer rezirkulierenden Beladung (45 min bei 4°C mit 50 µg/ml HRP in Gegenwart von 300 µg/ml Mannan) ca. 25 ng; bei einer Impuls-Markierung (1 min bei 4°C) mit 800 µg/ml HRP war die sezernierte Menge mit 36 ng sehr ähnlich. Aufgrund der Beobachtung, daß 40 kDa-Dextran (mit dem gleichen Molekulargewicht wie HRP) nicht biliär sezerniert wird, und daß die transportierte Menge an HRP bei sehr unterschiedlichen Beladungskonzentrationen nicht deutlich differiert, ist ein parazellulärer Transportmechanismus unwahrscheinlich. Vielmehr dürfte bei 4°C eine Bindung von HRP an die Zelloberfläche (wahrscheinlich an bestimmte Membranproteine erfolgen), wodurch es nach Erwärmung auf 37°C zu einer Transcytose kommt.

Eine Menge von 36 ng HRP entspricht etwa  $6 \times 10^{11}$  Molekülen, die pro Leber gebunden haben. Wenn man eine Anzahl von  $10^9$  Hepatocyten pro Leber voraussetzt, errechnet sich daraus eine Zahl von 600 Bindungsstellen pro Leberzelle. Diese 36 ng machen etwa 12% der normal bei 37°C transportierten Menge aus und stellen etwa 50% des rasch transportierten Anteils dar.

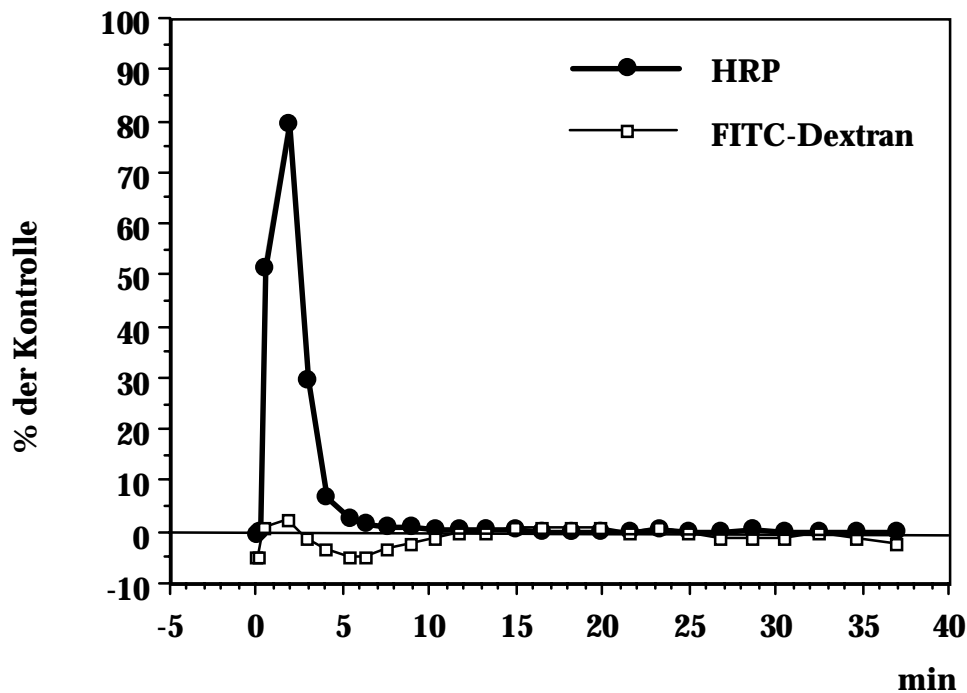


Abb. 4. 22.

Biliäre Sekretion von HRP nach 4°C-Beladung auf der basolateralen Seite.

Dargestellt ist die Sekretion in % des 1. Transportmaximums der Kontrolle (Impuls-Markierung bei 37°C; siehe Abb. 4. 17.)

#### **4. 3. 2. 5. Transcytose von HRP und FITC-Dextran unter hypertonen Bedingungen**

Nach einer Impuls-Markierung mit FITC-Dextran unter hypertonen Bedingungen wurde keine Reduktion in der Sekretionsrate (nl/(min.g)) detektiert; es konnte vielmehr eine Erhöhung beobachtet werden (siehe Abb. 4. 23.). Das errechnete höhere Maximum ist offensichtlich durch den stark erhöhten Gallefluß in diesem Versuchszeitraum bedingt. (Die Sekretionsrate errechnet sich aus der Konzentration in der Galle in ng/µl multipliziert mit dem Gallefluß und wird auf die Markerkonzentration in ng/nl bezogen). Die FITC-Dextran-Konzentration in der Galle betrug beim Maximum etwa 1,5% der Markierungskonzentration und war damit gleich groß wie der entsprechende Wert unter Kontrollbedingungen (siehe Abb. 4. 24.). Das



insgesamt pro g Leber transcytierte Volumen betrug unter den hypertonen Bedingungen im Durchschnitt 320 nl ( $\pm 50$ ); bei der Kontrolle war dieser Wert 365 nl/g ( $\pm 14$ ). Somit war keine statistisch signifikante Veränderung gegeben. Eine zweite Impulsmarkierung nach Regeneration der Leber (55 min nach der ersten Markierung) führte zur Sekretion der gleichen Menge an FITC-Dextran. Nach einer Beladung unter hypertonen Bedingungen mit HRP war jedoch die Sekretion, die durch den langsameren Transcytoseweg erfolgt, nahezu vollständig blockiert. Der schnellere Transportmechanismus zeigte ein höheres Maximum der Sekretionsrate (siehe Abb. 4. 25.), wobei jedoch die insgesamt transportierte Menge reduziert war. Die scheinbare Verzögerung der Transports ist durch die fehlende Gallensekretion während der hypertonen Perfusion begründet. Die HRP-Konzentration in der Galle betrug beim Maximum 0,08 - 0,09% der Markierungskonzentration. Bei der Kontrolle betrug dieser Wert etwa 0,15%. Die Gesamtsekretion betrug für HRP unter hypertonen Bedingungen 8,66 nl/g ( $\pm 2,6$ ), während sie unter Kontrollbedingungen einen mittleren Wert von 40 nl/g ( $\pm 3,7$ ) erreichte. Die Aufnahme und Transcytose von HRP sind folglich unter Bedingungen, bei denen die Clathrin-abhängige Endocytose gehemmt ist, deutlich reduziert.

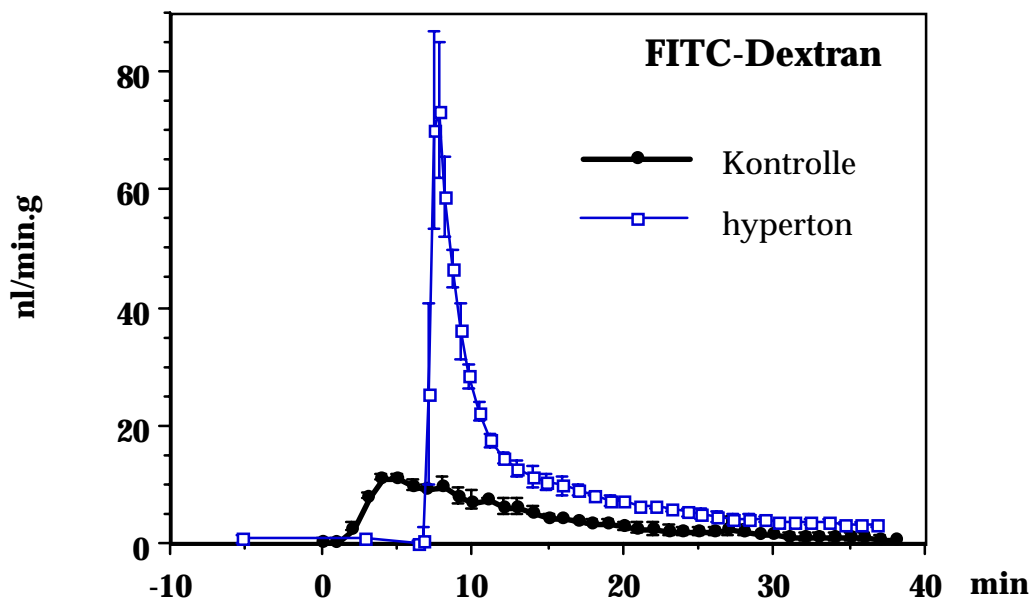


Abb. 4. 23. Sekretionsrate von FITC-Dextran nach Markierung unter hypertonen Bedingungen (Mittelwerte aus zwei Versuchen und Bandbreite der Werte) und Vergleich mit der Kontrolle (Mittelwerte aus drei Versuchen und Standardabweichung).

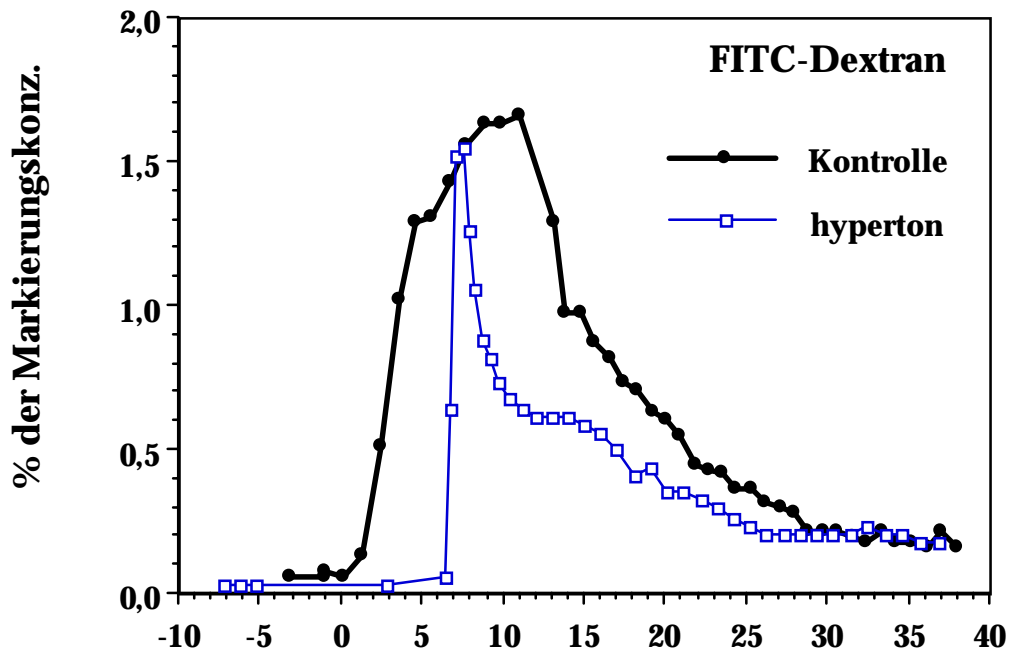


Abb. 4. 24.

Biliäres FITC-Dextran in % der Markierungskonzentration nach Beladung unter hypertonen Bedingungen und Vergleich mit der Kontrolle.

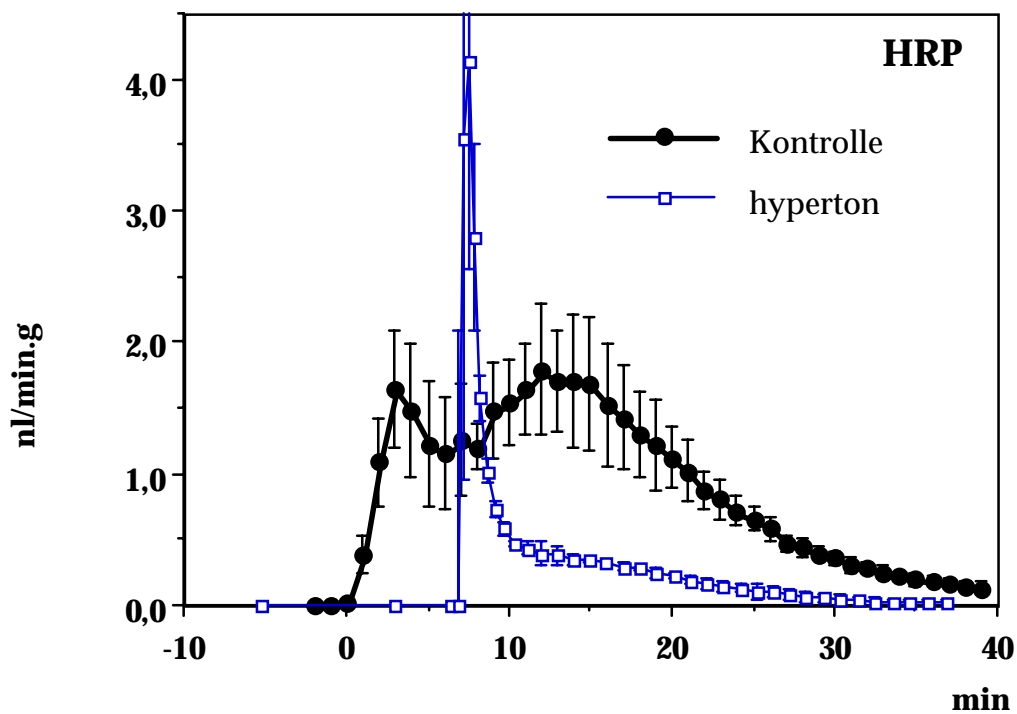


Abb. 4. 25. Sekretionsrate von HRP nach Markierung unter hypertonen Bedingungen (Mittelwerte aus 2 Versuchen und Bandbreite der Werte) und Vergleich mit der Kontrolle (Mittelwerte aus drei Versuchen und Standardabweichung).

#### 4. 3. 2. 6. Transcytose von HRP und FITC-Dextran unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen

Ein zweites experimentelles System, von dem beschrieben wurde, daß es die Clathrin-abhängige Endocytose hemmen kann, ist die Erschöpfung intrazellulären Kaliums durch eine Kalium-freie Inkubation (normalerweise nach einem hypotonen Schock). In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, daß eine Kalium-freie Perfusion der isolierten Leber ebenso wie die hypertone Perfusion eine deutliche Reduktion der HRP-Sekretion verursacht, während gleichzeitig die Sekretion von FITC-Dextran keiner Hemmung unterliegt. Ähnlich wie bei der Methode der Beladung unter hypertonen Bedingungen wurde die Leber erst relativ kurz vor der Markierung (6 min vorher) auf Kalium-freie Perfusion umgestellt. Der Perfusionspuffer enthielt statt der K<sup>+</sup>-Salze die entsprechenden Na<sup>+</sup>-Salze und war somit isoton. Nach der Beladung mit dem entsprechenden Marker (ebenfalls in Kalium-freiem Puffer) wurde weitere 3 min Kalium-frei perfundiert und anschließend wieder auf den normalen Puffer umgeschaltet. Der Gallefluß verringerte sich während der Kalium-freien Perfusion; er kam jedoch nicht wie bei der hypertonen Perfusion zum Erliegen (siehe Abb.4. 26.).

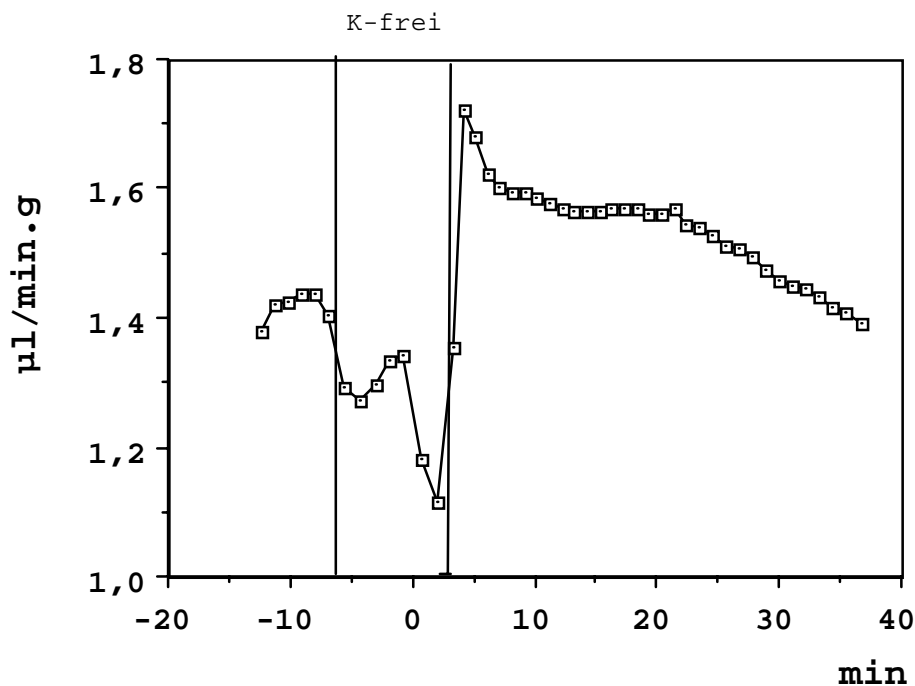


Abb. 4. 26.: Einfluß der Kalium-freien Perfusion auf den Gallefluß

Nach der Kalium-freien Perfusion war die Sekretionsrate von FITC-Dextran, wahrscheinlich ebenfalls aufgrund der choleretische Phase beim Zurückschalten auf normalen Puffer, erhöht (siehe Abb. 4. 27.).

Die Gesamtsekretion betrug 373 nl/g ( $\pm$  59) und unterschied sich somit nicht signifikant vom Kontrollwert mit 365 nl/g ( $\pm$  14).

Im Gegensatz zu dieser Charakteristik wurde die HRP-Sekretion deutlich gehemmt; beide Transportraten wurden reduziert, wobei die Hemmung des zweiten, langsameren Transportweges noch stärker ausgeprägt war (siehe Abb. 4. 28.). Die insgesamt sezernierte Menge an HRP war mit 13,5 nl/g ( $\pm$  2,7) eindeutig niedriger als bei der Kontrolle, bei der 40,2 ( $\pm$  3,7) nl pro g Leber aufgenommen und transcytiert wurden.

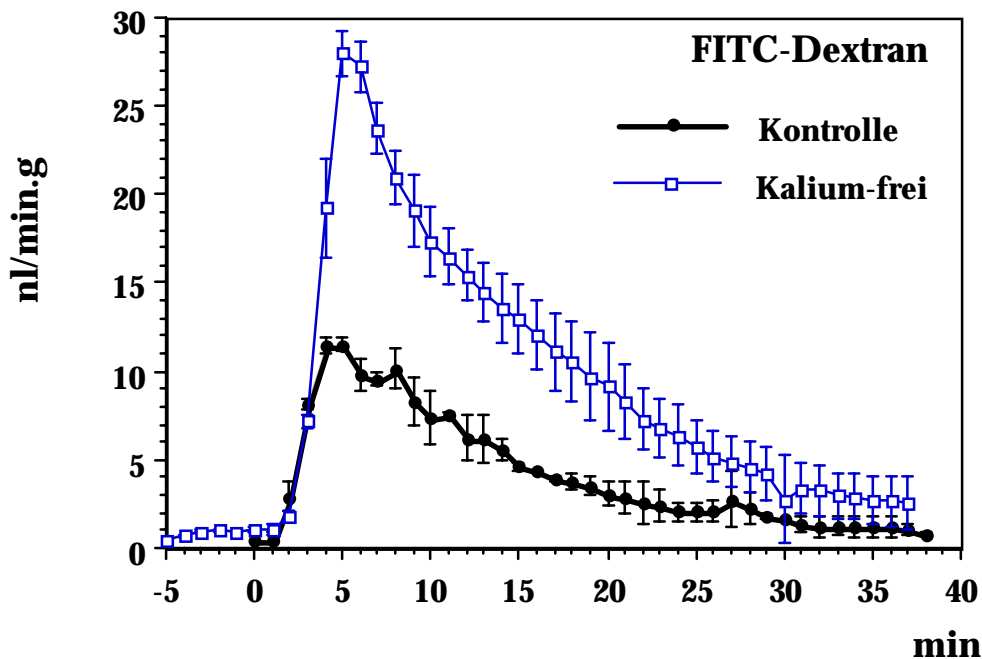


Abb. 4. 27.

Sekretionsrate von FITC-Dextran nach Kalium-freier Perfusion und Vergleich mit der Kontrolle (Mittelwerte aus drei Versuchen und Standardabweichungen).

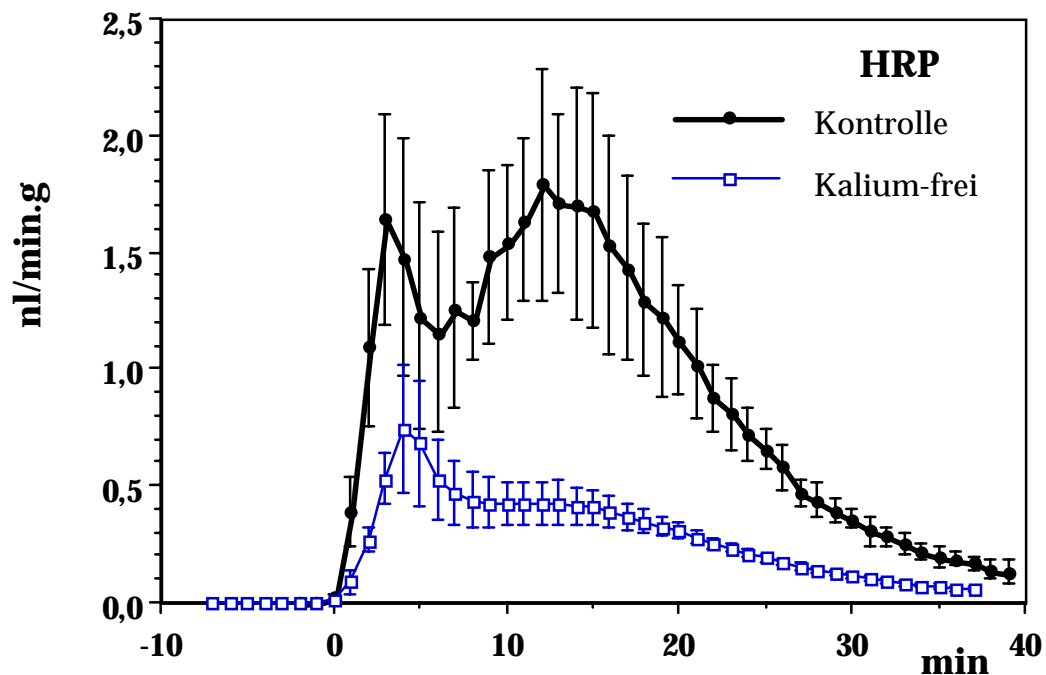


Abb. 4.28.

Sekretionsrate von HRP nach Kalium-freier Perfusion und Vergleich mit der Kontrolle (Mittelwerte aus 3 Versuchen und Standardabweichungen).

Wenn nach der fast vollständigen Sekretion des Markers und Regeneration der Leber nach der Kalium-freien Perfusion eine zweite Impulsmarkierung durchgeführt wurde, so konnte im Fall von FITC-Dextran eine nahezu idente Sekretionskurve beobachtet werden; bei HRP kam es jedoch zu einer deutlich höheren Sekretion als zuvor.

Der rasche Transportweg erreichte in der regenerierten Leber etwa den Wert, der unter Kontrollbedingungen vorliegt; die zweite, langsamere Transportroute zeigte jedoch keine Regenerierung (siehe Abb. 4. 29.). Diese Erscheinung ließ vermuten, daß die Kalium-freie Perfusion einen zu-mindest teilweise reversiblen Effekt verursacht. In einem Kontroll-experiment, bei dem unter normalen Bedingungen 1 h perfundiert wurde, bevor mit HRP die Impulsmarkierung erfolgte, zeigte jedoch die HRP-Sekretion ebenfalls nur ein Maximum (siehe 4. 3. 1. 7. und Abb. 4. 30.). Somit dürfte die fehlende Regeneration des zweiten HRP-Transportweges nicht von der Kalium-freien Perfusion verursacht sein.

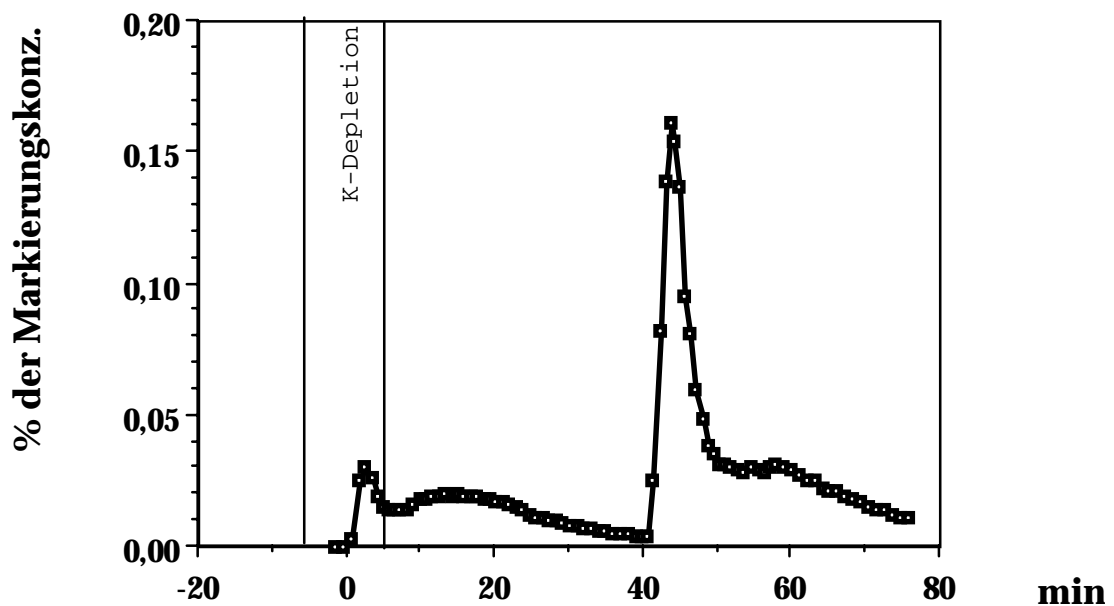


Abb. 4. 29.

Biliäre Sekretion von HRP nach Kalium-freier Perfusion und nach Regenerierung der Leber (2. Markierung nach 40 min).

#### 4. 3. 2. 7. Transcytose von HRP nach einer Stunde Vorperfusion bei 37°C

Die Untersuchung der Transcytose von HRP nach 1 h Vorperfusion unter normalen Bedingungen wurde eigentlich als Kontrolle für jene Experimente durchgeführt, bei denen nach einer hypertonen oder Kalium-freien Perfusion eine Regenerierung der Leber angestrebt wurde, wodurch eine interne Kontrolle gegeben wäre. Nachdem zwar sowohl nach der hypertonen, als auch nach der Kalium-freien Perfusion eine Reversibilität hinsichtlich des schnellen HRP-Transportweges erzielt wurde, nicht jedoch für den zweiten Transportweg, mußte die HRP-Sekretion nach einer ebenso langen normalen Perfusion untersucht werden. Der Gallefluß blieb unter diesen Bedingungen konstant auf einem normalen Wert.

Nach der Beladung mit HRP konnte nur das erste Maximum eindeutig festgestellt werden, nicht aber das Maximum des langsamen Transportweges. Die rasche Transportroute erschien im Vergleich zur Kontrolle stimuliert (siehe Abb. 4. 30.). Die Signifikanz dieses Phänomens wurde jedoch nicht überprüft. Die Tatsache, daß der Transport über den langsamen Weg nicht mehr klar nachweisbar ist, ist in Übereinstimmung mit den

Regenerationsexperimenten. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten wäre, daß es bei der ausgedehnten Vorperfusion zu einem Verlust oder einer Veränderung zelloberflächenständiger Proteine kommt, an die HRP unter Normalbedingungen adsorbiert.

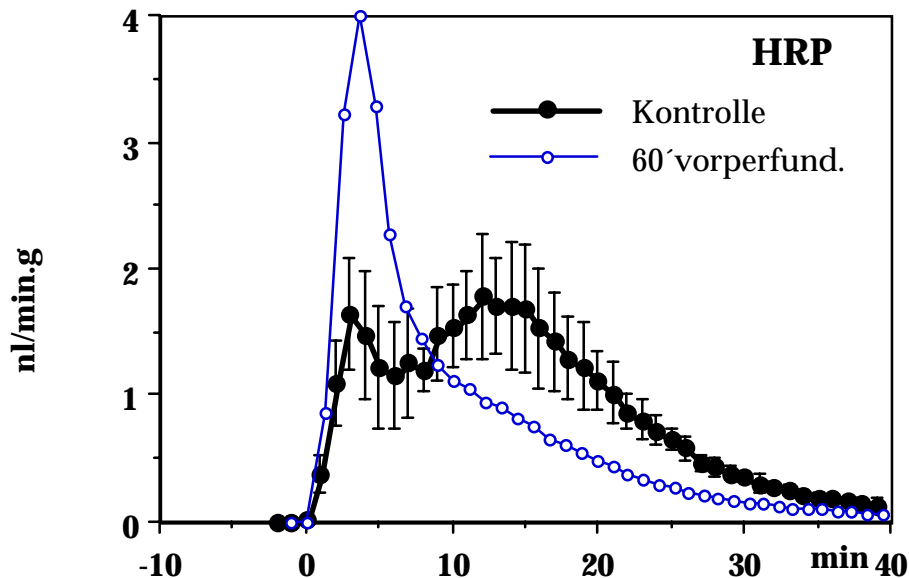


Abb. 4. 30.

Biliäre Sekretion von HRP nach 1 h Vorperfusion unter normalen Bedingungen (Einzelwerte) und Vergleich mit der Kontrolle (Mittelwerte aus drei Experimenten).

#### 4. 3. 3. VERGLEICH ZWISCHEN HRP, FITC-DEXTRAN UND ASOR

Ein Vergleich zwischen den Verbindungen HRP, FITC-Dextran und ASOR zeigt, daß das Rezeptor-vermittelt und Clathrin-abhängig transcytierte Asialoglykoprotein unter hypertonen Bedingungen eine ähnliche Hemmung des basolateral-apikalen Transports erfährt, wie das Enzym HRP. Die Transcytose von FITC-Dextran wird hingegen kaum reduziert (siehe Abb. 4. 31.). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß bei der Transcytose von HRP Clathrin-abhängige Mechanismen beteiligt sind. Zugleich sprechen die Befunde jedoch eindeutig dafür, daß eine Clathrin-unabhängige Endocytose und Transcytose in Hepatocytten existiert.

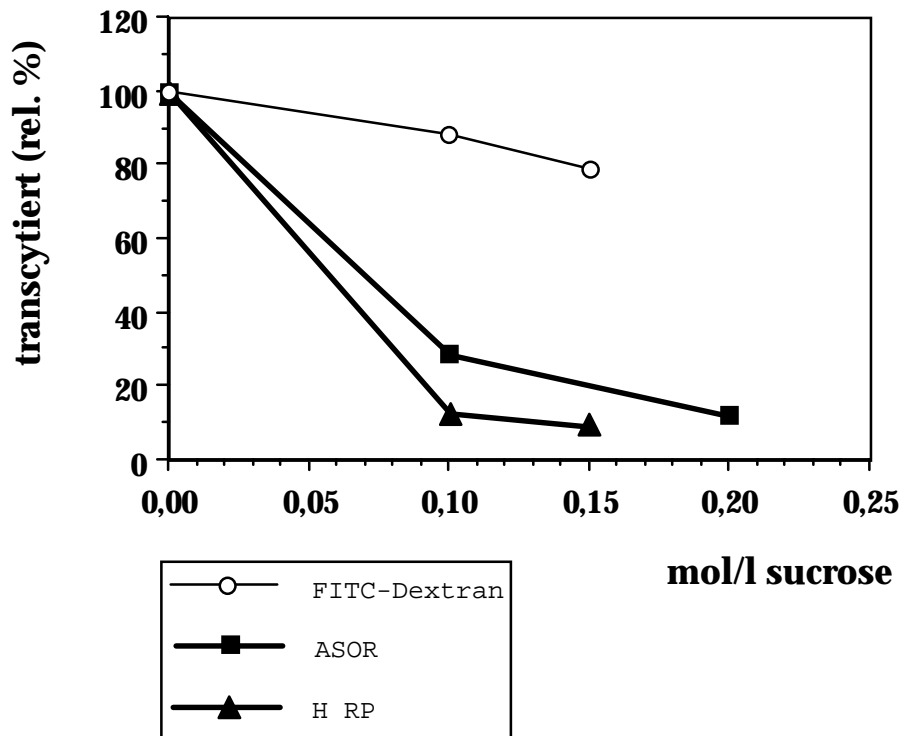


Abb. 4. 31.

Hemmung der Transcytose von HRP und ASOR in Abhängigkeit von der Saccharose-Konzentration im Beladungspuffer. Die Transcytose von FITC-Dextran bleibt weitgehend unbeeinflusst.

Ein genauere Vergleich zwischen dem Transcytose-Verhalten von FITC-Dextran und HRP zeigt, daß interessanterweise die Gesamtsekretion von FITC-Dextran weit höher ist als jene von HRP (bezogen auf gleiche Markerkonzentration), obwohl HRP im Gegensatz zu FITC-Dextran adsorptive Eigenschaften aufweist (siehe Abb. 4. 32.).



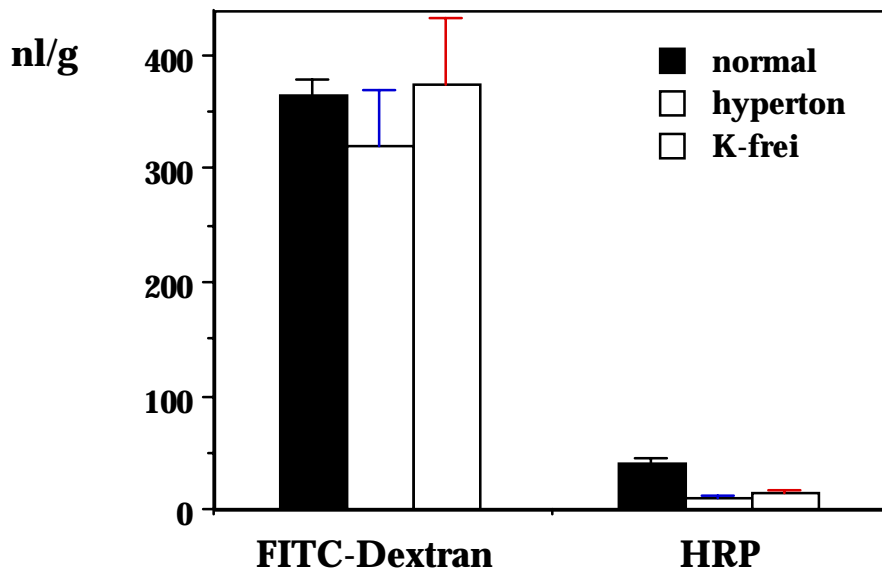


Abb. 4. 32.

Vergleich zwischen FITC-Dextran und HRP-Transcytose unter normalen, hypertonen und Kalium-freien Bedingungen.

Die Hemmung der HRP-Transcytose durch hypertone oder Kalium-freie Perfusion betrifft beide Transportwege, wobei jedoch der zweite viel stärker beeinflusst wird, als der erste (siehe Abb. 4. 33.). Die Tatsache, daß auch der rasche basolateral-apikale Transport durch diese beiden experimentellen Manipulationen reduziert wird, spricht jedenfalls gegen einen parazellulären Transportmechanismus. Falls dieser Transport parazellulär wäre, müßte auch theoretisch die Sekretion unter hypertonen Bedingungen erhöht anstatt reduziert sein, da es bei der hypertonen Perfusion zu einer osmotisch bedingten Reduktion des Zellvolumens kommt, und damit die lateralen Bereiche weiter geöffnet werden.

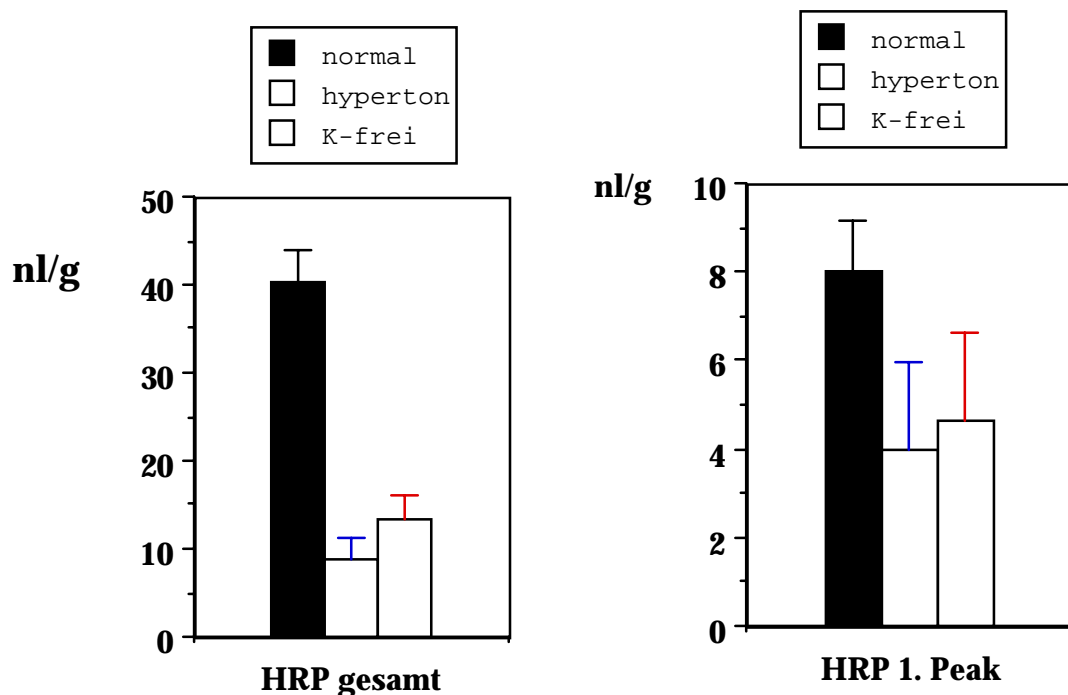


Abb. 4. 33.

Hemmung der biliären HRP-Sekretion durch hypertone und Kalium-freie Bedingungen: Der schnelle Transportmechanismus ist weniger sensitiv als die gesamte HRP-Sekretion.

## 4. 4. FUSIONSPROZESSE

### 4. 4. 1. ETABLIERUNG EINES *IN VITRO* FUSIONSSYSTEMS

Um die Fusionseigenschaften verschiedener endozytischer Kompartimente untersuchen zu können, wurden Endosomen oder Lysosomen einer Leber möglichst selektiv mit einem biotinyliertem Marker (BASOR, Biotin-Dextran) beladen, während die Endosomen eines zweiten Versuchsorgans mit Avidin markiert wurden. Die beiden komplementär markierten Kompartiment-Arten wurden dann für *in vitro*-Fusionsexperimente eingesetzt, bei denen die Bildung des Avidin-Biotin-Komplexes als Folge der Fusion in einem ELISA-System gemessen wurde. Die Grundzüge, nach denen dieses System zur *in vitro*-Rekonstituierung endosomaler Fusionsprozesse aufgebaut wurde, sind in Abb. 4. 34. dargestellt.

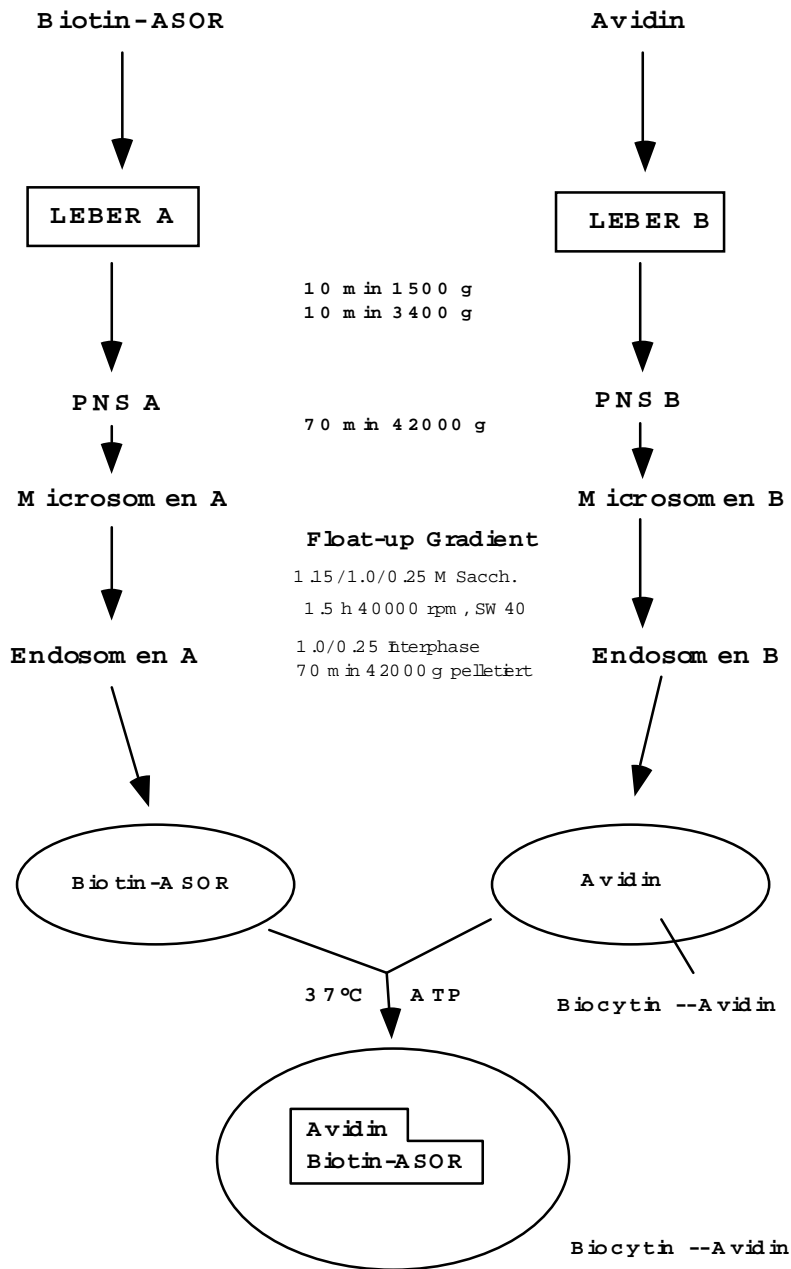


Abb. 4. 34.

Allgemeines Prinzip des *in vitro*-Fusionstests von Endosomen:

Aufgrund der Tatsache, daß eine selektive Markierung angestrebt wurde, wurden für die Fusion nicht ausschließlich Endosomen-angereicherte Golgi-Fractionen (als Endosomen A und B bezeichnet) eingesetzt, sondern auch PNS- oder Mikrosomen-Präparationen.

#### 4. 4. 1. 1. Bestimmung der optimalen Beschichtungskonzentration und der Linearität des ELISA-Systems

Zur Ermittlung jener Verdünnung des primären Antikörpers (Anti- $\alpha_1$ -saures Glykoprotein) bei der noch keine Verringerung des Signals auftritt, wurden BASOR-Standardkurven (0 - 10 ng/well) mit einem Avidin-Überschuß (50 ng/well) auf Platten, die mit verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers beschichtet wurden, gemessen. Es hat sich herausgestellt, daß eine Abnahme des Signals erst ab einer Verdünnung von 1:1000 auftritt. Weiters konnte gezeigt werden, daß das ELISA-System bis zu einer Menge von etwa 3 ng BASOR/well linear reagiert, und darüber (bis 10 ng/well) nur eine geringe Abflachung der Sensitivitätskurve auftritt (Abb. 4. 35.).

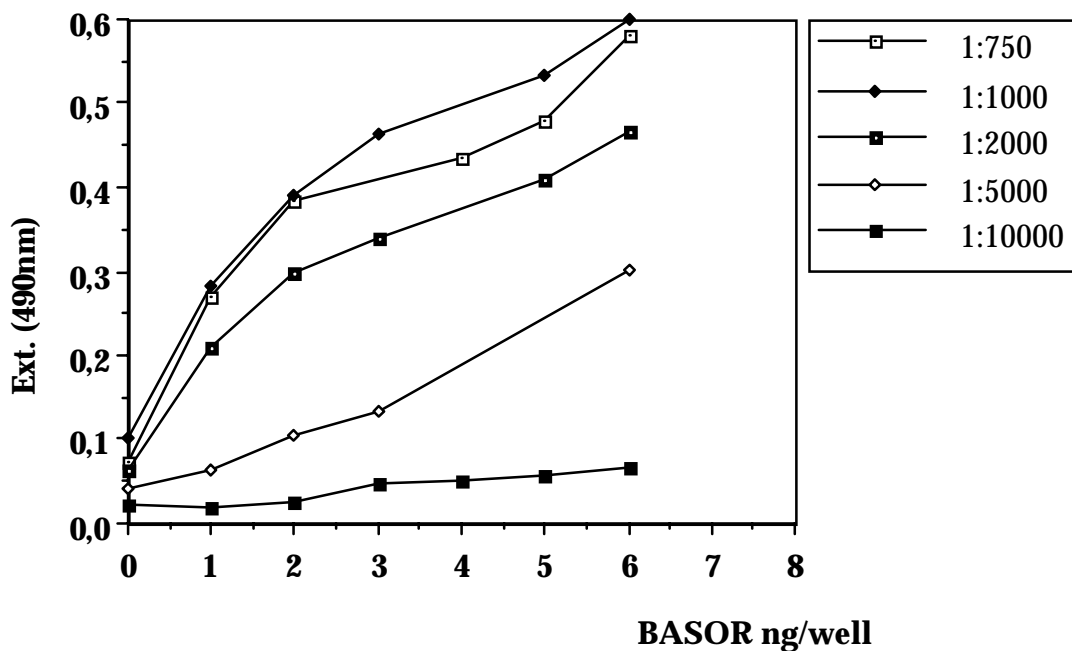


Abb. 4. 35.

Bestimmung der optimalen Konzentration von Anti- $\alpha_1$ -saurem Glykoprotein-Antikörper bei der Beschichtung von ELISA-Platten.

#### 4. 4. 1. 2. Bestimmung des Biotinylierungsgrades von BASOR

Um zu ermitteln bis zu welcher Menge an BASOR das ELISA-System linear reagiert, wurde eine BASOR-Standardkurve von 0 - 10 ng/well (bei Avidin im Überschuß: 50 ng/well) eingesetzt. Dabei hat sich gezeigt, daß die Methode unter den angegebenen Bedingungen bis zu einem Gehalt von 6 ng/well als linear anzusehen ist. Um den Biotinylierungsgrad von BASOR zu bestimmen, wurden nun 2 Avidin-Standardkurven (0 - 5 ng/well) bei 2 konstanten (unter dem Sättigungsgrad liegenden) BASOR-Konzentrationen (0,4 und 0,8 ng/well) erstellt (siehe Abb. 4. 36.). Dabei konnte entnommen werden, bei welchem Avidin : BASOR - Verhältnis ein Signalmaximum erreicht ist, und über die Molekulargewichte (ASOR: 38 kDa; Avidin: 68 kDa) konnte das molare Verhältnis Avidin : BASOR und somit die Anzahl der Biotin-Moleküle pro ASOR-Molekül errechnet werden. Diese Bestimmung ergab eine Anzahl von etwa 2,1 Biotinresten/ASOR.

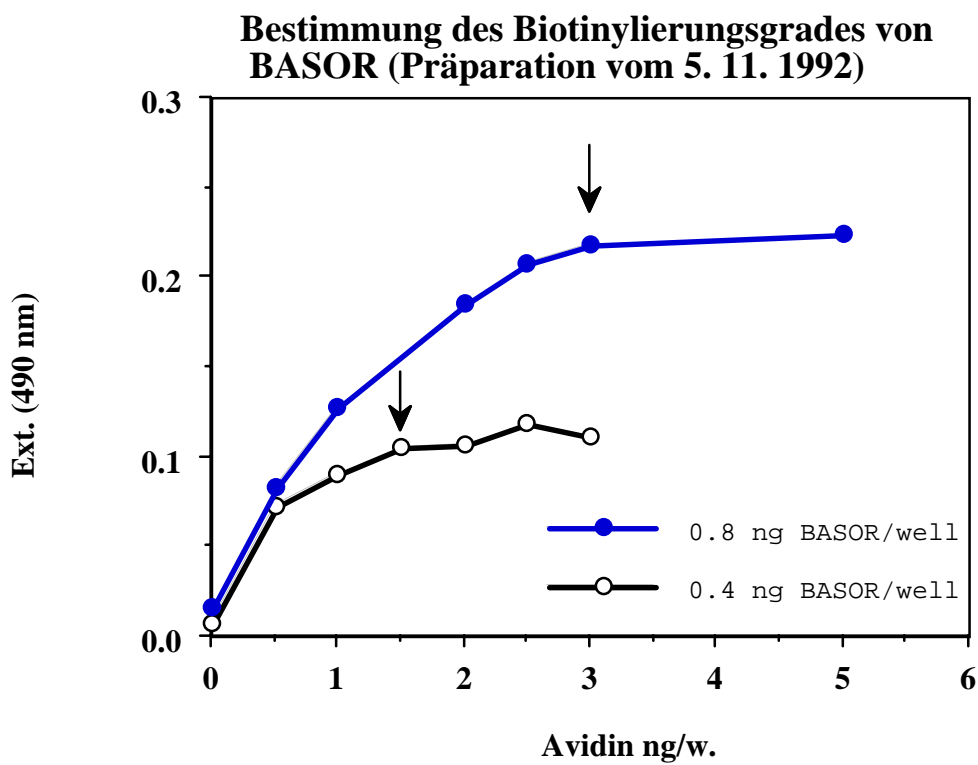


Abb. 4. 36.

#### 4. 4. 1. 3. Charakterisierung des galaktosylierten Avidins im ELISA, durch SDS-PAGE und in der isoliert perfundierten Leber

Um zu untersuchen, ob die Konjugation von Galaktose-Resten an Avidin durch eine schwächere Bindung des Anti-Avidin-Antikörpers zu einer Reduktion der Detektierbarkeit im ELISA-System führt, wurden Standardkurven für alle drei Avidin-Konjugate bei mit konstanter BASOR-Zugabe (20 ng/well) erstellt und mit einer Standardkurve von nicht-derivatisiertem Avidin verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, daß bei den beiden höher belegten Konjugaten eine deutliche Abnahme des ELISA-Signales zu beobachten war, während das am schwächsten belegte Konjugat (mit etwa 40 Galaktose-Resten pro Avidin-Molekül) die gleiche Charakteristik zeigte wie unkonjugiertes Avidin (Abb. 4. 37.).

Aus diesem Grund wurde in weiterer Folge nur mehr dieses Konjugat verwendet. Eine SDS-PAGE-Analyse der drei Konjugate zeigte einen mit zunehmendem Belegungsgrad steigenden Gehalt an Bruchstücken und niedermolekularen Verbindungen.

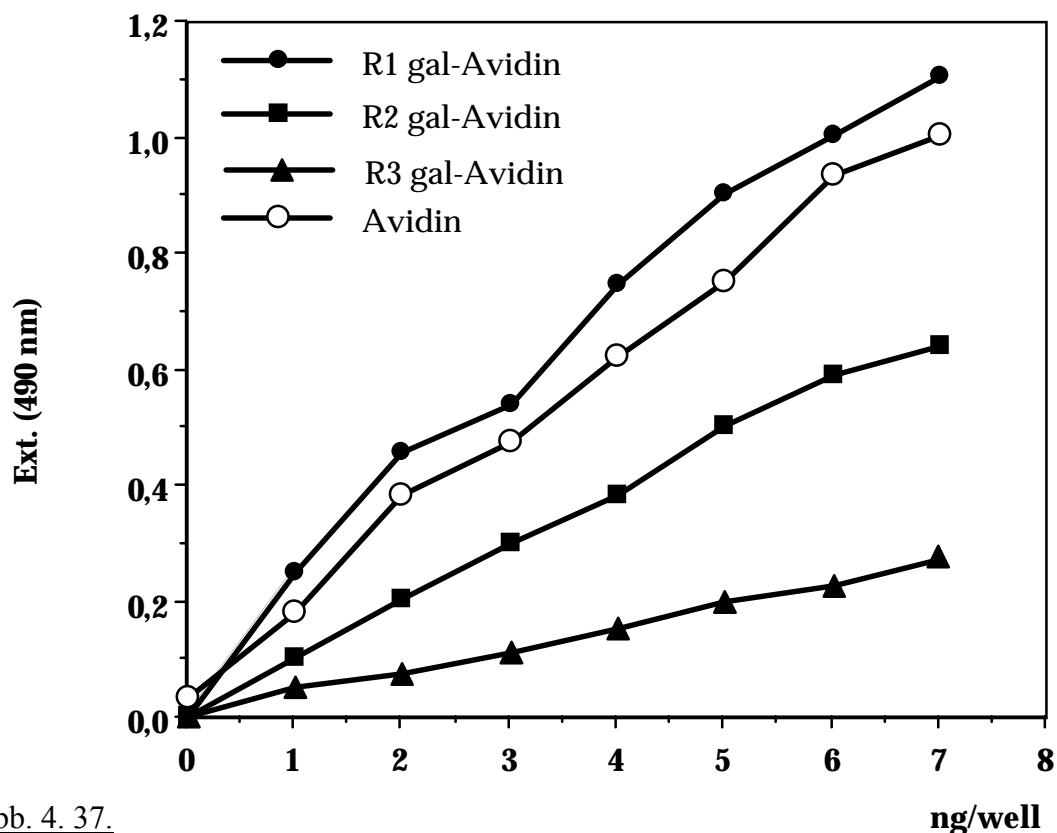


Abb. 4. 37.

ELISA-Test der drei unterschiedlichen Galaktose-Avidin-Konjugate: R1 gal-Avidin: Belegung = 40 : 1, R2 gal-Avidin: Belegung = ca. 65 : 1 (bei der Synthese 75 : 1), R3 gal-Avidin: Belegung = ca. 65 : 1 (bei der Synthese 300 : 1).

#### **4. 4. 1. 4. Aufnahme von <sup>125</sup>J-gal-Avidin in der isoliert perfundierten Leber und Kompetitierung der Aufnahme durch ASOR**

Um zu untersuchen, ob das galaktosylierte Avidin in der isoliert perfundierten Leber durch Rezeptor-vermittelte Endocytose über den Asialoglykoprotein-Rezeptor aufgenommen wird, wurden Aufnahme- und Kompetitierungsversuche mit <sup>125</sup>J-jodiniertem R1 gal-Avidin durchgeführt. Es wurde jene Fraktion der jodinierten Präparation verwendet, die die höchste Präzipitierbarkeit (94,3%) und die höchste spezifische Aktivität aufwies (278900 cpm/μg Protein).

Nach einer Vorperfusion für 15 min bei 37°C wurde die Leber für 1 min bei 37°C mit etwa 6 μg jodiniertem R1-gal-Avidin (Fraktion 2) markiert (in Anwesenheit von 1 mg Mannan, um eine Bindung an den Mannose-Rezeptor von Kupfferzellen zu verhindern), und anschließend ohne Marker bei 37°C weiter perfundiert. Das Perfusat wurde bis 6 min nach der Beladung gesammelt und die nicht aufgenommene Radioaktivität darin bestimmt (die Rezyklisierung von internalisierten Verbindungen beginnt nach etwa 6 min). Daraus errechnete sich eine Aufnahme von etwa 4%. Diese Aufnahmerate liegt zwar deutlich unter jener von Asialo-Orosomuroid, sie war jedoch klar auf eine Rezeptor-vermittelte Internalisierung zurückzuführen. Dies wurde in einem Kompetitierungs-experiment nachgewiesen, in dem die Aufnahme von jodiniertem R1 gal-Avidin (5,7 μg) durch Zugabe von 190 μg ASOR (60-facher molarer Überschuß) vollständig gehemmt wurde. Die Endocytose von R1 gal-Avidin erfolgt also über den gleichen Rezeptor wie die ASOR-Endocytose.

#### **4. 4. 2. *IN VITRO* FUSION ZWISCHEN FRÜHEN ENDOSOMEN, SOWIE ZWISCHEN FRÜHEN UND SPÄTEN ENDOSOMEN**

Ein Ziel unserer Studie war es, zu untersuchen, ob unterschiedliche Endosomen-Populationen von Hepatocyten *in vitro* miteinander fusion-ieren können.

Wir verwendeten für unseren Versuchsansatz kinetisch frühe Endosomen, die mit BASOR markiert worden waren (3 min bei 37°C), späte Endosomen (Beladung: durch Perfusion für 1 min bei 37°C mit BASOR, gefolgt von 10 min 37°C-Perfusion ohne Marker), sowie als Reaktionspartner Avidin-beladene frühe Endosomen (2 h bei 16°C markiert).

Es hat sich gezeigt, daß bei unserem experimentellen Ansatz kinetisch frühe Hepatocyten-Endosomen nicht nur untereinander fusionieren können, sondern auch mit kinetisch späten Endosomen. Späte Endosomen, die nach der angegebenen Methode markiert wurden, zeigten jedoch bei der trägerfreien Elektrophorese (Free-Flow Electrophoresis) ein anderes Wanderungsverhalten als frühe Endosomen, und unterschieden sich auch von diesen in ihrer zellulären Lokalisation, da sie hauptsächlich im perikanalikulären anstatt im peripheren Zellbereich aufzufinden waren.

#### **4. 4. 2. 1. Kinetik und ATP-Abhängigkeit der Fusion**

Die *in vitro* Fusion zwischen frühen und späten Endosomen erfolgte etwa mit der gleichen Kinetik, wie die Fusion zwischen frühen Endosomen untereinander. In beiden Fällen war die Reaktion nach ca. 10 min nahezu vollständig abgeschlossen (siehe Abb. 4. 38.). Es konnten keine Unterschiede in der Fusionskinetik zwischen PNS, Mikrosomen und angereicherten Endosomen-Präparationen als Ausgangsmaterial beobachtet werden.

Die Fusion erfolgte bei 37°C in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems (1 mmol/l ATP, 5 mmol/l Phosphokreatin, 11 units/ml Phospho-kreatin-Kinase); die Zugabe eines ATP-erschöpfenden Reaktionsgemisches verhinderte ein Fusionssignal, ebenso die Inkubation bei 0°C. Die Bedingung bei der Fusion hinsichtlich der Menge an Marker, die im Versuchsansatz eingesetzt wurde, sind in Tab. 4. 1. beschrieben.



Proteinkonzentration von PNS	ca. 30 mg/ml
Proteinkonzentration von Mikrosomen (je nach Konzentrierung)	ca. 6 - 20 mg/ml
Endkonzentration an vesikulärem Protein	ca. 2 - 4 µg/ml
Endkonzentration an endosomalem Protein	ca. 40 - 80 µg/ml
BASOR-Gehalt von BASOR-PNS	ca. 0,12 ng/µl
Latenz von BASOR-PNS	ca. 70%
BASOR-Endkonzentration	ca. 0,6 nmol/l
Avidin-Gehalt von Avidin-Mikrosomen	ca. 1,17 ng/µl
Latenz von Avidin	ca. 40%
Avidin-Endkonzentration	ca. 3,4 nmol/l

Tab. 4. 1.

Proteinkonzentration und Gehalt an Marker bei verschiedenen Präparationen, sowie entsprechende Endkonzentrationen im Versuchsansatz.

### Kinetik der Endosomen-Fusion

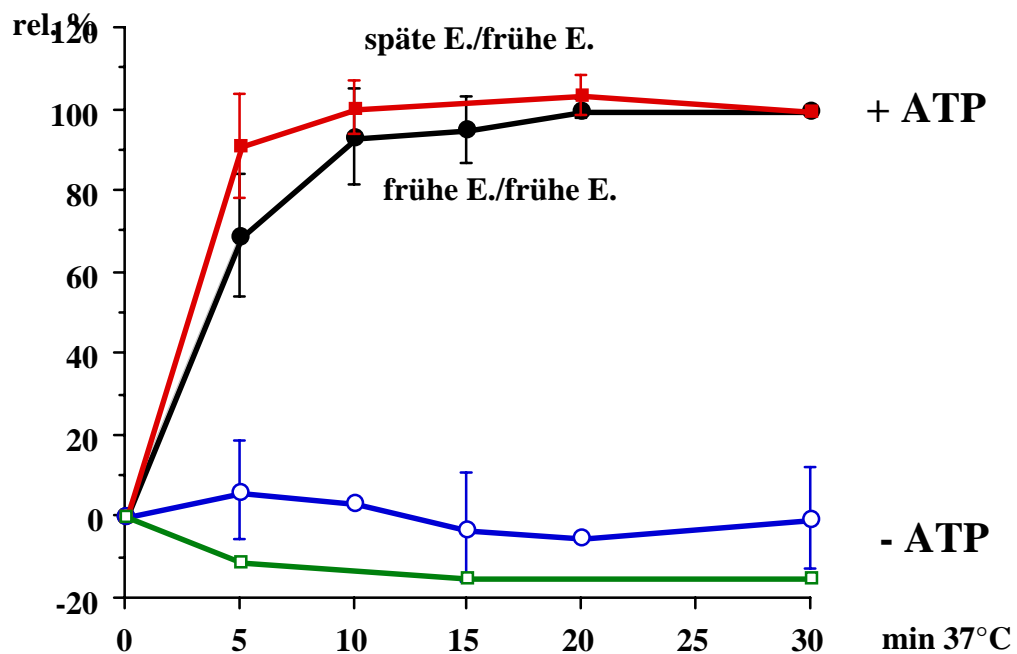


Abb. 4. 38.

Kinetik der Fusion früher Endosomen untereinander, bzw. zwischen frühen und späten Endosomen; sowie ATP-Abhängigkeit dieser Fusion. Dargestellt sind die Mittelwerte

von 3 - 11 Versuchen (Ausgangsmaterial: PNS oder angereicherte Endosomen-Fraktionen)

#### **4. 4. 2. 2. Fusionseffizienz**

Um ein verfrühtes Reaktionsende aufgrund von ATP-Depletierung zu vermeiden, wurde eine höhere Konzentration an ATP (2,5 mmol/l anstatt 1 mmol/l) und an Phosphokreatin (8 mmol/l anstatt 5 mmol/l) eingesetzt. Als Leerwert wurde das Reaktionsgemisch ohne 37°C-Inkubation verwendet. Die Fusionsprobe wurde 30 min bei 37°C inkubiert.

Zur Bestimmung der Fusionseffizienz wurde das Fusionsignal mit dem maximal möglichen Signal, das beim Aufbrechen der Membranen durch Detergenzien in Abwesenheit von Biocytin entsteht, verglichen.

Da der Teil des Markers, der außerhalb der Endosomen vorliegt, ebenfalls zum maximal möglichen Signal beiträgt, würde ein direkter Vergleich des Fusionssignals mit diesem Maximumsignal keine exakte Aussage über die Effizienz der Fusion liefern, bei der nur intravesikuläre Marker zum Signal beitragen. Vom maximalen Signal wurde deshalb der Anteil abgezogen, der durch extravesikulären Marker entsteht und das Fusionsignal auf diesen Wert bezogen.

Bei einer Cytosol-Konzentration von 25 mg/ml lag das Signal der Fusion zwischen frühen Endosomen bei 47,9% des maximalen Signales. Aufgrund der Latenz der BASOR-Präparation von ca. 76% ergab sich eine Fusions-effizienz von 63% (+/- 2%). Für die Fusion zwischen frühen und späten Endosomen wurde ein Fusionsignal von 48,3% des Maximums gemessen; unter Berücksichtigung der Latenz der BASOR-markierten Endosomen von etwa 69% wurde somit eine Fusionseffizienz von 70% (+/- 4,5%) ermittelt (siehe Abb. 4.39.).

Es war folglich kein signifikanter Unterschied in der Fusionseffizienz dieser beiden Versuchsansätze detektierbar.

### Fusionseffizienz bezogen auf latenten Marker

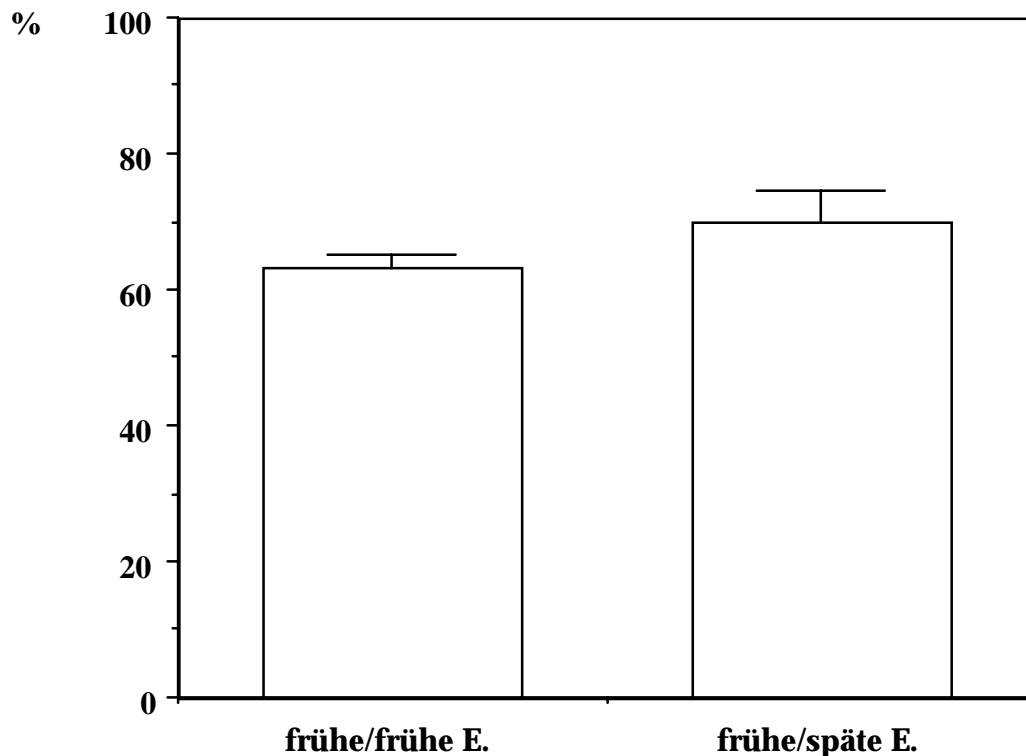


Abb. 4. 39.

Fusionseffizienz zwischen frühen Endosomen, bzw. zwischen frühen und späten Endosomen bei einer Cytosol-Konzentration von 25 mg/ml: Fusionsignal in % des maximalen durch intravesikulären Marker erreichbaren Signales.

#### **4. 4. 2. 3. *In vitro* Fusion von PNS, Mikrosomen und angereicherten Endosomen**

Fusionstests wurden sowohl mit PNS, als auch mit Mikrosomen oder gereinigten Endosomen als Ausgangsmaterial durchgeführt. Aufgrund der spezifischen Beladung bestimmter Endosomen-Populationen war es für den Fusionstest im Prinzip nicht nötig aufwendige Reinigungsverfahren einzusetzen, um die Spezifität der Reaktion garantieren zu können. Es wurde jedoch ein Vergleich zwischen den verschiedenen Membran-präparationen angestellt, um zu überprüfen, ob das Fusionsignal pro eingesetzter Proteinmenge mit höherer Reinheit der Endosomen-Präparation ansteigt. Dazu wurde eine konstante Menge an Avidin-beladenen Mikrosomen mit BASOR-

markiertem postnukleären Überstand oder gereinigten Endosomen zur Fusion gebracht (frühe Endosomen markiert).

Das Fusionssignal pro  $\mu\text{g}$  eingesetztes Protein war bei gereinigten Endosomen in etwa 330 mal so hoch wie das von PNS. Bezogen auf das vesikuläre (pelletierbare) Protein, also unter Abzug des cytosolischen Proteins der PNS-Präparation erhielt man für Endosomen ein ca. 45 mal höheres Signal (siehe Tab. 4. 2.). Das spezifische Fusionssignal pro  $\mu\text{g}$  Protein stieg also mit dem Reinheitsgrad der Präparation an, was auch als indirekter Nachweis dafür angesehen werden kann, daß es sich bei dem Prozeß um einen Endosomen-spezifischen Vorgang handelte. Es wurde jedoch auch festgestellt, daß das Signal pro ng des Markers bei Endosomen als Ausgangsmaterial ein wenig niedriger war als bei postnukleärem Überstand. Dieser Befund deutet darauf hin, daß bei der Endosomen-Reinigung einige der Fusionsfaktoren reduziert oder geschädigt werden könnten, oder daß möglicherweise die Endosomen selbst in ihrer Integrität beeinträchtigt werden. Um die Versuchsbedingungen möglichst nahe an den *in vivo* Verhältnissen zu halten, wurden die meisten Fusionstests deshalb mit postnukleärem Überstand oder Mikrosomen-Präparationen durchgeführt.

	PNS	Endosomen
Volumen/Ansatz	10 $\mu\text{l}$	1,6 $\mu\text{l}$
Fusionssignal	0,141	0,107
BASOR-Gehalt	0,6 ng/ $\mu\text{l}$	3,6 ng/ $\mu\text{l}$
Latenz	69 %	81 %
intraves. BASOR	0,414 ng/ $\mu\text{l}$	2,916 ng/ $\mu\text{l}$
Fusionssignal/ $\mu\text{l}$	0,0141	0,0669
Signal/ $\mu\text{g}$ Protein	0,000461	0,152
Signal/ $\mu\text{g}$ vesik. Protein	0,00336	0,152
Signal/ng BASOR	0,0235	0,0186
Signal/ngBASOR intravesikulär	0,0162	0,0151
rel. Signal/ $\mu\text{g}$ Protein	1.0 (definiert)	330
rel.Signal/ $\mu\text{g}$ vesikuläres Prot.	1.0 (definiert)	45,3

Tab. 4. 2.: Vergleich zwischen BASOR-PNS und angereicherten Endosomen beim *in vitro*-Fusionstest mit Avidin-Mikrosomen

#### 4. 4. 2. 4. Cytosol-Abhängigkeit der Fusion

Aufgrund der Daten anderer Forschungsgruppen war zu erwarten, daß die *in vitro* Fusion von cytosolischen Faktoren abhängig ist. Es wurden dem-zufolge konstante Mengen an BASOR- und Avidin-beladenen Endosomen in Gegenwart unterschiedlicher Cytosol-Konzentrationen (0 - 25 mg/ml Protein) zur Fusion gebracht (in Gegenwart von 2,5 mmol/l ATP, 8 mmol/l Phosphokreatin und 11 units/ml Phosphokreatin-Kinase - siehe Abb. 4. 40.). Für die Fusion früher Endosomen war ein Anstieg des Fusionssignals bis zur höchsten eingesetzten Cytosol-Konzentration zu bemerken. Der Cytosol-Gehalt war somit ein limitierender Faktor der *in vitro* Fusion. Eine leichte Abflachung der Cytosol-Abhängigkeit war erst im obersten Bereich (ab etwa 20 mg/ml Protein) detektierbar.

Die Fusion zwischen frühen und späten Endosomen schien bereits etwas früher (bei 20 mg/ml Protein) ihr Maximum erreicht zu haben. Dieser Unterschied war jedoch nicht sehr ausgeprägt; die Abweichung könnte im Bereich des Meßfehlers liegen.

Die gemessene Cytosol-Abhängigkeit der Hepatocyten-Endosomenfusion ist jedenfalls deutlich höher als bei den meisten anderen untersuchten Zelllinien.

## Cytosol-Abhängigkeit der Endosomen-Fusion

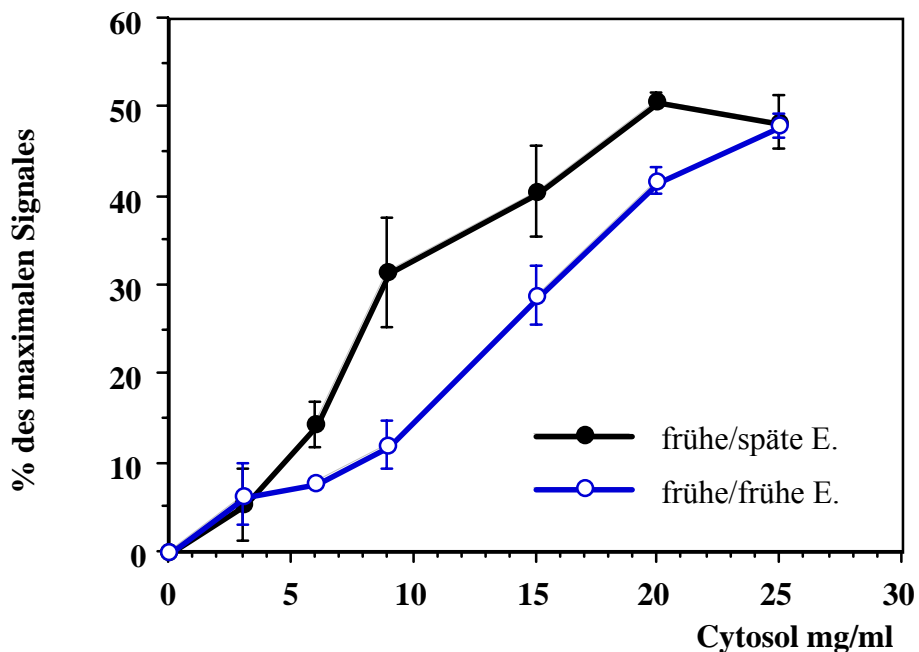


Abb. 4. 40.

Cytosol-Abhängigkeit der Fusion zwischen frühen Endosomen, bzw. zwischen frühen und späten Endosomen.

### 4. 4. 2. 5. Die *in vitro* Fusion früher Endosomen ist unabhängig von KCl

Bei den meisten anderen im Hinblick auf Endosomen-Fusion untersuchten Zelllinien wurde die Anwesenheit von KCl-Ionen (im Bereich von ca. 50 mmol/l) als Voraussetzung für die *in vitro* Fusion beschrieben (Gruenberg & Howell, 1989).

In unserem Versuchssystem mit Hepatocyten-Endosomen fand die Fusion jedoch nicht nur in KCl-hältigen Puffern, sondern auch in Kalium-Acetat/Saccharose/Hepes/Magnesium-Puffer (KAcSHM), sowie in 0,25 mol/l Saccharose/Hepes-Puffer statt. Es war kein signifikanter Unterschied in der Fusionseffizienz bei vier verschiedenen Puffer-Systemen (KAcSHM, KClSHM, KClHM, SHM) detektierbar (siehe Abb. 4. 41.).

Die Tatsache, daß Hepatocyten-Endosomen auch in 0,25 mol/l Saccharose-Hepes-Puffer miteinander fusionieren können, ist jedoch in Einklang mit den Ergebnissen von Mullock et al. (1989) und Kuwana et al. (1992), deren Befunde

für eine *in vitro* Fusion von Hepatocysten-Endosomen mit Lysosomen sprechen, die ebenfalls in salzfreiem Saccharose-Puffer abläuft.

### Endosomen-Fusion in 4 verschiedenen Puffern

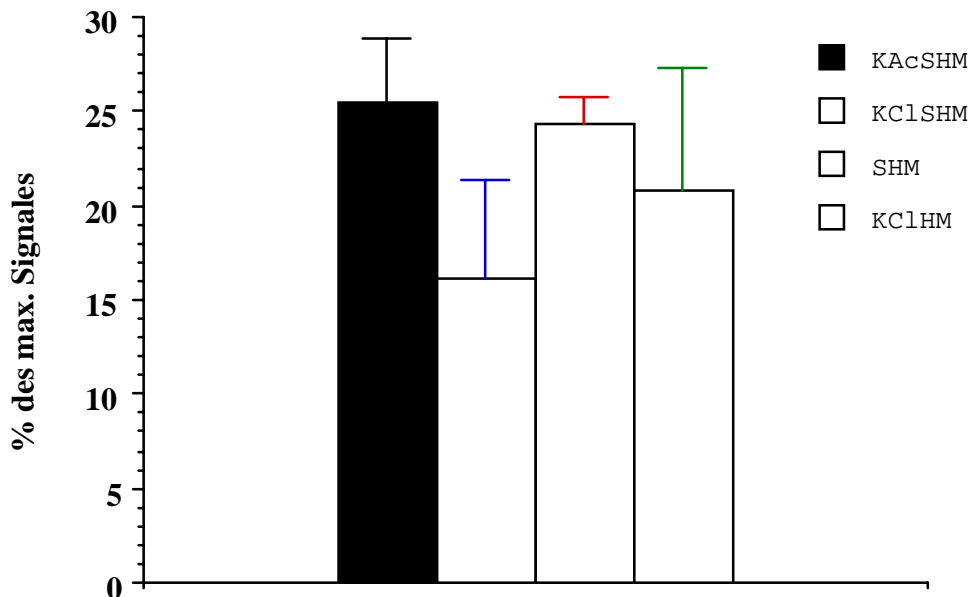


Abb. 4. 41.

*In vitro* Fusion früher Endosomen in vier verschiedenen Puffern:

KAcSHM: 100 mmol/l K-Acetat, 85 mmol/l Saccharose,  
10 mmol/l Hepes, 1 mmol/l Mg-Acetat, pH 7,4

KClSHM: 100 mmol/l KCl, 85 mmol/l Saccharose, 10 mmol/l  
Hepes, 1 mmol/l Mg-Chlorid, pH 7,4

SHM: 250 mmol/l Saccharose, 10 mmol/l Hepes,  
1 mmol/l Mg<sup>2+</sup>, pH 7,4

KClHM: 150 mmol/l KCl, 10 mmol/l Hepes, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>

Die Membran-Suspensionen der markierten Endosomen wurden ebenso wie das für die Fusion notwendige Cytosol in den entsprechenden Puffern präpariert.

Es wurden Dreifachbestimmungen des Nullwerts, der Fusionsprobe nach 15 min Inkubation bei 37°C, und des maximalen Signals durchgeführt.

#### 4. 4. 2. 6. Einfluß von N-Ethylmaleinimid (NEM) auf die Fusion

Alle Fusionsprozesse, die bis jetzt *in vitro* rekonstituiert werden konnten, waren durch das SH-alkylierende Reagens NEM inhibierbar (für Endo-somen: siehe Review von Gruenberg & Howell, 1989; für inter-Golgi Transport: Malhotra et al., 1988; für ER-Golgi-Transport: Beckers et al., 1989).

Es hat sich gezeigt, daß die Fusion von Hepatocyten-Endosomen ebenfalls durch NEM gehemmt werden konnte. Für eine praktisch vollständige Hemmung der Endosomen-Fusion mußten jedoch beide Endosomen-Populationen mit NEM (bei 0°C) vorinkubiert werden.

Wenn Avidin-markierte und BASOR-markierte Membransuspensionen bei 0°C zusammengemischt und gemeinsam mit NEM 20 - 30 min bei 0°C inkubiert wurden, konnte eine darauffolgende Fusion nicht völlig blockiert werden. Das Fusionsignal lag unter diesen Bedingungen bei 70% (+/- 7%). Es war dabei auch kein Unterschied zwischen 1,5 und 3 mmol/l NEM feststellbar. Wenn BASOR-PNS und Avidin-Mikrosomen voneinander getrennt mit NEM (2 mmol/l) behandelt wurden konnte in einem folgenden Fusionskinetik-Test (siehe Abb.4. 42.) kein Fusionsignal mehr detektiert werden. Der NEM-sensitive Reaktionsschritt dürfte somit die bereits bei 0°C auftretende Bildung eines Fusionskomplexes der beiden beteiligten Membranen noch vor der eigentlichen Fusion sein. Um den NEM-Effekt genauer lokalisieren zu können, wurden Fusionsproben gemessen, bei denen beide Membransuspensionen mit NEM vorinkubiert wurden (ohne NEM-Behandlung des Cytosols), und mit Proben verglichen, bei denen nur das Cytosol mit NEM behandelt wurde, sowie mit Proben, bei denen das Cytosol und nur eine der beiden Membransuspensionen mit NEM inkubiert wurden. Dieser Versuch wurde sowohl für die Fusion zwischen frühen, als auch für die Fusion zwischen frühen und späten Endosomen durchgeführt, und brachte für beide Systeme ein vergleichbares Ergebnis (Abb. 4. 43.). In beiden Fällen führte eine getrennte Inkubation beider komplementärer Membransuspensionen mit NEM zu einer fast völligen Inhibierung der Fusion, während eine NEM-Behandlung des Cytosols ohne NEM-Inkubation der Membranen nur wenig Effekt zeigte. Die NEM-Behandlung des Cytosols und einem der beiden Fusionspartner verursachte eine geringe bis intermediäre Fusionshemmung, was darauf hindeutet, daß der Fusionspartner scheinbar zumindest einen Teil der für die Fusion notwendigen, Membran-assoziierten und NEM-sensitiven Faktoren liefern kann. Dieses Resultat weist darauf hin, daß die NEM-sensitiven



Fusionsfaktoren bei Hepatocysten-Endosomen zum Großteil an die Membran assoziiert sind und nicht als lösliche Komponenten im Cytosol, wie bei anderen Zelllinien beschrieben wurde (Gruenberg & Howell, 1989; Colombo et al., 1992 a - siehe Tab. 4. 4.; Pitt & Schwartz, 1991; für Endosom-TGN Transport: Goda & Pfeffer, 1991).

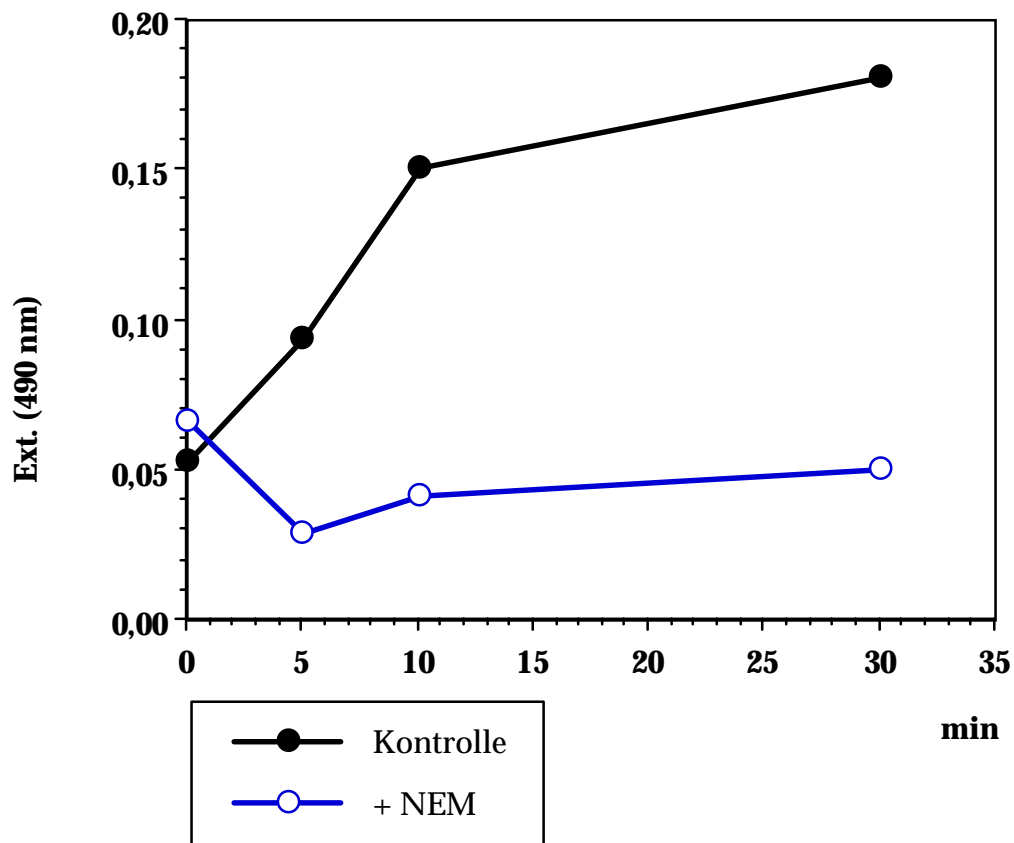


Abb.4. 42.

Fusionstest von frühen Endosomen in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems nach Vorinkubation mit 2 mmol/l NEM bei 0°C für 20 min und Inaktivierung des NEM-Überschusses durch 3 mmol/l DTT.

## Effekt von NEM auf die Endosomen-Fusion

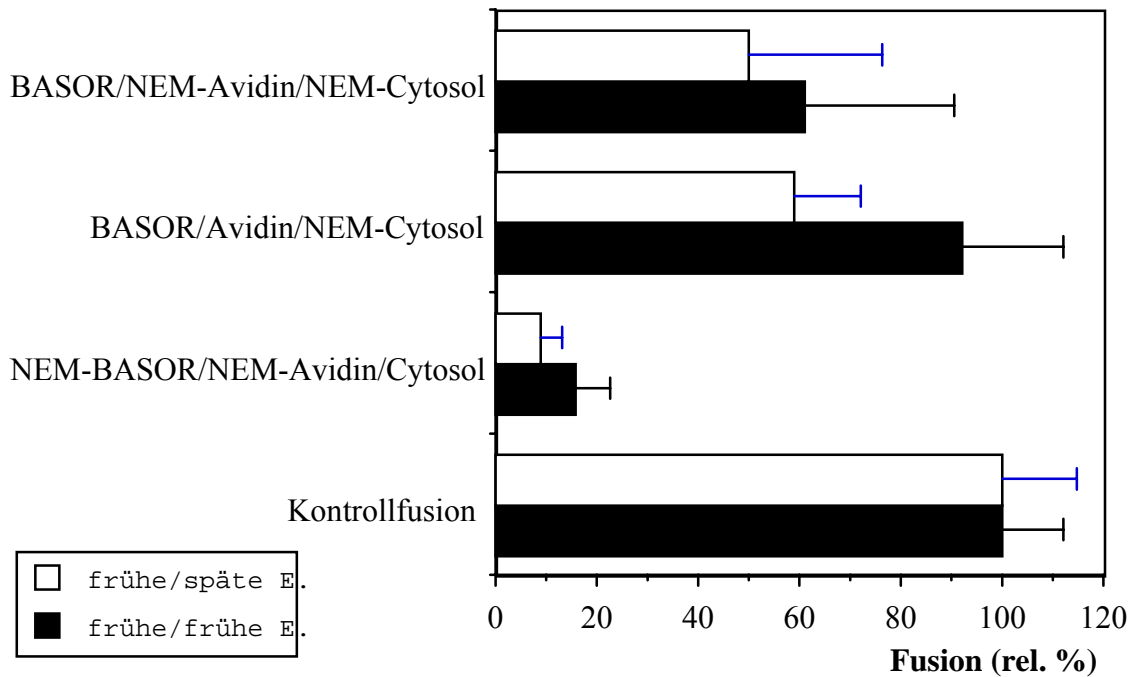


Abb. 4. 43.

NEM-Effekt auf die *in vitro* Endosomen-Fusion:

Mikrosomen-Präparationen von frühen oder späten BASOR-markierten Endosomen wurden mit Avidin-markierten frühen Endosomen (Mikrosomen) zur Fusion gebracht. Alle NEM-Inkubationen (2 mmol/l NEM, 20 min bei 0°C) wurden jeweils getrennt voneinander durchgeführt (sowohl für die unterschiedlichen Membransuspensionen, als auch für Cytosol). Überschüssiges NEM wurde durch DTT (3 mmol/l) inaktiviert.

Tab. 4. 3.

NEM-Effekt auf die *in vitro* Fusion von Hepatocyten-Endosomen:

Cytosol	BASOR-Membranen	Avidin-Membranen	Fusion(%) frühe/frühe	Fusion(%) frühe/späte
-	-	-	100	100
-	NEM	NEM	16	8,8
NEM	-	-	92	59
NEM	-	NEM	61	50

Tab. 4. 4.

(nach Colombo et al., 1992 a)

NEM-Effekt auf die *in vitro* Fusion von Endosomen aus J774 Makrophagen:

Cytosol-Behandlung	Vesikel-Behandlung	Fusion (%)
-	-	100
NEM	NEM	8
NEM	-	23
-	NEM	84

#### **4. 4. 2. 7. Einfluß von Nigericin, NH<sub>4</sub>Cl, Brefeldin A und Benzylamin auf die Endosomen-Fusion**

Um einen potentiellen Einfluß von Ionen-Gradienten auf die Endosomen-Fusion zu untersuchen, wurde Nigericin, eine Verbindung, die als Ionophor für H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>-Ionen wirkt, eingesetzt, sowie Ammoniumchlorid, das intravesikulär saure pH-Werte abpuffert, indem seine korrespondierende Base NH<sub>3</sub> als neutrale Verbindung durch die Membran diffundiert, wo sie im Fall eines sauren Milieus zum Membran-impermeablen NH<sub>4</sub><sup>+</sup> umgewandelt wird.

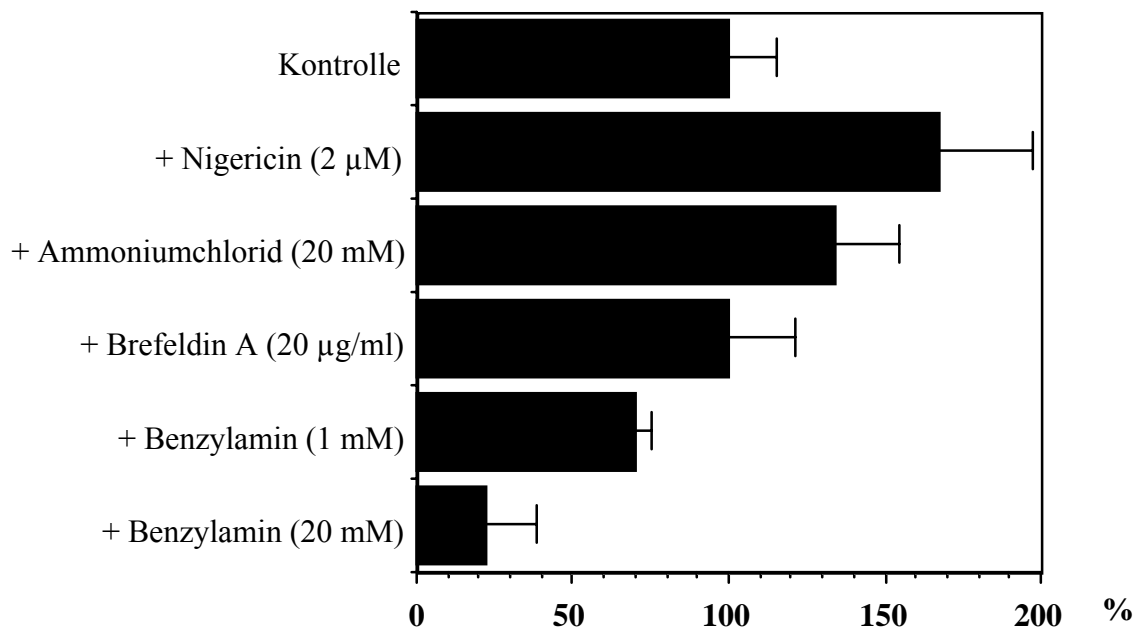
Die hydrophobe schwache Base Benzylamin, die in Membranen interkaliert, wurde ebenso im Endosomen-Fusionstest untersucht, wie die in Pilzen vorkommende Verbindung Brefeldin A, die *in vivo* häufig zu einer unkontrollierten Fusion endozytischer Kompartimente unter Bildung eines tubulären Retikulums führt (Pelham, 1991).

Die Fusionsversuche ergaben eine deutliche Erhöhung des Fusionssignales nach Zugabe von Nigericin (2 µmol/l), während die Zugabe von NH<sub>4</sub>Cl (20 mmol/l) das Signal in geringerem Ausmaß erhöhte (siehe Abb. 4. 44. und Tab. 4. 5.). Der Unterschied zwischen Kontrollfusion und den Ammonium-chlorid-Proben war statistisch nicht eindeutig feststellbar. Das Auftreten von pH-Gradienten könnte jedoch aufgrund der beobachteten Erhöhung des Fusionssignales in Gegenwart von Nigericin eine Rolle spielen.

Die hydrophobe Base Benzylamin zeigte hingegen eine Inhibierung der Fusion. Nachdem aufgrund der Ergebnisse mit der pH-pufferenden Substanz Ammoniumchlorid eher eine Zunahme der Fusion durch schwache Basen zu erwarten wäre, scheint viel mehr die Membran-interkalierende Eigenschaft von Benzylamin für die Hemmung der Fusion verantwortlich zu sein. Durch den

Einbau von Benzylamin in die Membran könnte es zu einer Veränderung der Membraneigenschaften kommen, die die Fusion inhibieren.

Für den Pilzmetaboliten Brefeldin A war kein Einfluß auf die *in vitro* Fusion detektierbar.



	Nigericin	NH <sub>4</sub> Cl	Brefeldin A	1 mM Benz.	20 mM Benz.
Mittelwert	167,9 %	133,9%	100,2%	70,5%	21,9%
s	29,6%	20,5%	20,9%	5,0%	16,9%
n	11	6	3	2	5

Abb. 4. 44. und Tab. 4. 5.

Einfluß von Nigericin, Ammoniumchlorid, Brefeldin A und Benzylamin auf die *in vitro* Fusion früher Endosomen.

#### **4. 4. 2. 8. Fusion von frühen und späten Endosomen in Gegenwart polymerisierter Mikrotubuli**

Es sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit intakter Mikrotubuli die Fusion früher Endosomen untereinander, bzw. die Fusion von frühen mit späten Endosomen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde der Membransuspension vor der Fusionsinkubation Taxol in einer Konzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  zugesetzt (Stammlösung 2  $\text{mmol/l}$  in DMSO) um endogenes Tubulin zu polymerisieren (Bomsel et al., 1990) und damit der Fusionstest durchgeführt. Das Ergebnis war abweichend von den Resultaten anderer Arbeitsgruppen (Gruenberg & Howell, 1989), die eine effiziente Fusion zwischen kinetisch frühen und späten endozytischen Kompartimenten nur in Anwesenheit polymerisierter Mikrotubuli beobachteten. In unserem Modellsystem konnten nicht nur frühe Endosomen untereinander, sondern auch frühe Endosomen mit späten Endosomen im gleichen Ausmaß ohne intakte Mikrotubuli fusionieren und es konnte kein deutlicher Unterschied zur Fusion in Gegenwart polymerisierter Mikrotubuli festgestellt werden (Abb. 4. 45.).

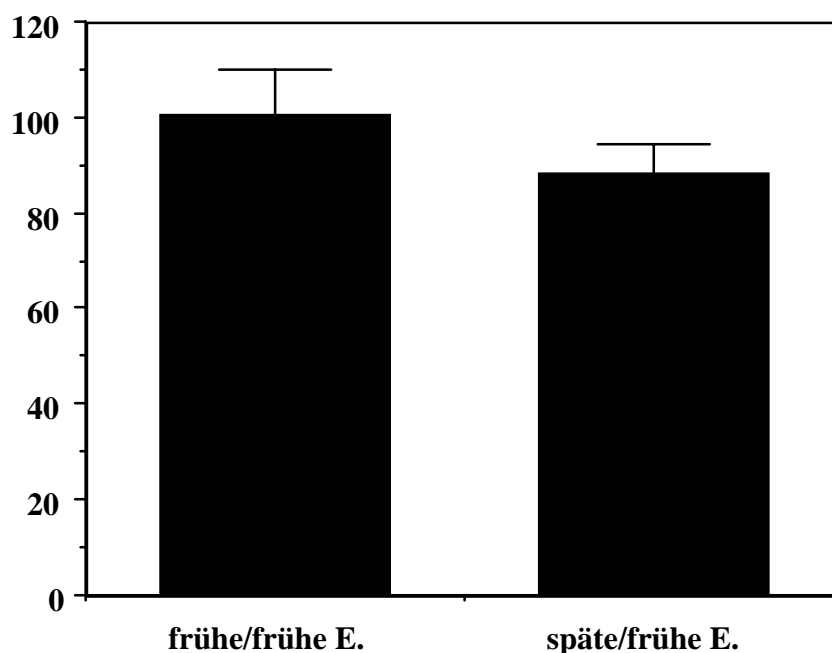


Abb. 4. 45.

Fusion früher Endosomen, sowie Fusion zwischen frühen und späten Endosomen in Gegenwart polymerisierter Mikrotubuli (nach Zugabe von 20  $\mu\text{mol/l}$  Taxol) - in % der entsprechenden Fusion ohne intakte Mikrotubuli.

#### **4. 4. 2. 9. Erhöhung der Dichte während der *in vitro* Fusion**

Zur Untersuchung auf potentielle Änderungen der Dichte von Endosomen während der *in vitro* Inkubation wurden Proben nach der Fusion einer Dichtegradienten-Zentrifugation in Percoll unterworfen.

Frühe BASOR-markierte Endosomen wurden mit frühen Avidin-markierten Endosomen 90 min unter Fusionsbedingungen (Cytosol: ca. 12 mg/ml) in KCISHM-Puffer inkubiert, nach der Fusion mit kaltem Puffer verdünnt und auf 33% Percoll (isoton) eingestellt. Nach Zentrifugation im Vertikalrotor und Fraktionierung (vom Boden aus, also mit den dichten Fraktionen beginnend), wurde das Avidin/BASOR-Fusionsprodukt jeder Fraktion mittels ELISA gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, daß nach einer längeren Inkubation ein Großteil des Fusionsproduktes bereits auf einer dichten Position des Percoll-Gradienten zu finden ist, die mit der Aktivität des lysosomalen Enzyms  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase zusammen-fällt (Abb. 4. 46.).

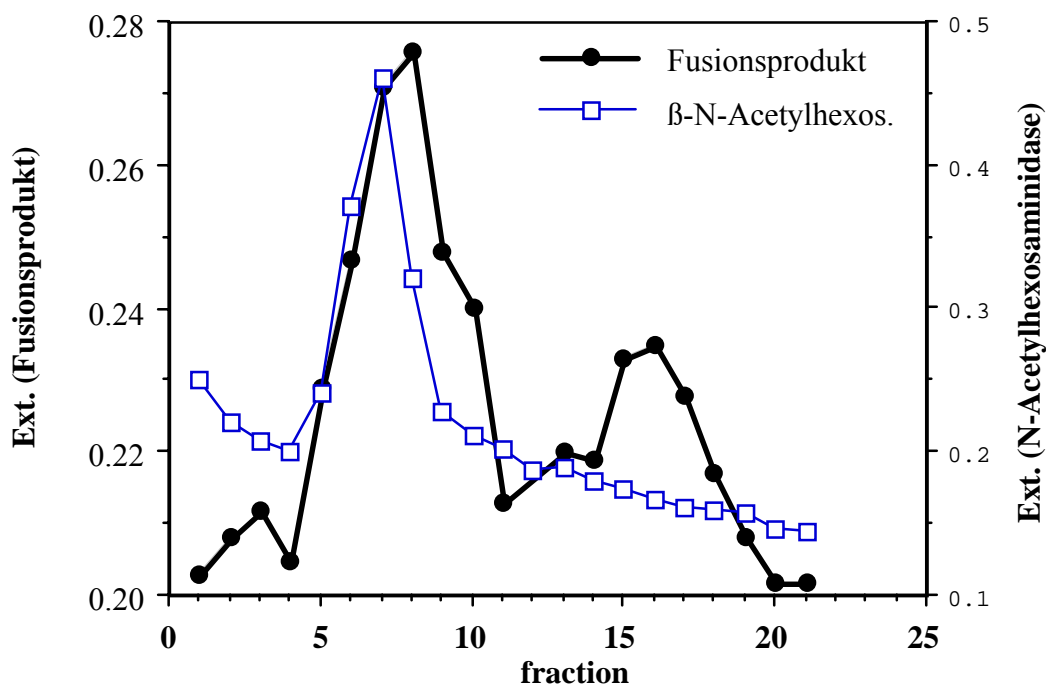


Abb. 4. 46.

Dichtegradienten-Zentrifugation nach der *in vitro* Fusion früher Endosomen.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde untersucht, ob die Dichteverschiebung der endosomalen Marker auch eine Zeitabhängigkeit aufweist, und es konnte festgestellt werden, daß der Anteil der Marker im dichten Bereich des

Gradienten mit der Inkubationsdauer zunimmt (Abb. 4. 47. und Abb. 4. 48.). Die Zunahme der Dichte kann entweder durch eine Fusion mit dichteren Zellkompartimenten (wie z.B. späten Endosomen oder Lysosomen), oder durch eine Änderung der endosomalen Eigenschaften (durch einen Reifungsprozeß) verursacht werden.

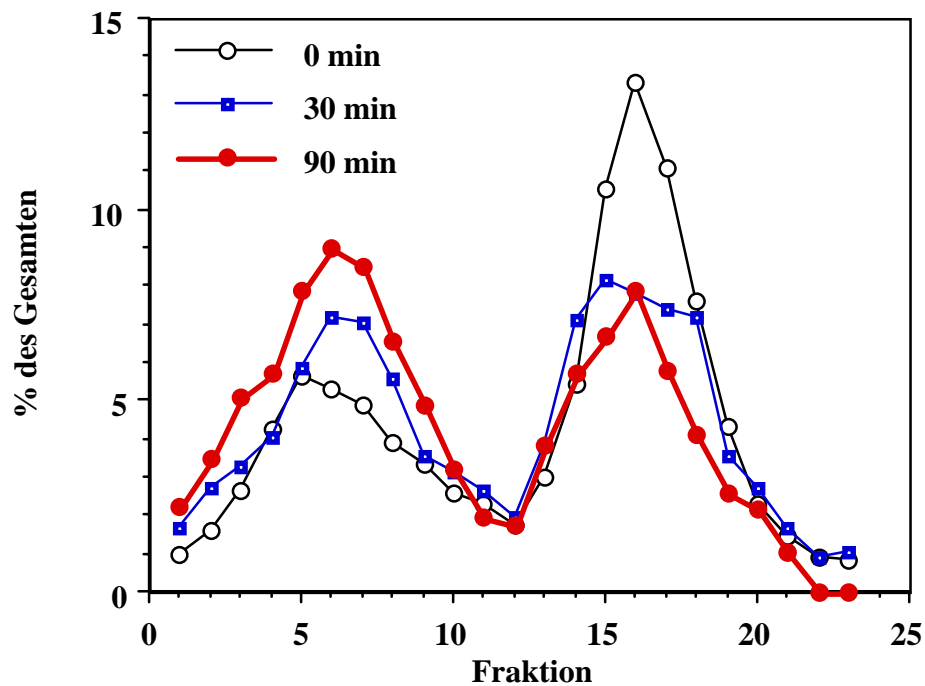


Abb. 4. 47.

Lokalisation des Fusionsproduktes auf Percoll-Gradienten: Zunahme des Anteils im dichten Bereich (Fraktionierung: vom dichten Bereich beginnend).

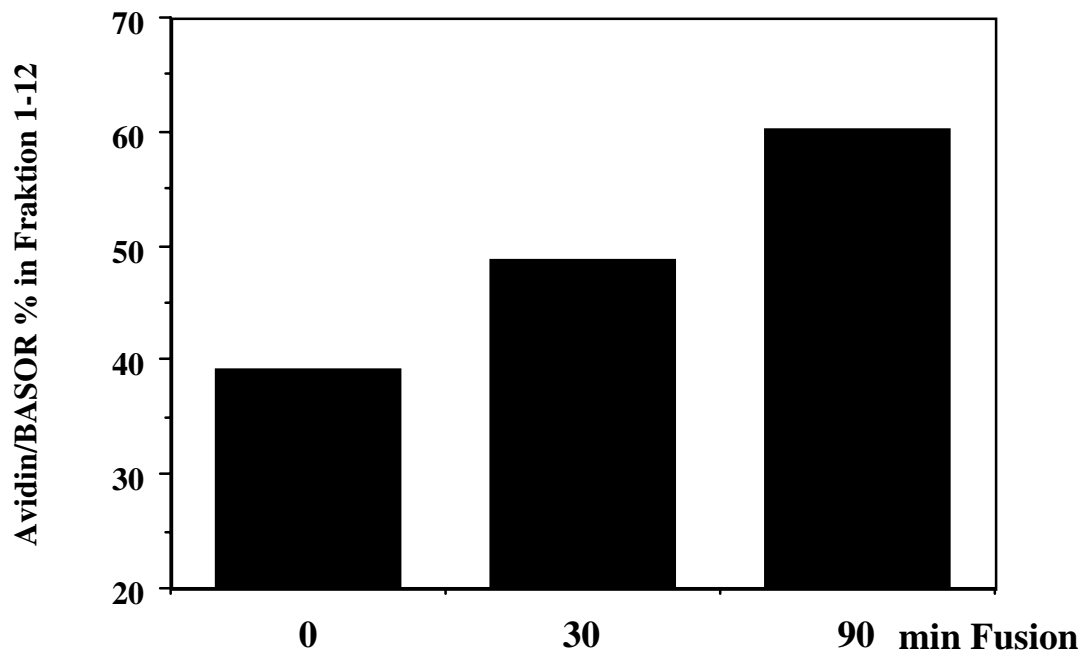


Abb. 4. 48.

Dichtegradienten-Zentrifugation: Erhöhung des Avidin/BASOR-Anteils, der sich im dichten Bereich des Gradienten befindet mit zunehmender Dauer des Fusionstests.

#### **4. 4. 3. VORINKUBATIONSTESTS**

Im Zuge der Fusionstests sollte ermittelt werden, wie sich die Endosomen verhalten, wenn eine der beiden komplementären Endosomen-Gruppen bei 37°C in Gegenwart von ATP vorinkubiert wird. Es sollte festgestellt werden, ob eine potentielle Reduktion der Fusionsfähigkeit von Hepatocyten-Endosomen auf eine Änderung ihrer Eigenschaften durch einen Reifungs-prozeß, oder auf eine Erschöpfung von Fusionsfaktoren zurückzuführen ist.



#### **4. 4. 3. 1. Vorinkubation bei 37°C in Gegenwart oder Abwesenheit von Fusionspuffer**

Eine der beiden Membransuspensionen, bei der frühe Endosomen markiert waren, wurde nach Zugabe eines ATP-regenerierenden Systems in Gegenwart von Cytosol 30 min bei 37°C mit oder ohne Fusionspuffer vorinkubiert, auf Eis abgekühlt und nach Zufügen des zweiten Markers einem Fusionstest unterzogen.

Es wurde festgestellt, daß nach einer Vorinkubation in Fusionspuffer (KAcSH + Additive) keine nachfolgende Fusion mehr gemessen werden konnte, während nach einer Vorinkubation in Gegenwart von ATP, aber ohne Fusionspuffer im Kinetiktest ein Restfusionssignal von etwa 60% der Kontrollfusion beobachtet wurde (Abb. 4. 49.).

Für das Ergebnis war es unerheblich, ob BASOR-beladene oder Avidin-beladene Membranpräparationen vorinkubiert wurden, und es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Vorinkubation von postnukleärem Überstand und der von gereinigten Endosomen detektiert werden. Bei einer Vorinkubation von Endosomen und Cytosol voneinander getrennt kam es jedoch nur zu einer geringen Reduktion des darauffolgenden Fusions-signales. Der Grund für die weit stärkere Abnahme der Fusionsfähigkeit bei Vorinkubation in Gegenwart von Fusionspuffer ist scheinbar auf die zusätzlich enthaltenen Verbindungen zurückzuführen. Der Fusionspuffer enthält 1 mmol/l DTT, 20 µmol/l EGTA, 0,2% BSA und mehr  $Mg^{2+}$  (2 mmol/l) als die Membranpräparationen. Ein Einfluß von EGTA ( $Ca^{2+}$ -Chelator) schien aufgrund eines weiteren Experiments unwahrscheinlich zu sein. Die Ursache für den beobachteten Unterschied könnte somit entweder in den als Schutzfaktoren zugesetzten Verbindungen DTT, das SH-Gruppen von Proteinen stabilisiert, oder BSA, das als unspezifischer Proteinzusatz eingesetzt wurde, liegen, oder in der höheren Konzentration an  $Mg^{2+}$ , das als Kofaktor für ATP-verbrauchende Reaktionen nötig ist. Das Ergebnis weist jedoch eindeutig darauf hin, daß der Prozeß, der während der Vorinkubation zu einer Abnahme des folgenden Fusionssignales führt, ein aktiver ist.

Dies konnte noch durch Vorinkubation in Fusionspuffer in Gegenwart eines ATP-verzehrenden Systems (0,5 units/ml Hexokinase, 1 mmol/l Deoxyglukose) und darauffolgender Fusion in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems bestätigt werden. Unter diesen Bedingungen kam es nur zu einer partiellen Abnahme der Fusionsfähigkeit.

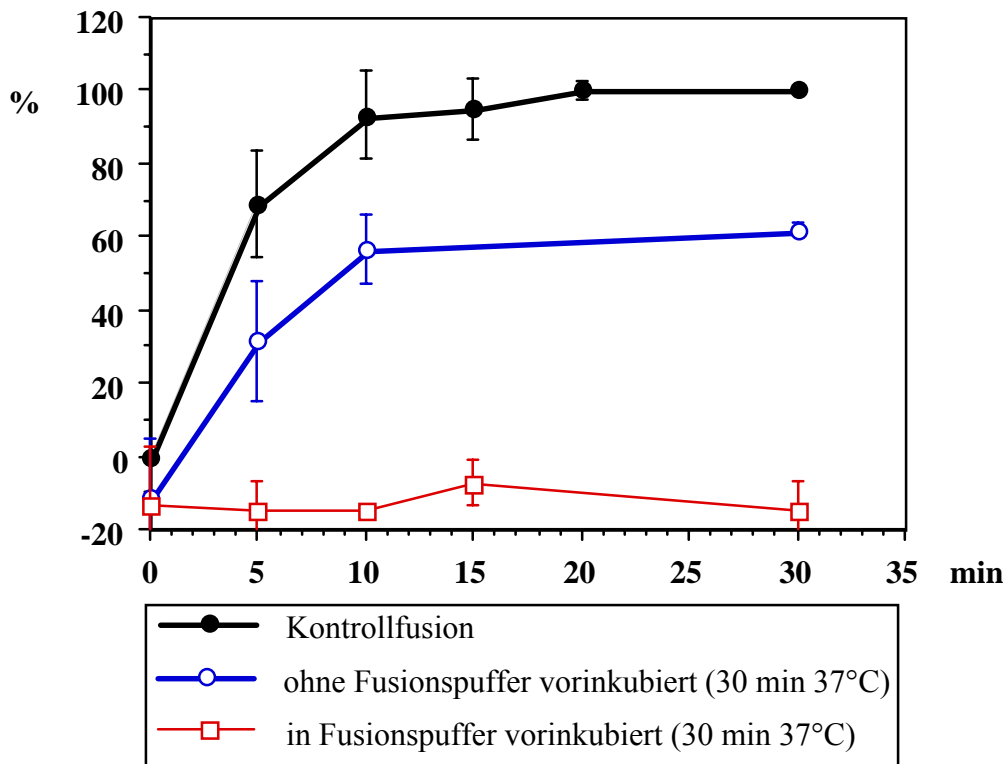


Abb. 4. 49.

Vorinkubation (30 min bei 37°C) von frühen Endosomen in Gegenwart oder Abwesenheit von Fusionspuffer und Reduktion des nachfolgenden Fusionsignales (Fusion: 0 - 30 min bei 37°C).

Eine Vorinkubation später Endosomen bei 37°C in Gegenwart von ATP führte ebenso wie bei frühen Endosomen zu einer Reduktion der Fusionsfähigkeit bei einem nachfolgenden Fusionstest mit frühen Endosomen. Die Prozesse, die während der Vorinkubation ablaufen, treten also bei später Endosomen ebenso in Erscheinung.

#### **4. 4. 3. 2. Kinetik des Fusionsignalverlustes durch Vorinkubation**

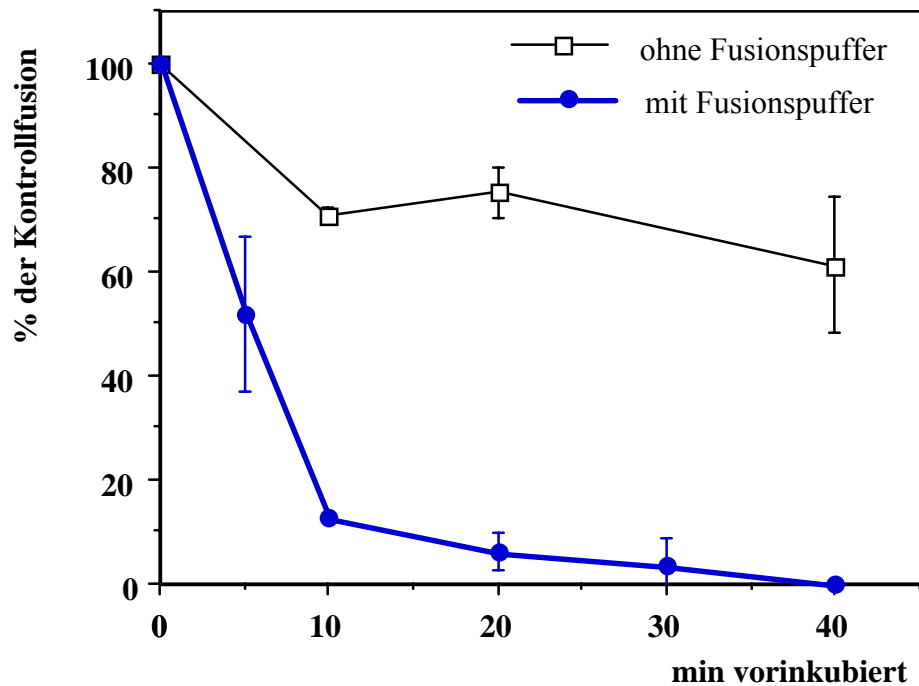
Zur weiteren Charakterisierung des Phänomens wurde die Kinetik der durch Vorinkubation einer der beiden komplementären Membranpräparationen hervorgerufenen Abnahme des Fusionsignales bestimmt (Abb. 4. 50.)

Eine Vorinkubation früher Endosomen in Abwesenheit von Fusionspuffer führte so wie aufgrund der vorher beschriebenen Ergebnisse zu erwarten war nur zu einer Abnahme auf etwa 60% des ursprünglichen Fusionsignales. Bei

Vorinkubation in Gegenwart von Fusionspuffer war die Fusionsfähigkeit nach 10 min beinahe vollständig verloren. Der Vorinkubationseffekt zeigte also die gleiche Kinetik wie die Fusion selbst. Dies deutete darauf hin, daß möglicherweise während der Vorinkubation Fusionen zwischen den Endosomen, die mit dem gleichen Marker beladen sind, erfolgen, wodurch Fusionsfaktoren verbraucht werden, die dann für die nachfolgende meßbare Fusion mit dem komplementären Reaktionspartner fehlen. Eine alternative Möglichkeit wäre eine Veränderung der Endosomen-Eigenschaften während der Vorinkubation (z.B. eine Maturation), die mit der gleichen Kinetik wie die Fusion abläuft. Die Tatsache, daß in unserem System auch späte endozytische Kompartimente mit frühen Endosomen fusionieren konnten, sprach jedoch gegen die Hypothese, daß eine Maturation während der Vorinkubation zu einer Abnahme des Fusionssignals führt.

Die These, daß es während der Vorinkubation zu Fusionen gleichartig beladener Endosomen und daraus resultierender Verzehrung von Fusionsfaktoren kommt, war somit als wahrscheinlicher anzusehen; sie konnte noch durch weiterführende Experimente unterstützt werden (siehe 4. 4. 3. 7.).

Der Befund, daß es auch bei einer Vorinkubation von späten Endosomen zu einer Verringerung der darauffolgenden Fusion kommt, war ein Hinweis dafür, daß späte Endosomen ebenfalls untereinander fusionieren können.



-  
Abb. 4. 50.

Kinetik der Abnahme des Fusions-signal-es nach Vorinkubation von frühen Endosomen bei 37°C (0 - 40 min) in Gegenwart oder Abwesenheit von Fusionspuffer; Fusion: 30 min bei 37°C.

#### 4. 4. 3. 3. Latenz von Avidin-PNS vor und nach der Vorinkubation

Um ausschließen zu können, daß die Abnahme der Fusionsfähigkeit während der Vorinkubation auf eine Beschädigung oder Zerstörung der Endosomen zurückzuführen ist, wurde die Latenz des Markers vor und nach der Vorinkubation bestimmt, also der Anteil des Markers der intravesikulär lokalisiert ist. Es wurde Avidin-markierter postnukleärer Überstand verwendet, da Avidin als Fluid-Phase Marker noch leichter aus Endosomen austreten kann als Rezeptor-gebundenes BASOR. Es konnte gezeigt werden, daß der Anteil an intravesikulärem Avidin während einer Vorinkubation bei 37°C für 30 min nicht signifikant abnimmt (Abb. 4. 51.).

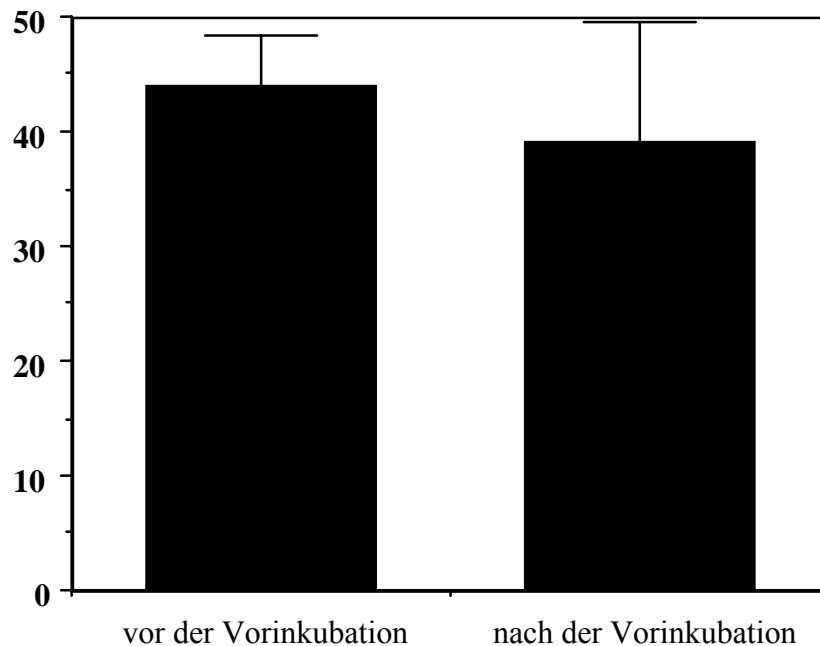


Abb. 4. 51.

Latenz von Avidin-PNS (Prozentsatz von intravesikulärem Avidin am Gesamt-Avidin) vor und nach der Vorinkubation (30 min bei 37°C).

#### **4. 4. 3. 4. Einfluß von Nigericin, Ammoniumchlorid und Benzylamin auf den Vorinkubationseffekt**

Da von Arbeitsgruppen, die das Maturationsmodell der Endozytose bevorzugen, postuliert wurde, daß das saure Milieu innerhalb der Endosomen an der Dichte-Erhöhung und somit an der Reifung der Endosomen beteiligt ist (Roederer et al., 1990), wurde der Einfluß schwacher Basen, sowie des Ionophors Nigericin auf die Abnahme der Fusionsfähigkeit durch die Vorinkubation untersucht. Eine Abpufferung des endosomal sauren pH-Wertes könnte theoretisch eine Maturation der Endosomen verhindern. Für den Fall, daß eine derartige Maturation (z.B. Dichte-Erhöhung) bzw. die progressive Azidifizierung des endosomalen Lumens selbst die Ursache für die Abnahme der Fusionsfähigkeit darstellen, würde es bei einer Vorinkubation in Gegenwart

von Ionophoren oder schwachen Basen zu keinem oder nur zu einem geringen Verlust des Fusionssignals kommen.

Ein Einsatz der schwachen Base  $\text{NH}_4\text{Cl}$  rief jedoch keine Verminderung des Vorinkubationseffektes hervor; die Fusionsfähigkeit nahm in Gegenwart von 20 mmol/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$  mit der gleichen Kinetik und im gleichen Ausmaß wie die der Kontrollprobe ab. Dieses Resultat deutet darauf hin, daß die Azidifizierung des endosomalen Milieus oder eine dadurch hervorgerufene Änderung der Endosomen-Eigenschaften (Maturation) nicht die Ursache für die Abnahme der Fusionsfähigkeit durch die Vorinkubation darstellt.

Ein davon abweichendes Ergebnis wurde mit der Membran-interkalierenden schwachen Base Benzylamin erzielt, die wie bereits vorher beschrieben wurde, die Fusion hemmt. Eine Vorinkubation in Gegenwart von 20 mmol/l Benzylamin (Fusionssignal nur ca. 22% der Kontrolle) führte zu einer weiteren Abnahme des bereits reduzierten Fusionssignals (Abb. 4. 52.). Bei Vorinkubation in Gegenwart von 1 mmol/l Benzylamin, einer Konzentration bei der die Fusion weniger inhibiert wird (auf ca. 70% der Kontrollfusion) wurde jedoch ein Restfusionssignal nach einer Vorinkubationsdauer gemessen, bei der die Kontrollprobe keine Fusionsfähigkeit mehr vorwies. Die langsamere Abnahme des Fusionssignals in Gegenwart von 1 mmol/l Benzylamin könnte zwar theoretisch von der Eigenschaft als Base verursacht werden, andererseits aber auch durch die fusionshemmende Wirkung. Aufgrund der Ergebnisse mit Ammoniumchlorid ist die letztere Möglichkeit als die wahrscheinlichere anzusehen.

Die Vorinkubation in Gegenwart von 2  $\mu\text{mol/l}$  Nigericin zeigte eine völlig andere Charakteristik. Die gesamte Kurve lag deutlich über der der Kontrolle, d.h. das Anfangssignal (ohne Vorinkubation der Probe) war bereits deutlich höher, wie es auch aufgrund der bereits beschriebenen Ergebnisse zu erwarten war; im Verlauf der Vorinkubation kam es dann zu einer Abnahme des Fusionssignals mit etwa der gleichen Kinetik wie bei der Kontrolle, jedoch mit einem deutlichen Restfusionssignal. Dieses Verhalten in Gegenwart von Nigericin scheint nicht ohne weiteres erklärbar zu sein. Die Tatsache, daß die Nigericin- und die Kontrollkurve parallel sind, also die gleiche Kinetik aufweisen, spricht jedenfalls gegen einen Einfluß von Nigericin auf den Vorinkubationseffekt selbst. Nigericin scheint das Fusionssignal nach verschiedenen Vorinkubationszeiten im gleichen Ausmaß zu erhöhen, möglicherweise durch eine unspezifische Stimulierung der Fusion.

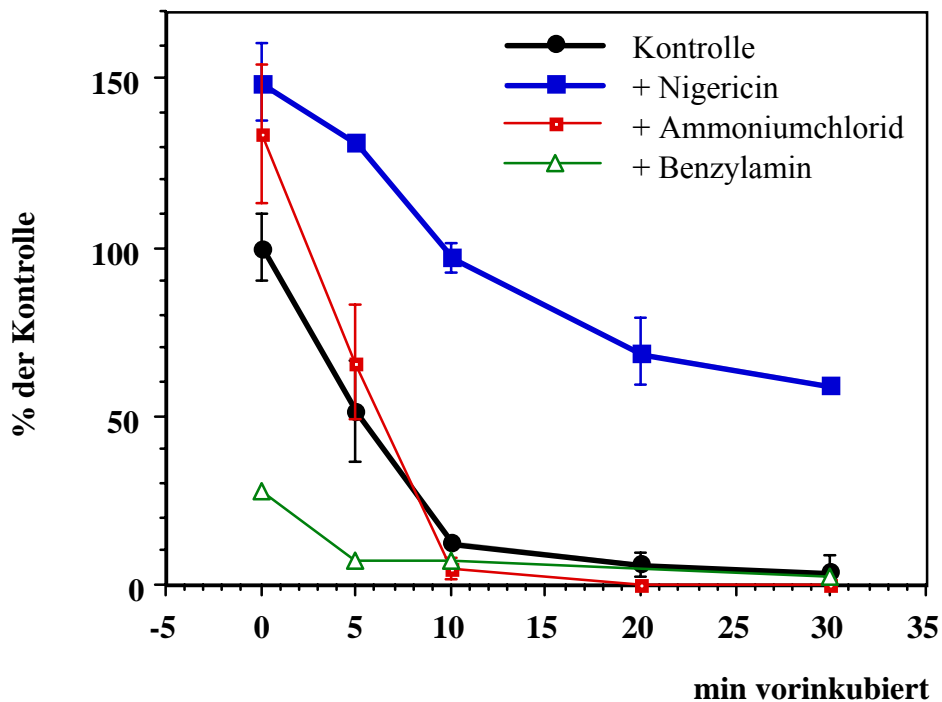


Abb. 4. 52.

Einfluß von Nigericin (2  $\mu\text{mol/l}$ ),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20  $\text{mmol/l}$ ) und Benzylamin (20  $\text{mmol/l}$ ) auf die Abnahme des Fusionssignals bei der Vorinkubation

#### **4. 4. 3. 5. Mikrotubuli haben keinen Einfluß auf den Vorinkubationseffekt**

Eine Vorinkubation früher oder später Endosomen in Gegenwart von 20  $\mu\text{mol/l}$  Taxol, also unter Mikrotubuli-polymerisierenden Bedingungen, zeigte keine Abweichung vom normalen Vorinkubationseffekt. Die Abnahme der Fusionsfähigkeit verlief in etwa mit der gleichen Kinetik und der gleichen Charakteristik wie der Fusionsignal-Verlust ohne Mikrotubuli.

Die bei der Vorinkubation auftretenden Reaktionen sind also Mikrotubuli-unabhängig; sie werden von intakten Mikrotubuli weder gehemmt noch stimuliert.

#### **4. 4. 3. 6. Zugabe von Cytosol nach der Vorinkubation**

Die Möglichkeit, daß während der Vorinkubation einer der beiden komplementär markierten Endosomenpopulationen Fusionen zwischen den gleichartig beladenen Endosomen auftreten, die aufgrund einer Erschöpfung von Fusionsfaktoren die nachfolgende Fusion mit der zweiten Endosomenpopulation verhindern, wurde näher untersucht. Da einige, der für die Fusion notwendigen Faktoren, cytosolische Proteine sind, wurde ein Versuchsansatz gewählt, bei dem nach der Vorinkubation, unmittelbar vor dem darauffolgenden Fusionstest nochmals Cytosol zugesetzt wurde. Diese Cytosol-Zugabe konnte jedoch den Verlust der Fusionsfähigkeit nicht verhindern (Abb. 4. 53.).

Der Vorinkubationseffekt ist also nicht auf eine Verzehung cytosolischer Proteine zurückzuführen.

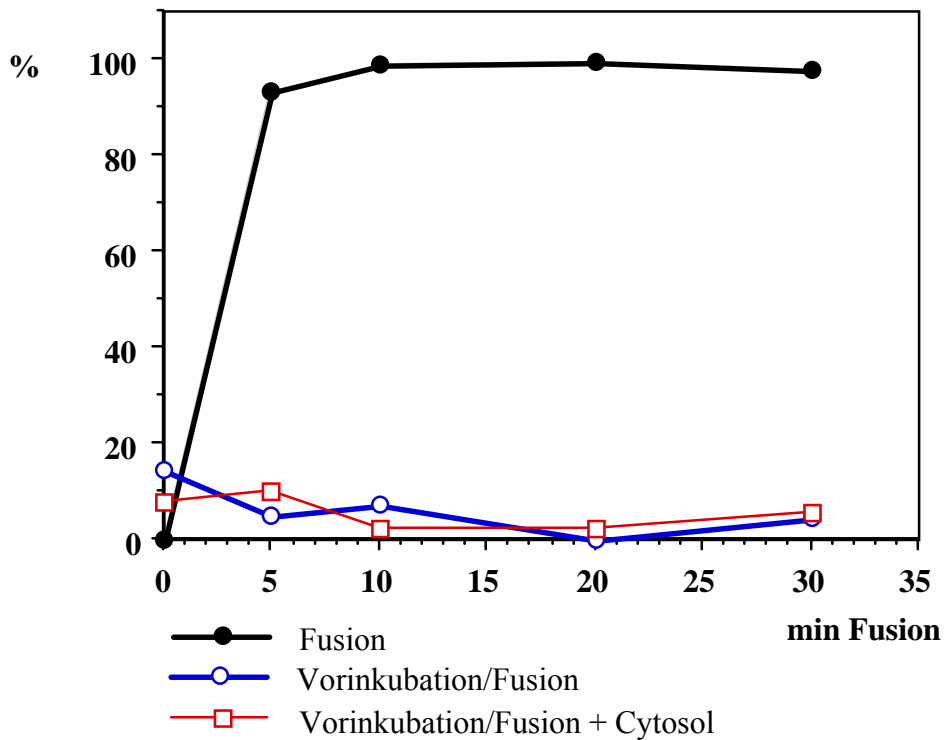


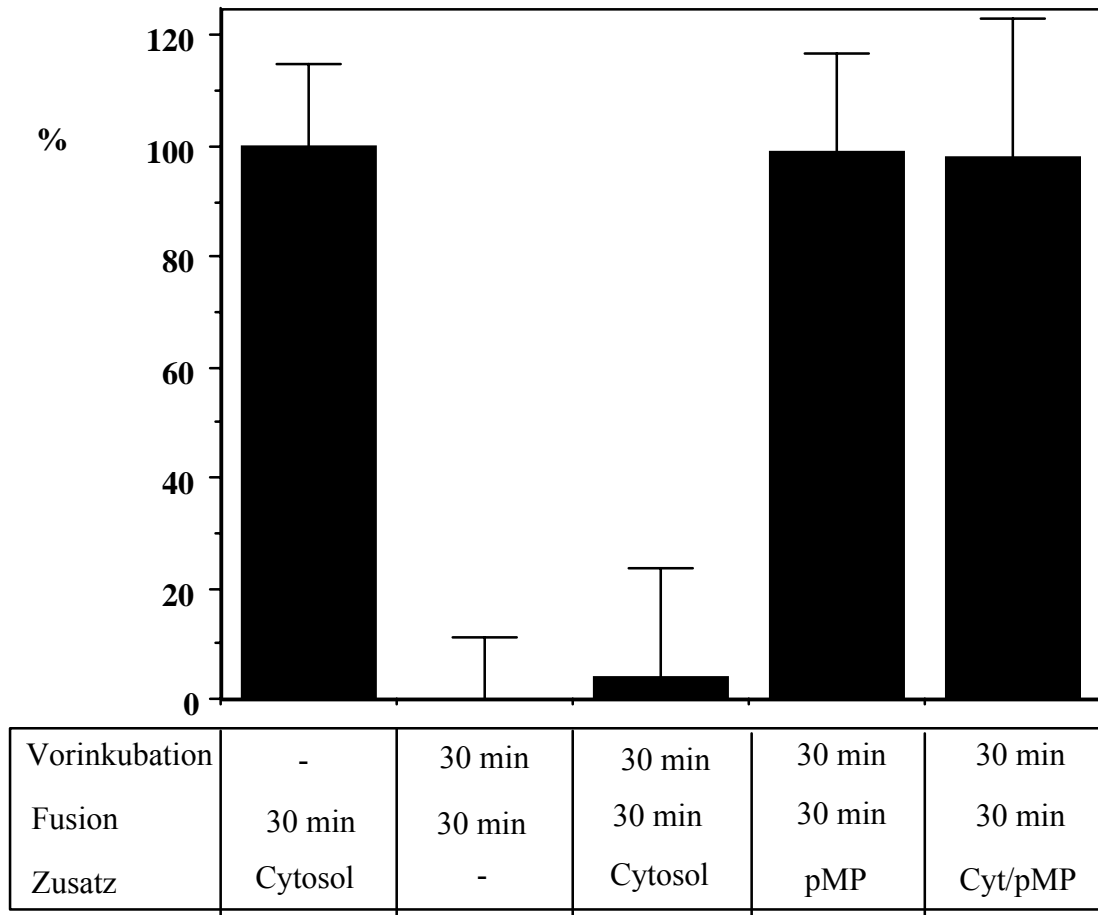
Abb. 4. 53.

Cytosol-Zugabe nach der Vorinkubation kann den Verlust des Fusions-signales nicht verhindern (Mittelwerte aus 2 Versuchsansätzen).



#### **4. 4. 3. 7. Regenerierung der Fusionsfähigkeit durch periphere Membranproteine**

Die Ergebnisse der bereits beschriebenen Experimente führten zu dem Schluß, daß die bei der Vorinkubation auftretenden Prozesse weder durch Maturationsvorgänge noch durch Erschöpfung cytosolischer Faktoren erklärbar sind. Aufgrund der Beobachtung, daß bei Hepatocyten-Endosomen wesentliche Bestandteile der Fusionsmaschinerie an die Membranen assoziiert sind, wie z.B. bei der Lokalisation des NEM-Effektes auf die Fusion gezeigt wurde (siehe 4. 4. 2. 6.), konnte angenommen werden, daß eine weitere Möglichkeit für die Abnahme der Fusionsaktivität bei der Vorinkubation die Inaktivierung membranständiger Fusionsfaktoren ist. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden periphere Membranproteine aus Hepatocyten-Mikrosomen nach der Methode von Colombo et al. (1991) präpariert, und dem Versuchsansatz nach der Vorinkubation zugesetzt. Ein Zusatz peripherer Membranproteine in einer Endkonzentration von 0,6 mg/ml konnte die Fusionsfähigkeit nahezu vollständig regenerieren, während die Zugabe von frischem Cytosol (Endkonzentration: 6,2 mg/ml frisches Cytosol, 12,4 mg/ml Gesamt-Cytosol) keine signifikante Regenerierung der Fusionsaktivität bewirkte (Abb. 4. 54.). Aus diesem Resultat wurde geschlossen, daß es bei der Vorinkubation durch interne Fusionsvorgänge zu einem Verbrauch Membran-assoziiierter Fusionsfaktoren kommt.



Vorinkub.	Fusion	Zusatz	Konzentr.	Signal	s
-	30 min	Cytosol	6,2 mg/ml	100 %	14,0 %
30 min	30 min	-	-	0 %	13,1 %
30 min	30 min	Cytosol	6,2 mg/ml	3,7 %	20,0 %
30 min	30 min	pMP	0,6 mg/ml	99 %	17,8 %
30 min	30 min	pMP Cytosol	0,3 mg/ml 3,1 mg/ml	98 %	25,0 %

Abb. 4. 54.

Vorinkubation früher Endosomen bei 37°C und Zugabe von Cytosol, bzw. peripherer Membranproteine (pMP) vor der darauffolgenden Fusion.

#### **4. 4. 3. 8. Reduktion der fusionsregenerierenden Wirkung peripherer Membranproteine durch NEM und GTPγS**

Bei den Experimenten zur Hemmung der Fusion mit NEM hat sich gezeigt, daß vor allem die Endosomen-Membranen NEM-sensitiv sind. Nachdem nun eine Präparation peripherer Membranproteine in der Lage war die Fusionsaktivität nach einer Vorinkubation wieder herstellen, sollte untersucht werden, ob diese regenerative Eigenschaft durch Behandlung mit NEM blockiert werden kann. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse schien es nämlich möglich zu sein, daß der NEM-sensitive Faktor (NSF), der bei anderen Zelllinien hauptsächlich im Cytosol zu finden ist, bei den Hepatocyten-Endosomen im Gleichgewichtszustand eher an die Membran gebunden ist und dort gemeinsam mit anderen assoziierten Proteinen einen Fusionskomplex bildet.

Nachdem auch GTP-bindende periphere Membranproteine (wie z.B. rab 5) eine wesentliche Rolle bei Endosomen-Fusionen spielen, war auch eine Beteiligung derartiger Proteine an der aktivierenden Wirkung der peripheren Membranprotein-Präparation denkbar. Diese Aspekte wurden untersucht, indem die peripheren Membranproteine mit NEM (2 mmol/l, 20 min bei 0°C) oder GTPγS (10 µmol/l, 20 min bei 0°C) inkubiert wurden.

Wie in Abb. 4. 55. zu sehen ist führte die NEM-Behandlung der peripheren Membranproteine zu einer praktisch vollständigen Hemmung ihrer fusionsaktivierenden Fähigkeit, während die Blockierung GTP-bindender Proteine durch GTPγS einen intermediären Effekt zeigte.

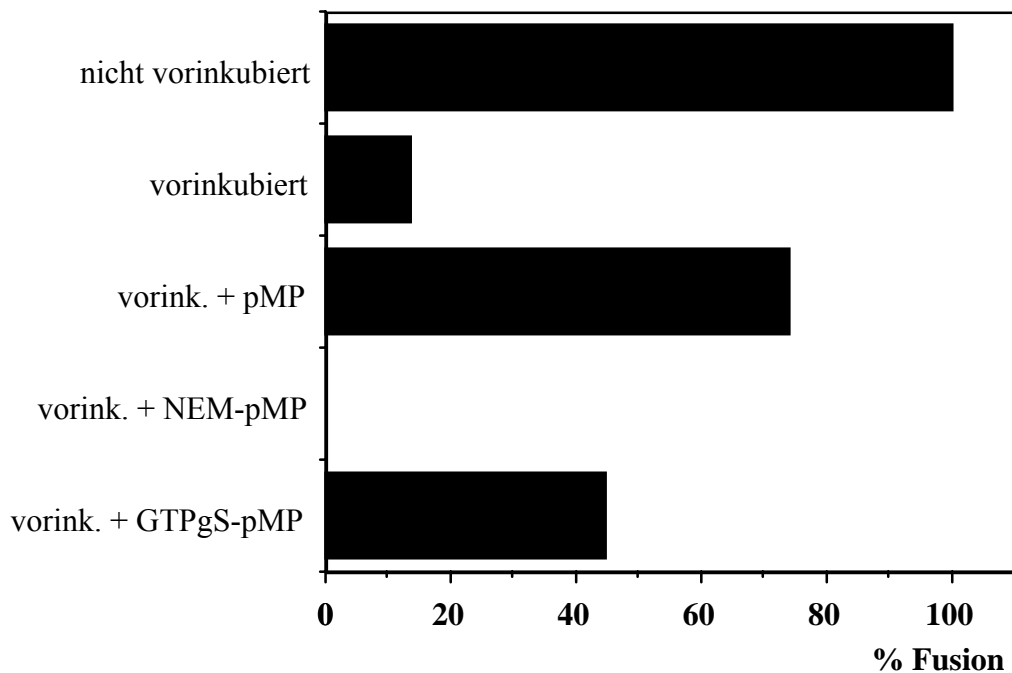


Abb. 4. 55.

Effekt von NEM (2mmol/l) und GTPγS (10 μmol/l) auf die fusionsregenerierende Wirkung einer Präparation peripherer Membranproteine.

#### **4. 4. 3. 9. SDS-PAGE der Präparation peripherer Membranproteine**

Zur näheren Charakterisierung der Präparation peripherer Membranproteine wurde reduzierende und nicht-reduzierende SDS-PAGE auf dem Phastsystem (Firma Pharmacia) durchgeführt. Nach einer Silberfärbung wurden die Gele mit Hilfe eines Computer-unterstützten Laser-Densitometers (Gelscan XL, Pharmacia) ausgewertet. Bei einer Präparation peripherer Membranproteine aus Mikrosomen wurden sowohl unter reduzierenden, als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen zwei Hauptbanden mit je etwa 37 kDa und 48 kDa gefunden (Abb. 4. 56. und Tab. 4. 6.). Der Anteil dieser Proteine betrug jeweils ca. 15 - 25% aller detektierten Proteine. Die restlichen 50 - 80% wurden von einer ganzen Reihe anderer Proteine gebildet.

Abb. 4. 56.

A) reduzierende SDS-PAGE peripherer Membranproteine auf einem 12,5% igen Gel unter Verwendung des Phastsystems von Pharmacia (bei 15°C, 70 Vh).

B) nicht-reduzierende SDS-PAGE der gleichen Protein-Präparation auf einem 7,5% igen Gel (bei 15°C, 65 Vh).

reduzierende SDS-PAGE

nicht-reduzierende SDS-PAGE

Molekular-Gewicht	rel. Peak-fläche	Molekular-Gewicht	rel. Peak-fläche
89,5 kDa	9,8 %	96,9 kDa	6,6 %
81,3 kDa	7,0 %	84,1 kDa	5,6 %
66,3 kDa	3,8 %	67,1 kDa	3,8 %
61,0 kDa	2,0 %	60,3 kDa	3,6 %
49 kDa	15,8 %	46,2 kDa	26,8 %
42,3 kDa	4,7 %	41,9 kDa	3,3 %
39,6 kDa	1,2 %	40,5 kDa	4,0 %
37,4 kDa	20,6 %	36,6 kDa	24,1 %

Tab. 4. 6.

Molekulargewichte und relative Peakflächen der peripheren Membranproteine nach reduzierender und nicht-reduzierender SDS-PAGE. Proteine, die möglicherweise korrespondieren, wurden einander gegenübergestellt. Kleinere Anteile anderer ebenfalls gemessener Proteine wurden nicht aufgelistet.

#### **4. 4. 4. *IN VITRO* FUSION VON ENDOSOMEN MIT LYSOSOMEN**

##### **4. 4. 4. 1. Etablierung des Fusionssystems**

Es wurde ein Fusionstest entwickelt, der geeignet war die Fusion zwischen Endosomen und Lysosomen nachzuweisen. Dazu wurden Lysosomen 2 h *in situ* mit Biotin-Dextran markiert, gefolgt von 1 h Chase durch Marker-freie Perfusion. Gleichzeitig mit dem Biotin-Dextran wurde FITC-Dextran eingesetzt, um dieselbe Lysosomen-Präparation auch zur Organellen-Durchflußanalyse verwenden zu können. Da Dextran in den Lysosomen nicht abgebaut werden kann, ist es für deren Markierung geeignet. Die Lysosomen wurden durch Zentrifugation bei 27000 g für 10 min angereichert und mit Avidin-beladenen Endosomen zur Fusion gebracht. Für die Fusionstests wurden späte Endosomen verwendet, die mit galaktosyliertem Avidin markiert waren (3 min mit Marker, 10 min Marker-frei inkubiert; eingesetzt wurde eine Mikrosomen-Fraktion nach Abzentrifugation der Lysosomen bei 27000g 10 min). Frühe Endosomen wurden

bei 16°C mit Avidin als Fluid-Phase Marker beladen. Im Fusionstest wurde eine Mikrosomenpräparation eingesetzt.

Die Inkubation von Lysosomen mit Endosomen unter Fusionsbedingungen führte zu einem eindeutigen ATP-abhängigen Fusionsignal, und zwar sowohl mit frühen als auch mit späten markierten Endosomen (Abb. 4. 57.).

Dieser Fusionsprozeß zeigte eine ähnliche Kinetik wie die Fusion von Endosomen untereinander (Abb. 4. 58.).

Aufgrund unserer Ergebnisse, die für eine Fusion von frühen Endosomen mit späten Endosomen sprechen, ist es aber prinzipiell auch möglich, daß es im Fusionstest zwischen frühen Endosomen und Lysosomen zuerst zu einer Fusion der frühen Endosomen mit späten Endosomen kommt, die danach mit Lysosomen fusionieren. Es wurde jedoch keine Verzögerung in der Kinetik der Fusion zwischen frühen Endosomen und Lysosomen bemerkt.

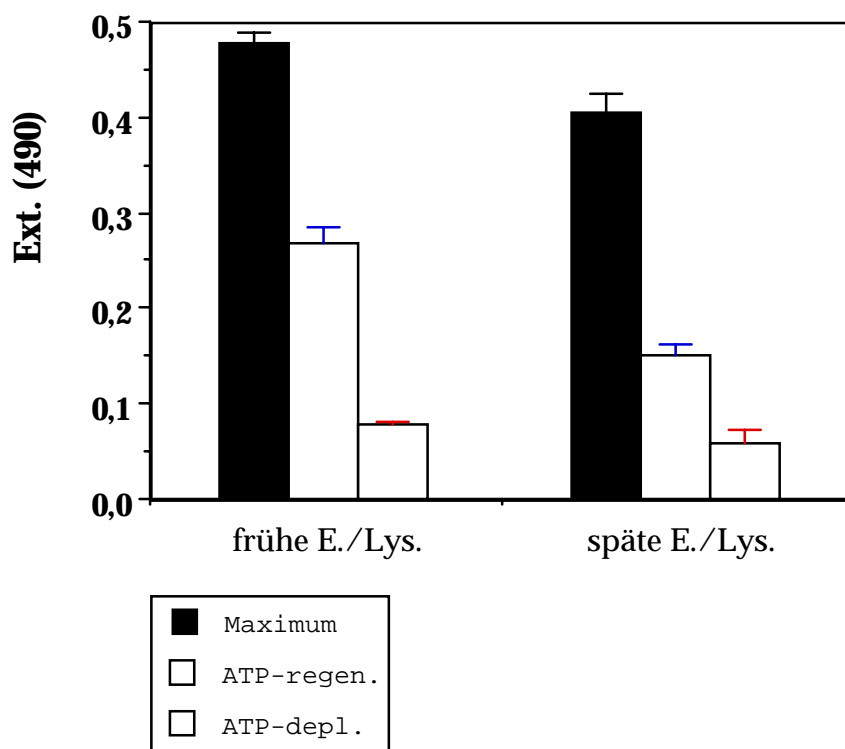


Abb. 4. 57.

*In vitro* Fusion Biotin-Dextran markierter Lysosomen mit Avidin-beladenen frühen Endosomen oder galaktosyliertem Avidin beladenen späten Endosomen; Fusionsbedingungen: KCISH-Puffer; 2,5 mmol/l ATP, 5 mmol/l Phosphokreatin, 11 units/ml Phosphokreatin-Kinase; Cytosol: 20 mg/ml)

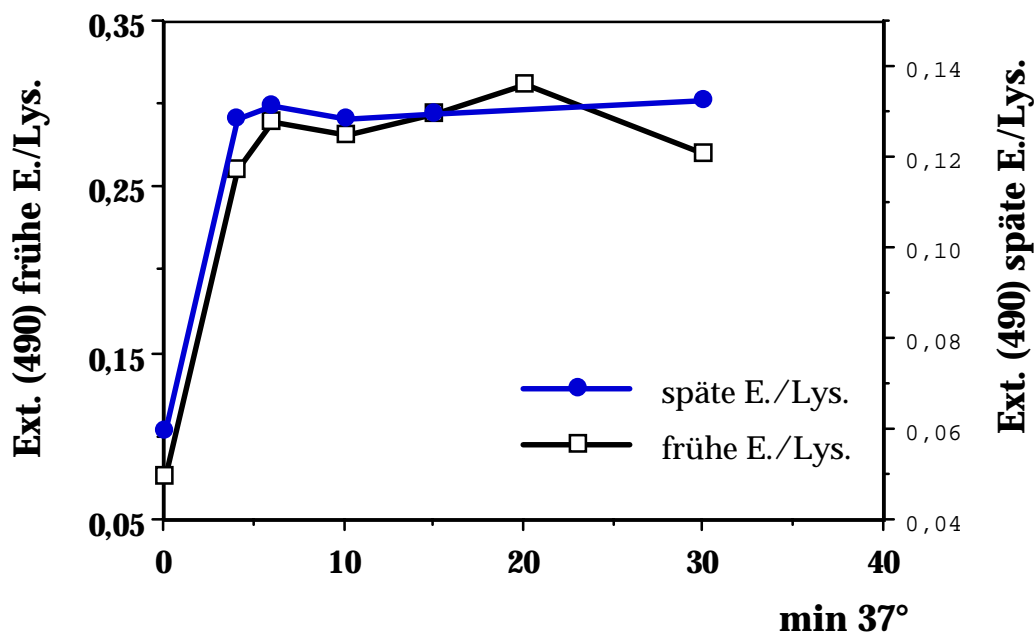


Abb. 4. 58.

Kinetik der Fusion von Lysosomen mit frühen Endosomen und späten Endosomen.

#### **4. 4. 4. 2. Hemmung der Endosomen-Lysosomen Fusion durch NEM und durch Vorinkubation der Endosomen**

Zur näheren Charakterisierung der Endosomen-Lysosomen Fusion wurden Inhibierungsstudien durchgeführt, in denen entweder das Cytosol oder die Membranen mit NEM (2 mmol/l) behandelt wurden.

Wie bei den Fusionstests von Endosomen untereinander wurde dabei beobachtet, daß die NEM-Sensitivität auf den Membranen lokalisiert ist, und eine NEM-Behandlung des Cytosols praktisch ohne Effekt bleibt (Abb. 4. 59.).

Dieses Ergebnis entspricht eigentlich den allgemeinen Erwartungen für intrazelluläre Fusionsvorgänge (siehe Wilschut, 1989).

Eine Vorinkubation der Endosomen in Gegenwart von ATP reduzierte das nachfolgende Fusionssignal mit Lysosomen, wie bereits für die Endosomenfusion beschrieben wurde, wahrscheinlich durch Fusion der Endosomen untereinander und dadurch verursachte Erschöpfung von Fusionsfaktoren. Eine Vorinkubation der Lysosomen rief hingegen keine deutliche Reduktion der Fusion hervor. Dieser Befund ist ein Hinweis dafür, daß die Lysosomen in unserem System möglicherweise nicht oder nur in



geringem Ausmaß miteinander fusionieren. (siehe 4. 4. 5. 6.: SOFA von Lysosomen nach Inkubation unter Fusionsbedingungen).

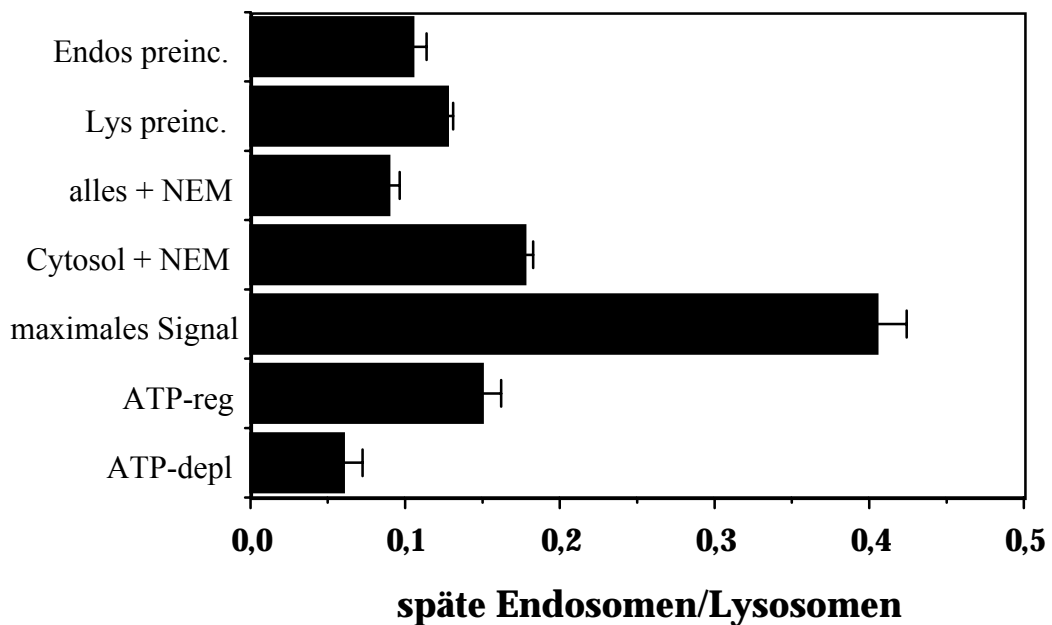
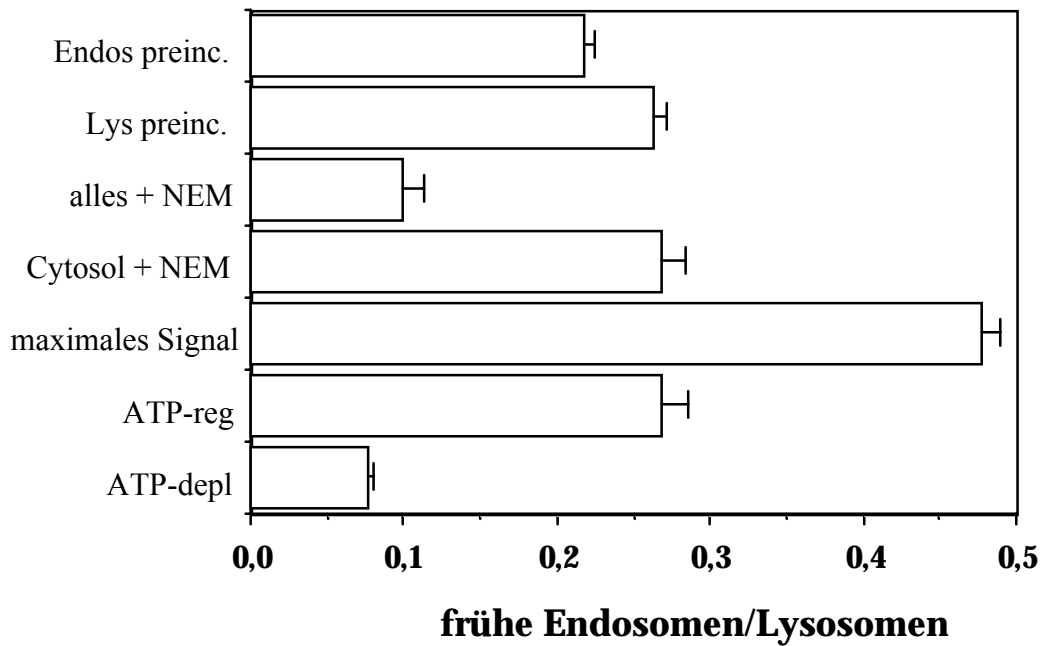


Abb 4. 59.

Einfluß von NEM auf die Endosomen-Lysosomen Fusion und Lokalisierung des NEM-Effektes

#### **4. 4. 5. MESSUNG DER *IN VITRO* FUSION DURCH DURCHFLUSS-ANALYSE FLUORESCENZMARKIERTER ENDOSOMEN (SINGLE ORGANELLE FLOW ANALYSIS, SOFA):**

Im Prinzip sollte bei der *in vitro* Fusion von Endosomen eine Zunahme der durchschnittlichen Kompartimentgröße auftreten. Als methodischer Ansatz um diese These zu überprüfen, wurde die Durchfluß-Analyse fluoreszenzmarkierter Endosomen auf einem Fluorescence Activated Cell Sorter (FACScan, Becton Dickinson) gewählt.

##### **4. 4. 5. 1. FACS-Analyse von Standardpartikeln (Beads)**

Um die Meßparameter des FACS-Gerätes für die Analyse subzellulärer Kompartimente wie Endosomen oder Lysosomen zu optimieren, wurden Standardpartikel mit 0,364 µm, 0,624 µm, 1,3 µm und 1,6 µm gemessen und die Werte für die Detektor-Einstellungen und Verstärkung so gewählt, daß die kleinsten Partikel noch gut detektiert werden konnten (Abb. 4. 60. und 4. 61.). Es hat sich herausgestellt, daß die Größe der Partikel in diesem Bereich am besten mit der Lichtstreuung im Winkel von 90° korreliert, dem sogenannten Side Scatter (SSC). Bei der Analyse ganzer Zellen wird normalerweise die Lichtstreuung in einem spitzen Winkel zum Anregungslicht des Lasers (ca. 5°, Forward Scatter, FSC) zur Abschätzung der Größe herangezogen. Im Fall kleiner Strukturen wie subzellulärer Kompartimente hat sich dieser Parameter jedoch als nicht so praktikabel erwiesen, da er eine geringere Abhängigkeit von der Partikelgröße zeigte. Außerdem wird dieser Wert normalerweise von einem weniger empfindlichen Detektor geliefert, als der Side Scatter, dessen primäres Signal noch über einen Sekundärelektronen-Vervielfacher verstärkt wird. Der Side Scatter dient bei der Analyse ganzer Zellen üblicherweise zur Beurteilung der Granulosität, die mit subzellulären Kompartimenten zusammenhängt. Wenn alle Detektorsignale logarithmisch verstärkt wurden, so wurde eine sehr hohe Ereignisrate (ca. 8000/sec.) in reinem Puffer gemessen, was darauf hindeutete, daß es unter diesen für FACS-Analysen grenzwertigen Bedingungen zu einem sehr hohen elektronischen Rauschen kommt. Aufgrund dessen wurde für den Forward Scatter nur eine lineare Signalverstärkung eingestellt. Alle Größen-Abschätzungen wurden somit über den Side Scatter durchgeführt.

Abb. 4. 60.

Kontourdiagramm des Ergebnisses der Durchfluß-Analyse von Standardpartikel

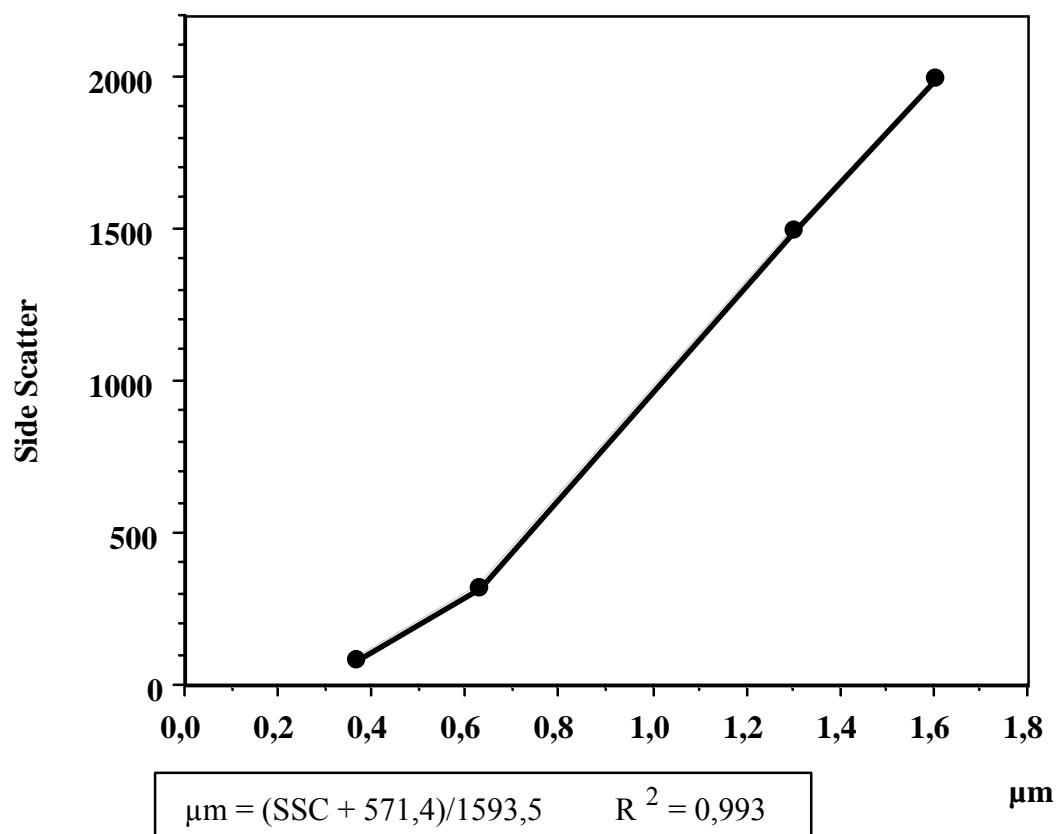


Abb. 4. 61.

FACS-Analyse von Standardpartikeln: lineare Eichkurve für den Zusammenhang zwischen Größe in µm und Side Scatter.

#### 4. 4. 5. 2. SOFA fluoreszenzmarkierter Membran-Präparationen

Die Beladung früher Endosomen für die Durchflußanalyse erfolgte durch Perfusion einer isolierten Rattenleber mit ca. 10 mg/ml FITC-Dextran (dialysiert gegen TBS, PBS und KHB) bei 37°C für 1 min, gefolgt von sofortiger Abkühlung durch Perfusion mit 200 ml eiskaltem Hanks-Puffer (+ 5 mmol/l EGTA) und Perfusion mit 50 ml eiskaltem Homogenisations-puffer (KAcSHM) mit PMSF (50 µg/ml), Leupeptin (2 µg/ml) und Pepstatin (0,7 µg/ml) als Protease-Inhibitoren. Die Homogenisation und die Präparation von postnukleärem Überstand, sowie von angereicherten Endo-somen-Fraktionen erfolgte wie unter 3. 2. 3. 7. beschrieben.

Zur primären Charakterisierung dieser fluoreszenzmarkierten Membranpräparationen wurde die Durchflußanalyse im Vergleich zu nicht markierten Endosomen, bzw. postnukleärem Überstand durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, daß bei den fluoreszenzmarkierten Membranen eine Population von Vesikeln mit deutlich höherem FITC-Fluoreszenzsignal auftritt (Abb. 4. 62.).

Abb. 4. 62.

A) Kontroll-PNS und FITC-Dextran markierter PNS

B) Kontroll-Endosomen und FITC-Dextran markierte Endosomen

#### **4. 4. 5. 3. Zunahme des Side Scatters früher Endosomen nach Inkubation unter Fusionsbedingungen**

Frühe FITC-Dextran beladene Endosomen (PNS-Präparationen) wurden in Gegenwart von ATP und einem ATP-regenerierenden System unter Fusionsbedingungen (mit Additivpuffer und Cytosol) bei 37°C inkubiert, die Fusion wurde durch Zugabe von eiskaltem Fusionspuffer (etwa 100 Volumina) nach bestimmten Zeitpunkten abgestoppt und die Endosomensuspension einer Durchfluß-Analyse unterworfen.

Wie in Abb. 4. 63. zu sehen ist, führte die Inkubation der Endosomen unter Fusionsbedingungen zu einer Verschiebung der fluoreszenzmarkierten Vesikel-Population auf einen höheren Side Scatter. Die Entstehung dieser Population war ATP-abhängig und wurde auf die Fusion FITC-Dextran beladener Endosomen untereinander zurückgeführt.

Die Zahl der Kompartimente, die in eine ausgewählte Meßregion höherer Fluoreszenz und höheren Side Scatters fielen wurde quantifiziert, und mit der entsprechenden Zahl einer Probe, die unter ATP-erschöpfenden Bedingungen (+ Hexokinase und Deoxyglucose, siehe Anhang A) inkubiert wurde, verglichen. Abb. 4. 64. zeigt die Zunahme der Anzahl dieser Kompartimente in einer Probe mit ATP-regenerierendem System, während diese Zahl bei der ATP-depletierten Probe konstant niedrig bleibt. .

Abb. 4. 63.

Kontourdiagramm von FITC-Dextran beladenen Endosomen nach Fusionstest und SOFA: Entstehung einer Population von fluoreszierenden Vesikeln mit höherem Side Scatter (SSC: x-Achse, FITC-Fluoreszenz: y-Achse) aufgrund der Fusion.

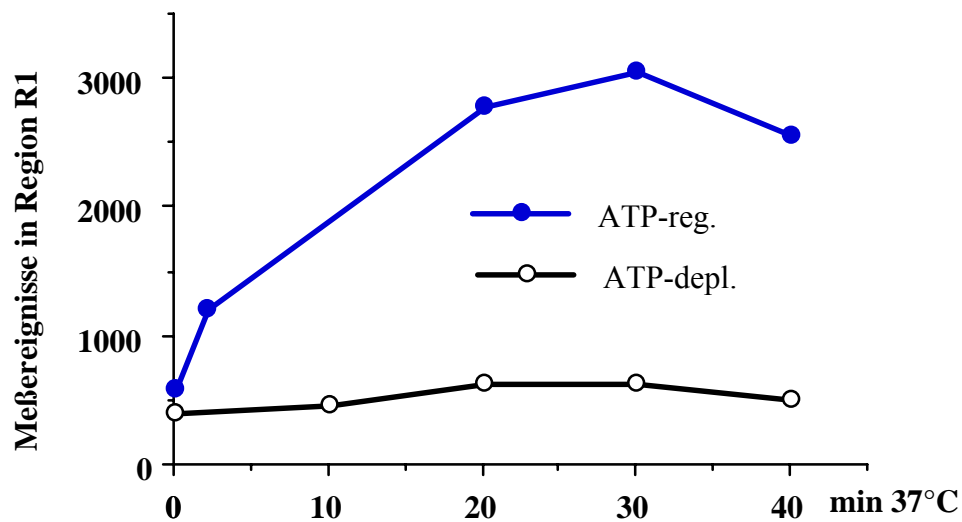


Abb. 4. 64.

Kinetik des Auftretens von Vesikeln in der Meßregion R1: Vergleich zwischen Probe mit ATP-regenerierendem System und Probe mit ATP-erschöpfendem System.

Aufgrund der Beobachtung, daß bei Membransuspensionen mit fluoreszenzmarkierten Endosomen eine Population fluoreszierender Vesikel sich relativ klar über das Fluoreszenzsignal nicht markierter Kontroll-Präparationen erhebt (siehe Abb. 4. 62.) wurde in der Folge ein Meßalgorithmus eingesetzt, bei dem nur diese deutlich markierten Endosomen in der Durchfluß-Analyse erfaßt wurden. Zu diesem Zweck wurde auf der graphischen Benutzeroberfläche der Computer-Anlage, die das FACS-Gerät steuert, auf Basis der nicht markierten Kontrolle ein Fluoreszenz-Grenzwert eingegeben, unter dem ein Kompartiment nicht erfaßt und gemessen werden soll. Dadurch konnte erreicht werden, daß eine weit größere Anzahl der relevanten, fluoreszenzmarkierten Endosomen gemessen wird. Ein weiterer Vorteil dieser Meßmethode war, daß das Entstehen größerer Vesikel aufgrund der Fusion nicht nur als Auftreten einer zahlenmäßig geringeren Population in einem Kontourdiagramm verfolgt werden konnte, sondern auch als Verschiebung in einem Side Scatter-Histogramm direkt sichtbar war (Abb. 4. 65.). Das Histogramm konnte auch statistisch genauer ausgewertet werden. Der SSC-Wert, der die höchste Häufigkeit aufwies konnte ebenso gemessen werden wie der Median oder der Mittelwert der Verteilungsfunktion. Diese Parameter zeigten im Verlauf der Fusion eine ähnliche Kinetik wie das Auftreten der Endosomen in der Meßregion R1 bei der Kontourdiagramm-Analyse.



#### Abb. 4. 65.

Histogramm der Side Scatter Verteilung von FITC-Dextran markierten Endosomen vor und nach dem Fusionstest unter ATP-regenerierenden oder ATP-erschöpfenden Bedingungen.

#### **4. 4. 5. 4. Temperaturabhängigkeit der Fusion**

Die Durchfluß-Analyse wurde auch eingesetzt um die Temperatur-Abhängigkeit der Endosomenfusion zu untersuchen. Aliquots der Fusionsprobe wurden 30 min bei 0°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30° und 37°C inkubiert, mit eiskaltem Fusionspuffer abgestoppt, und das Ausmaß der Fusion wurde aufgrund der Verschiebung des Side Scatters bei der SOFA bestimmt (Abb. 4. 66.: SSC-Histogramme, Abb. 4. 67.: daraus ermittelte Temperatur-Abhängigkeit der Fusion). Die Analyse zeigte das nach den Befunden anderer Forschungsgruppen zu erwartende Ergebnis. Bis 10°C konnte keine Fusion detektiert werden. Darüber kam es zu einem in etwa linearen Anstieg des Fusionssignales. Das Maximum lag bei 37°C.

Abb. 4. 66.

SSC-Histogramme von Fusionsproben die bei unterschiedlichen Temperaturen zwischen 0°C und 37°C inkubiert wurden.

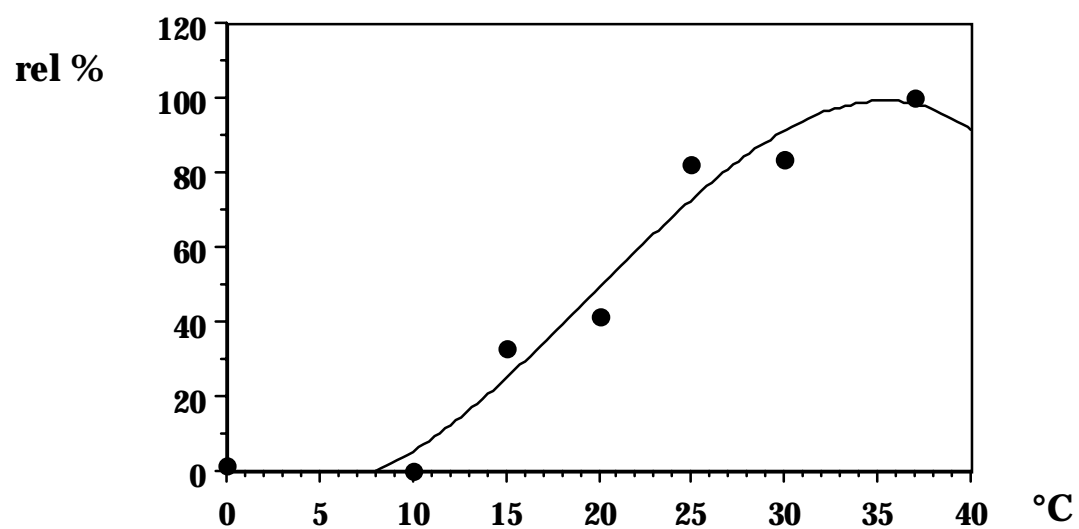


Abb 4. 67.

Temperatur-Abhängigkeit der Fusion (Messung mit SOFA)

#### **4. 4. 5. 5. Fusion in KAcSH- und KClSH-Puffer in Gegenwart und Abwesenheit von Nigericin**

Da im Avidin/Biotin-Detektionssystem ein Einfluß von Nigericin auf das Fusionsignal (bei einer Fusion in KAcSH-Puffer) beobachtet wurde, war es naheliegend dieses Phänomen auch im System der Durchfluß-Analyse von Endosomen zu untersuchen. Es wurden FITC-Dextran markierte Endosomen in KAcSH- oder in KClSH-Puffer, in Gegenwart oder Abwesenheit von Nigericin (2  $\mu\text{mol/l}$ ) zur Fusion gebracht. Dabei konnte gezeigt werden, daß es bei Fusion in KClSH-Puffer zum Auftreten einer Population größerer Vesikel kommt, und das kein Unterschied zu einer Fusion in Anwesenheit von Nigericin detektiert werden konnte. Nach einer Fusion in KAcSH-Puffer in Anwesenheit von Nigericin wurde eine Side Scatter-Häufigkeitsverteilung gemessen, die mit der ersten Probe praktisch ident war; nach Fusion in KAcSH-Puffer ohne Zugabe von Nigericin wurde jedoch ein davon signifikant abweichendes Verhalten gemessen. Es kam nur zu einer intermediären Verschiebung des Side Scatters, und die Population größerer Vesikel, die in Anwesenheit von Nigericin beobachtet wurde, fehlte (Abb. 4. 68.).

Dieses Ergebnis könnte verschiedene Interpretationen nach sich ziehen. Nachdem die Chlorid-Ionen im KClSH-Puffer offensichtlich den gleichen Effekt haben wie Nigericin in KAcSH-Puffer, könnte das Phänomen auf Veränderungen des Membranpotentials zurückgeführt werden. Die Anwesenheit von KCl-Ionen könnte über Chlorid-Kanäle die Entstehung eines Membranpotentials als Folge der Azidifizierung durch die elektrogenene H<sup>+</sup>-ATPase verhindern, und somit möglicherweise einer elektrostatischen Abstoßung von Fusionspartnern entgegenwirken. Bei einer ausreichenden Wirkung der Chlorid-Ionen in dieser Hinsicht wäre eine zusätzliche Zugabe von Nigericin ohne deutlichen Effekt. Im Fall des Fusionstests in KAcSH-Puffer könnte Nigericin die lumenale Azidifizierung verhindern, und damit die Fusion und die Bildung größerer Vesikel stimulieren.

Abb 4. 68.

SOFA nach Fusion in KAcSH- und in KClSH-Puffer in Gegenwart oder Abwesenheit von Nigericin (2  $\mu\text{mol/l}$ ).

#### **4. 4. 5. 6. SOFA von Lysosomen nach Inkubation unter Fusionsbedingungen**

Für die Durchflußanalyse wurde die gleiche mit FITC-Dextran und Biotin-Dextran doppelt markierte Lysosomen-Präparation verwendet wie bei den

Endosomen-Lysosomen Fusionstests. Die spezifische Lysosomen-Beladung erfolgte durch Endozytose der Marker für 2 h *in situ*, gefolgt von Marker-freier Perfusion für 1 h bei 37°C, damit der noch in den Endosomen befindliche Marker-Anteil bis in die Lysosomen weitertransportiert wird. Nach dieser spezifischen Markierung wurde ein Lysosomen-angereichertes Zentrifugat präpariert (27000 g Pellet), das als Ausgangsmaterial für die weiteren Experimente diente.

Die fluoreszenzmarkierte Lysosomen-Präparation wurde in Gegenwart von ca. 23 mg/ml Cytosol mit einem ATP-regenerierenden System (ATP-Endkonzentration: 2,5 mmol/l) unter Fusionsbedingungen inkubiert. Nach 0, 5, 10, 15, 20, 30 und 40 min bei 37°C wurden 5 µl Aliquots entnommen und mit 495 µl eiskaltem KCISH-Puffer abgekühlt, dem 2 µmol/l Nigericin zugesetzt waren, um eine Azidifizierung und damit eine potentielle FITC-Fluoreszenzabnahme zu verhindern. Mit dieser Lysosomensuspension wurde eine Durchfluß-Analyse mit den gleichen Parametern wie bei der SOFA von Endosomen durchgeführt.

Als Kontrolle wurde eine unmarkierte Lysosomen-Präparation eingesetzt. Die FITC-Dextran markierten Lysosomen zeigten in der Analyse ein deutliches Fluoreszenzsignal, es konnte jedoch keine Veränderung des Side Scatter-Faktors wie bei den Endosomen konstatiert werden (Abb. 4. 69. und 4. 70.). Es kommt also zu keiner Entstehung einer Population größerer Lysosomen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß unter den angegebenen Bedingungen Lysosomen untereinander nicht fusionieren können, oder daß eine Fusion und Größen-Veränderung zustandekommt, diese jedoch durch Fissionsvorgänge wieder kompensiert wird. Da aber in unserem System keine intakten Cytoskelett-Bestandteile zu erwarten sind, die für einen Fissionsprozeß notwendig wären, ist diese Möglichkeit als unwahrscheinlich anzusehen. Ein interessanter Aspekt ist, daß dieselbe Lysosomen-Präparation in der Lage war mit Endosomen, und zwar sowohl frühen, als auch späten zu fusionieren.

Abb 4. 69.

A) Kontroll-Lysosomen

B) FITC-Dextran markierte Lysosomen: 0, 10, 20, 30, 40 min unter Fusionsbedingungen inkubiert.

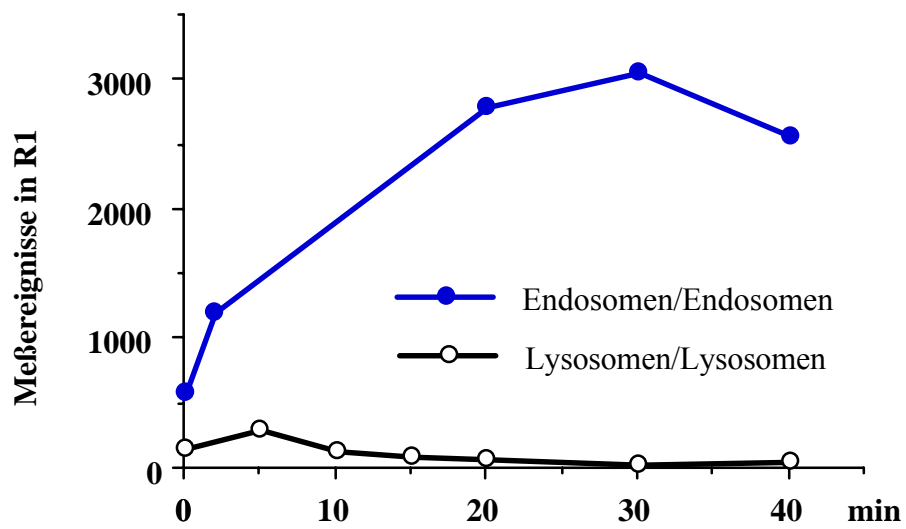


Abb. 4. 70.

Kinetik des Auftretens von markierten Lysosomen in der Region R1 der Abb. 4. 69., Vergleich mit dem Auftreten von markierten Endosomen in der entsprechenden Meßregion bei der Endosomenfusion (Kinetik des Auftretens größerer Kompartimente).

## 5. DISKUSSION

### 5. 1. APIKALE ENDOCYTOSE UND 5. 2. APIKAL-BASOLATERALER TRANSPORT

Endocytische Prozesse an der apikalen Zelloberfläche von Hepatocyten erscheinen vor allem deshalb plausibel, weil aufgrund von Fusionen transcytotischer Vesikel mit der apikalen Membran laufend Membranmaterial eingebaut wird, das wieder entfernt werden muß, um die Zelloberfläche konstant zu halten. In frühen Studien wurde das Phänomen der apikalen Endocytose in Ratten-Hepatocyten bereits morphologisch beschrieben (Matter et al., 1969), später jedoch aufgrund des problematischen experimentellen Zugangs kaum mehr weiter verfolgt. Die pericanaliculären, endosomalen Strukturen, die durch retrograde Infusion von HRP (200 µl) in den Gallengang markiert wurden, zeigten kleine Vesikel, tubuläre Bereiche, sowie Vakuolen mit einem Durchmesser von ca. 1 µm, mit Membraneinschlüssen ähnlich den "Multivesicular Bodies".

Matter et al. (1969) konnten keine Durchdringung der Zonulae occludentes (Tight Junctions) detektieren und postulierten deshalb, daß kein parazellulärer, sondern ausschließlich ein transzellulärer Transport auf die basolaterale Seite auftritt, der jedoch sehr rasch vor sich geht. Dies bekräftigten sie noch dadurch, daß es unter ihren Bedingungen zu keinem verstärkten Übertreten von <sup>14</sup>C-Inulin, das mit 5 kDa an der Grenze der Tight Junction Permeabilität liegt, vom Blutkreislauf in die Galle kommt.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit weisen jedoch darauf hin, daß es durch die retrograde Injektion doch zu einer Öffnung der Tight Junctions kommt, und zwar nicht nur aufgrund der Beobachtung, daß der Marker sofort nach der Injektion im Perfusat meßbar ist, sondern auch aufgrund der Ergebnisse der Quantifizierung des apikal-basolateralen Transports. Die Menge an Marker, die unmittelbar nach der Injektion im Perfusat meßbar war, erschien für einen transzellulären Transport zu hoch. Ein weiteres Indiz für einen parazellulären Transport war die Tatsache, daß er auch bei 4°C stattfand. Die Injektion bei 4°C schien jedoch geeignet, das canaliculäre System zu beladen, und den parazellulär auf die basolaterale Seite transportierten Marker auszuspülen, bevor durch eine Erwärmung



auf 37°C die apikale Endocytose induziert wird. Die Ergebnisse lassen es möglich erscheinen, daß sich die Tight Junctions unter diesen Bedingungen wieder schließen, bzw. daß der Marker aus jenen Bereichen, die geöffnet bleiben, ausreichend ausgespült wird. Diese Versuchsparameter führten zur Markierung intrazellulärer Vesikel, die im pericanaliculären, also im apikalen Bereich der Zelle lokalisiert waren. Durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte eine partielle Kolokalisation dieser endocytischen Strukturen mit apikalen Membranproteinen nachgewiesen werden. Das Verteilungsmuster der apikalen Membranproteine unterschied sich jedoch von der nicht apikal beladenen Kontrolle. Dies könnte bedeuten, daß durch die Injektion (ev. durch den erhöhten Druck) eine unphysiologische apikale Endocytose induziert wird. Die Größe der apikalen Endosomen war jedoch durchaus in einem für Endosomen zu erwartenden Bereich (ca. 0,5 µm) und ist mit den Befunden von Matter et al. (1969) in Übereinstimmung. Die für die apikal markierten Vesikel nachgewiesenen Azidifizierungsfähigkeiten sprechen dafür, daß sie wie andere endosomale oder lysosomale Kompartimente H<sup>+</sup>-ATPasen in der Membran enthalten. Die Durchflußanalyse von Endosomen-angereicherten Membransuspensionen, nach gleichzeitiger apikaler und basolateraler Markierung unterstützt die These, daß eine eigene Population apikaler Endosomen markiert wurde, da keine sofortige Kolokalisation mit dem basolateralen Marker detektierbar war. Es kam jedoch *in vivo* scheinbar zu einem Zusammentreffen apikal und basolateral endocytierter Marker 2 - 5 min nach der Internalisierung. Dies ist ein Hinweis dafür, daß apikale und basolaterale Endocytose-wege in gemeinsamen intrazellulären Kompartimenten zusammenlaufen. Die schnelle Kinetik dieses Vorganges ist in Einklang mit anderen Befunden, die rasche Endocytose-Wege in der Leber postulieren (Hayakawa et al., 1990; Wall & Hubbard, 1985). Die für apikale Endocytose-Experimente eingesetzten Versuchsbedingungen wurden auch verwendet, um den apikal-basolateralen Transport zu studieren. Der nach Erwärmung auf 37°C gemessene Transport zeigte ebenfalls eine schnelle Kinetik und war in einer Größenordnung, die für einen transzellulären Mechanismus plausibel erscheint. Dennoch war nicht auszuschließen, daß er auf einem parazellulären Vorgang beruht.

### **5. 3. BASOLATERAL-APIKALE TRANSCYTOSE**

Der Transport von Makromolekülen vom Blutkreislauf in die Galle wurde in dieser Arbeit erstmals differenziert hinsichtlich Clathrin-abhängiger und unabhängiger, bzw. Rezeptor-vermittelter und Fluid-Phase-Transportwege studiert.

Zur Untersuchung der Fluid-Phase-Transcytose wurden zwei Verbindungen (FITC-Dextran und HRP) eingesetzt, von denen für die meisten Zelllinien postuliert wird, daß sie nur über Fluid-Phase-Endocytose aufgenommen werden. Die Ergebnisse sprechen jedoch dagegen, daß HRP in der isoliert perfundierten Leber, bzw. für Hepatocyten als Fluid-Phase-Marker angesehen werden kann. Vielmehr gibt es einige Hinweise dafür, daß es an Bestandteile der Cytoplasmamembran binden kann, und durch adsorptive oder Rezeptor-vermittelte Endocytose internalisiert wird.

Die Unterschiede in den Transportcharakteristiken von HRP, FITC-Dextran und ASOR können zu dem Schluß führen, daß zumindest zwei verschiedene Transcytosewege existieren.

In der Transportkinetik unterschieden sich alle drei Verbindungen; FITC-Dextran wurde mit einem Maximum nach 4 - 7 min transcytiert, HRP zeigte zwei Maxima, und zwar etwa 4 min und etwa 14 min nach der Beladung; ASOR wurde mit einem Maximum nach etwa 15 min in die Galle sezerniert. Das erste Maximum von HRP fiel in vielen Fällen nicht mit dem FITC-Dextran-Maximum zusammen, auch nach einer gemeinsamen Beladung. Von anderen Autoren wurde postuliert, daß die schnelle HRP-Transportroute parazellulär verläuft (Hardison & Lowe, 1989); dieses Postulat wurde jedoch nur aufgrund der Kinetik aufgestellt. Morphologisch konnte eine Penetrierung der Tight Junctions unter normalen Bedingungen nicht festgestellt werden. In der Folge konnten HRP-positive intrazelluläre Vesikel bereits sehr früh in der Nähe der canaliculären Membran detektiert werden (Hayakawa et al., 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine deutliche Reduktion des schnellen Transportweges bei Beladung unter hypertonen oder Kalium-freien Bedingungen beobachtet, was ebenfalls eindeutig gegen eine parazelluläre Route spricht. Es scheint eher wahrscheinlich, daß dieser Weg einen raschen Clathrin-abhängigen Transport darstellt. Die schnelle Kinetik (z.B. verglichen mit der Transcytose in polarisierten Endothelzellen) könnte darauf zurückzuführen sein, daß es zu einer Endocytose an den lateralen Bereichen der basolateralen Membran kommt, die sehr nahe an die apikale

Membran herankommen. Dieser interzelluläre Raum wird auch sehr rasch von HRP erreicht (Matter et al., 1969; Hardison & Lowe, 1989). Der schnelle Transportweg wird offensichtlich durch niedrigere Temperaturen (16°C) nicht blockiert. Die Tatsache, daß er jedoch mengenmäßig reduziert wird, kann ebenfalls als Argument gegen einen parazellulären Weg gelten. Die Beobachtung, daß es nach einer Beladung bei 4°C und Ausspülen des Markers dennoch nach einer Erwärmung zu einer biliären Sekretion mit einer schnellen Kinetik kommt unterstützt die These, daß es sich bei diesem Transport um einen Rezeptor-vermittelten oder adsorptiven Vorgang handelt. Der langsame Transportweg dürfte ebenfalls auf einem Clathrin-abhängigen Mechanismus beruhen, da er ebenso wie die Rezeptor-vermittelte Transcytose von ASOR durch hypertone Bedingungen gehemmt wird, und auch bei einer Kalium-freien Perfusion verringert ist.

Auffällig ist jedoch, daß die sezernierte Menge an HRP signifikant unter jener von FITC-Dextran liegt, das in den Experimenten alle Kriterien für eine Fluid-Phase-Transcytose erfüllte. Theoretisch müßte es jedoch bei einer adsorptiven oder Rezeptor-vermittelten Transcytose zu einer Konzentrierung des Markers kommen. Ein mögliche Erklärung liegt im zellulären Aufbau der Leber. Nachdem HRP Mannose-Reste enthält, die an entsprechende Rezeptoren von Kupfferzellen und Endothelzellen binden können, könnte es zu einer Herabsetzung der HRP-Konzentration im Disse'schen Raum und somit an der Oberfläche der Hepatocyten kommen.

Dies scheint theoretisch trotz der Fenestrierung des Endothels möglich, wenn keine ausreichende Durchmischung zwischen Disse'schem und sinusoidalem Raum gegeben ist (Prinzip eines "Unstirred Layers"). Außerdem wurde eine Anzahl von nur etwa 600 Bindungsstellen pro parenchymatischer Leberzelle errechnet. Somit wäre eine geringere Sekretion als die eines Fluid-Phase-Markers trotz einer adsorptiven Endocytose denkbar.

Nicht auszuschließen ist auch ein Einfluß der Kupffer- und Endothelzellen. Es gibt die theoretische Möglichkeit, daß HRP nach Bindung an die Mannose-Rezeptoren dieser Zellen aufgenommen wird, durch Rezyklisierung wieder an die Zelloberfläche transportiert wird, dort zum Teil vom Rezeptor abdissoziiert und so (als Fluid-Phase-Marker) zu den Hepatocyten gelangt. Ein Argument gegen diese These ist jedoch, daß jener geringe Anteil der nach Rezyklisierung und Dissoziation vom

Rezeptor wieder ins Medium abgegeben werden könnte, bei einer Perfusionsrate von 40 ml/min sofort enorm verdünnt und wieder ausgespült würde.

Es scheint eher zu einer Bindung von HRP direkt an die Hepatocyten zu kommen, was durch Studien unterstützt wird, die zeigen, daß Mannose-spezifische Rezeptoren auch an Hepatocyten existieren (Dini et al., 1992).

## **5. 4. FUSIONSPROZESSE**

### **5. 4. 1. Allgemeine Überlegungen über Unterschiede zwischen den Fusionsbedingungen *in vitro* und *in vivo***

Die hohe Proteinkonzentration in der intakten Zelle (ca. 130 mg/ml bei Hepatocyten; aus eigenen Messungen extrapoliert) läßt die Frage aufkommen, wie der Fusionsvorgang der im Versuchsansatz *in vitro* untersucht wird unter den *in vivo* Bedingungen, also in einem deutlich visköserem Fluid vor sich geht. Wenn man diesen Vergleich zwischen den Fusionsbedingungen in der intakten Zelle und den Bedingungen im *in vitro*-Ansatz fortsetzt, so ist auch die Zahl der Endosomen pro Volumseinheit anzuführen, die *in vivo* viel höher ist als *in vitro*. Die höhere Viskosität in der lebenden Zelle wird möglicherweise durch diese höhere Endosomen-Anzahl ausgeglichen. Es läßt sich jedoch nicht ohne weiteres abschätzen, welcher der Faktoren überwiegt. Generell muß damit gerechnet werden, daß verschiedene Ergebnisse, die durch Experimente *in vitro* gewonnen wurden nicht unmittelbar auf die Verhältnisse in der lebenden Zelle übertragen werden können. Die Diffusionsstrecken sind in der intakten Zelle sicher um Größenordnungen geringer; viele der für die Endocytose entscheidenden Schritte laufen jedoch *in vivo* nicht nach den Gesetzen der freien Diffusion ab, sondern aufgrund aktiver Transportprozesse. Andererseits kann die Mobilität endosomaler Strukturen, die nicht aktiv über Mikrotubuli und entsprechende Motor-Proteine transportiert werden, gerade durch das Cytoskelett eingeschränkt sein.

Die Interpretation von Ergebnissen, die aus *in vitro* Tests gewonnen wurden, kann jedoch nicht generell für eine bestimmte Methode wie die *in*

*in vitro* Fusion von Endosomen durchgeführt werden, sie müßte eigentlich für jede untersuchte Zelllinie, und für die unterschiedlichen Bedingungen der verschiedenen Versuchsansätze adaptiert werden. In diesem Hinblick muß darauf hingewiesen werden, daß unser *in vitro* System der Fusion von Hepatocyten-Endosomen unter Umständen den *in vivo* Bedingungen näher kommt als viele andere vergleichbare Modellsysteme, da der Verdünnungsfaktor in unserem Test weit niedriger als in den meisten anderen Testsystemen ist, sowohl hinsichtlich der Anzahl der Endosomen pro Volumseinheit, als auch im Hinblick auf die Konzentration cytosolischer Faktoren. Bezogen auf die intakte Zelle war der Verdünnungsfaktor hinsichtlich cytosolischer Proteine in unserem Modell etwa 5 - 12. Unter der Annahme, daß in anderen Zelllinien *in vivo* ebenfalls eine Cytosolkonzentration von ca. 130 mg/ml besteht, würden sich folgende Verdünnungsfaktoren cytosolischer Proteine für die verschiedenen anderen Fusionstests errechnen: bei der Makrophagen-Endosomenfusion ein Faktor von ca. 90 (Diaz et al., 1988); bei der Fusion von CHO-Endosomen ca. 30 - 90 (Braell, 1987), bei der Fusion von HepG2-Endosomen etwa 26 (Pitt & Schwartz, 1991), und bei der Fusion von BHK-Endosomen etwa 16 (Aniento et al., 1993). \_

In unserem System wurde bei der Präparation der Mikrosomen noch eine Konzentrierung der Vesikel durch Aufnahme des Pellets in einem geringeren Volumen (ca. ein Viertel des PNS-Volumens) durchgeführt. Da der postnukleäre Überstand bezogen auf die gesamte Leber etwa vierfach verdünnt ist, kann angenommen werden, daß die Zahl der Endosomen pro Volumseinheit ungefähr so groß ist wie die entsprechende Zahl bezogen auf die ganze Zelle.

Die Konzentration an Vesikel-assoziierten Proteinen war im Hepato-cyten-Ansatz ca. 2 - 4 mg/ml. Im HepG2-Endosomen-System betrug diese Konzentration ca. 1,5 - 2 mg/ml, im Makrophagen-System jedoch nur ungefähr 0,2 mg/ml (Pitt & Schwartz, 1991). Ein ähnlich niedriger Wert dürfte bei der Endosomenfusion von CHO-Zellen eingesetzt worden sein (0,6 - 2,4 mg/ml an PNS, vesikuläres Protein entsprechend weniger; errechnet aus den Angaben von Braell, 1987).

Auch wenn die Zahl der Endosomen/ml in unserem Versuchssystem nahezu die Zahl der Endosomen bezogen auf die ganze Zelle erreicht, kann jedoch die Endosomen-Konzentration bezogen auf die subzellulären Verhältnisse nicht erreicht werden, wenn man annimmt, daß z.B. frühe Endosomen hauptsächlich in einer dünnen Schicht in der Zellperipherie

auftreten, und nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt sind. Frühe (periphere) Endosomen wurden von Wall & Hubbard (1985) als endocytische Kompartimente charakterisiert, die weniger als 1,5 µm von der Zellmembran entfernt sind, vesikuläre oder tubuläre Morphologie aufweisen und kleiner als 200 nm im Durchmesser sind. Wenn man Hepatocyten näherungsweise als kugelförmige Zellen mit einem Durchmesser von 20 µm ansieht, so beträgt das Volumen einer Zelle etwa  $4,19 \times 10^{-12}$  Liter. Mit der Definition von Wall & Hubbard (1985) ergibt sich dann für den peripheren Raum, in dem sich die frühen Endosomen befinden ein Volumen von  $8,74 \times 10^{-13}$  Liter, das wären 20,9% des Zellvolumens. Wenn man von der Anzahl an Endosomen pro Zelle ausgeht, so ist die funktionelle "Konzentration" früher Endosomen im peripheren Raum folglich etwa fünfmal so hoch.

Im Zusammenhang mit dem Vergleich zwischen *in vitro* und *in vivo* Bedingungen muß auch festgestellt werden, daß jede zusätzliche Reinigung der Endosomen durch verschiedene Methoden wie Saccharose-Gradientenzentrifugation oder Immunisolierung zwar rechnerisch die Spezifität bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge erhöht, aber andererseits die experimentellen Bedingungen immer weiter von den *in vivo* Bedingungen entfernt. Es ist z.B. denkbar, daß periphere Membranproteine, die für die Fusion wesentlich sind, bei der Reinigung der Endosomen zum Teil verloren gehen oder inaktiviert werden. Auch die Frage einer potentiellen proteolytischen Schädigung von Endosomen in einer nicht weiter gereinigten PNS-Präparation ist eine ambivalente, da gezeigt werden konnte, daß Endoproteasen bei der Fusion eine physiologische Rolle spielen könnten (Pitt & Schwartz, 1991).

#### **5. 4. 2. Fusionsfähigkeiten verschiedener endocytischer Kompartimente in Hepatocyten**

Einer der Hauptunterschiede zwischen den Fusionseigenschaften von Hepatocyten-Endosomen und den Endosomen anderer Zelllinien, mit denen *in vitro* Fusionstests durchgeführt wurden, besteht darin, daß im Fall der Hepatocyten nicht nur kinetisch frühe Endosomen untereinander fusionieren können, sondern auch frühe Endosomen mit späten Endosomen ohne die Anwesenheit intakter Mikrotubuli. Die Voraussetzungen für die *in vitro* Fusion zwischen frühen und späten Endosomen und die Charakteristika dieses Fusionsprozesses hinsichtlich

Cytosol-Abhängigkeit, Kinetik, Fusionseffizienz und NEM-Inhibierbarkeit waren nicht oder nur kaum von den entsprechenden Parametern der Fusion früher Endosomen unter-einander unterscheidbar. Da in dieser Studie kinetisch differenzierte endocytische Kompartimente untersucht wurden, muß darauf hingewiesen werden, daß bei verschiedenen Zelllinien zum Teil unterschiedliche Definitionen für kinetisch frühe und späte Endosomen verwendet werden. Während in vielen anderen Zelllinien endocytische Kompartimente, die für 5 min bei 37°C markiert werden, noch klar als frühe Endosomen bezeichnet werden, ist dies bei Hepatocyten nicht mehr ganz zulässig. Befunde unserer eigenen Arbeitsgruppe haben ebenso wie die Ergebnisse anderer Gruppen gezeigt, daß in Hepatocyten (in der isoliert perfundierten Leber) endocytisierte Marker nach 5 min bereits zum Teil in späten Endosomen lokalisiert sind. So kann z.B. die Transzytose in die Galle, die bis zu den frühen Endosomen parallel mit der Endocytose abläuft, nicht mehr völlig verhindert werden, wenn 1 min nach der Aufnahme bei 37°C auf 16°C abgekühlt wird, jener Temperatur, bei der die intrazellulären Transportvorgänge nach den frühen Endosomen blockiert sind (Klapper et al., 1992). Die für Hepatocyten gültige Grenze für eine Beladung von frühen Endosomen ist nach einer Aufnahme für 3 min bei 37°C (Fuchs, persönliche Mitteilung). Es dürften aber nicht nur die ersten Schritte der Endocytose in den Hepatocyten schneller verlaufen als in anderen Zelllinien, sondern auch die späteren Stadien. So ist z.B. bei den meisten Zelltypen eine Markierung für 5 min bei 37°C, gefolgt von einer Markerfreien Inkubation für 30 min, die Standardmethode zur Markierung später Endosomen. Unter diesen Bedingungen würden aber in der isoliert perfundierten Leber eindeutig auch Lysosomen zu einem Teil markiert werden. Die Beladung von späten endocytischen Kompartimenten erfolgt in der Leber am besten durch kurze Markierung (1 - 3 min bei 37°C) gefolgt von 10 min Perfusion ohne Marker, da ab 15 min die Markierungssubstanzen bereits in Lysosomen auftreten.

Aus diesen beobachteten Unterschieden kann also geschlossen werden, daß der kinetische Ablauf der Endocytose einigermaßen bekannt sein sollte und entsprechend berücksichtigt werden muß, wenn man verschiedene Zelllinien miteinander vergleichen möchte. Außerdem liegt der Schluß nahe, daß die Endocytose in Hepatocyten anders, oder zumindest schneller abläuft, als in den meisten anderen in dieser Hinsicht

untersuchten Zellarten, was möglicherweise daran liegt, daß bisher primär transformierte Zellen untersucht wurden.

Es wurde jedenfalls eindeutig in allen anderen Zelllinien, bei denen Endosomen-Fusionstests durchgeführt wurden, ein geringeres Fusionssignal beobachtet, wenn sich einer der beiden komplementären Marker in einem kinetisch späteren Endocytose-Kompartiment befand.

So konnte in Fusionstests mit Endosomen aus CHO-Zellen eine Abnahme der Fusionsfähigkeit mit einer Halbwertszeit von 13 min festgestellt werden. Nach einer Marker-freien Inkubation für 20 min bei 37°C lag das Fusionssignal bei 32% des Ausgangswertes. In derselben Zeitspanne wurde jedoch keine Abnahme des Gehalts an intrazellulärem Marker festgestellt, was darauf hinweist, daß die Abnahme des Fusionssignals nicht auf einen proteolytischen Abbau des Markers oder eine Freisetzung aus den Zellen zurückzuführen ist (Braell, 1987). Bei J774-E Makrophagen verursachte eine Marker-freie Inkubation für 10 min bei 37°C eine Reduktion des Fusionssignales um 60%; nach einer Marker-freien Inkubation von 30 min bei 37°C konnte keine Fusion mit frühen Endosomen mehr detektiert werden (Diaz et al., 1988). Eine nahezu identische Kinetik zeigte die Abnahme der Fusionsfähigkeit bei Endosomen von BHK-Zellen (Gruenberg et al., 1989). Dieser Befund wurde von Gruenberg et al. dahingehend interpretiert, daß funktionelle Unterschiede zwischen frühen und späten Endosomen bestehen, die ein Maturationsmodell der Endocytose eher unwahrscheinlich erscheinen lassen, und darauf hindeuten, daß Endosomen präexistierende Kompartimente sind, die durch vesikuläre Transportprozesse miteinander verbunden sind (Vesicle Shuttle-Modell der Endocytose). Diese These wurde durch die Beobachtung unterstützt, daß ein deutlicher struktureller Unterschied zwischen frühen und späten endocytischen Kompartimenten in BHK-Zellen besteht (Emans et al., 1993; Aniento et al., 1993). Die ersten Experimente, die einen signifikanten Unterschied in der Protein-Zusammensetzung zwischen frühen und späten Endosomen aufgezeigt haben, wurden von Schmid et al. (1988) durchgeführt. Die Unterschiede konnten nachgewiesen werden, indem Lactoperoxidase endocytiert wurde, gefolgt von Fraktionierung verschiedener Endosomen-Populationen mittels trägerfreier Elektrophorese und Jodierung der lumenal zugänglichen Proteine mit <sup>125</sup>J unter Verwendung der internalisierten Lactoperoxidase. Eine darauffolgende zweidimensionale



Gelelektrophorese (IEF/SDS-PAGE) zeigte eindeutig unterschiedliche Proteinmuster bei frühen und späten Endosomen.

In Hepatocyten wurde im Gegensatz dazu mit praktisch derselben Methode (unter Verwendung eines Lactoperoxidase-ASOR Konjugats) eine außerordentlich hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen frühen und späten Endosomen gefunden. Bestimmte Proteine wie etwa der Asialoglykoprotein-Rezeptor, der durch Rezyklisierung wieder an die Zelloberfläche gebracht wird, waren jedoch weit häufiger in frühen als in späten Endosomen zu finden (Casciola-Rosen et al., 1992). Dieses Ergebnis wurde von den Autoren als starker Hinweis dafür betrachtet, daß der Übergang von frühen zu späten Endosomen in Hepatocyten ein Maturationsprozeß ist. Die von Casciola-Rosen et al. aufgezeigten hohen strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den beiden kinetisch differenzierten Endosomen-Populationen sind möglicherweise eine Erklärung für das Ergebnis, daß in Hepatocyten frühe Endosomen auch mit späten endocytischen Kompartimenten fusionieren können, und zwar praktisch mit denselben Charakteristika wie bei der Fusion früher Endosomen untereinander.

Ein weiteres aussagekräftiges Argument für diese strukturellen Ähnlichkeiten zwischen frühen und späten Hepatocyten-Endosomen wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Beobachtung geliefert, daß beide Endosomen-Arten in der Lage sind mit Lysosomen zu fusionieren.

Die Ergebnisse, die ein Fusionssignal zwischen frühen Endosomen und Lysosomen zeigen, könnten auch indirekt durch die Fusion zwischen frühen und späten Endosomen begründet sein. Es wäre denkbar, daß in dem Fusionsansatz zuerst frühe Endosomen mit späten Endosomen fusionieren, die ihrerseits anschließend mit Lysosomen verschmelzen. Damit würde jedoch funktionell eine, wenn auch indirekte Fusion zwischen frühen Endosomen und Lysosomen auftreten. Die für die Fusion von frühen Endosomen mit Lysosomen beobachtete Kinetik spricht jedoch gegen die Notwendigkeit dazwischengeschalteter später Endosomen, da keine Verzögerung des Fusionssignales detektierbar ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Endocytose in verschiedenen Zelllinien offensichtlich unterschiedlich ablaufen kann, und daß es kein für alle Zellen gleichermaßen gültiges Modell gibt, das die Internalisierung, Prozessierung und den intrazellulären Transport endocytierter Verbindungen beschreibt.

### **5. 4. 3. Charakteristika der Hepatocyten-Endosomenfusion**

#### **5. 4. 3. 1. Gemeinsamkeiten mit anderen Fusionsprozessen**

Die Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen bei der *in vitro* Rekonstituierung unterschiedlicher Fusionsprozesse haben sowohl für die Fusionen entlang des sekretorischen Weges (zwischen ER und Golgi-Apparat, bzw. zwischen den einzelnen Golgi-Stadien), als auch für die Fusionsvorgänge im frühen Stadium der Endocytose einige gemeinsame Voraussetzungen gezeigt. Alle untersuchten Fusionsprozesse waren abhängig von ATP, Temperatur und der Anwesenheit cytosolischer Proteine. Diese scheinbar allgemein gültigen Voraussetzungen waren auch bei der *in vitro* Fusion von Hepatocyten-Endosomen gegeben.

Ein weitere Gemeinsamkeit unterschiedlichster Fusionen dürfte in ihrer Hemmbarkeit durch die SH-Gruppen alkylierende Verbindung N-Ethylmaleinimid (NEM) liegen. Diese NEM-Sensitivität wurde bei allen bisher untersuchten Fusionsprozessen gefunden. In unserem System war eine NEM-Sensitivität ebenfalls gegeben, und zwar sowohl für die Fusion zwischen Hepatocyten-Endosomen, als auch für die Endosomen-Lysosomen Fusion. Ein Unterschied zu den anderen Fusionsphänomenen konnte allerdings für die Lokalisation der NEM-Sensitivität festgestellt werden (siehe Punkt 4. 4. 2. 6. und 5. 4. 3. 2. 5. der Diskussion).

#### **5. 4. 3. 2. Unterschiede zu anderen Fusionsprozessen**

##### **5. 4. 3. 2. 1. Kinetik der Fusion**

Die Kinetik der Fusion von Hepatocyten-Endosomen schien von den meisten anderen publizierten Befunden abzuweichen. So war das Plateau des Fusionsignales bereits nach etwa 10 min erreicht, während dies bei Endosomen aus Makrophagen, BHK-Zellen und *Dictyostelium discoideum* erst nach etwa 30 min der Fall war (Diaz et al., 1988; Gruenberg et al., 1989; Lenhard et al., 1992 a).

Für die Fusion von Endosomen aus CHO-Zellen wurde ein linearer Anstieg des Fusionsignales bis 30 min und das Erreichen eines Plateaus nach 60 min beschrieben (Braell, 1987).

Eine Fusionskinetik, die der Hepatocyten-Endosomenfusion ähnlich ist, wurde für die Endosomen der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 festgestellt. Dieser Fusionsprozeß war ebenfalls sehr rasch abgeschlossen; das Plateau des Fusionsignales wurde bereits nach etwa 7 min erreicht (Pitt & Schwartz, 1991). Die Autoren dieser Arbeit führten eine höhere Zahl von Endosomen pro Volumseinheit als mögliche Ursache für die beobachtete schnellere Fusionskinetik an. In ihrem Fusionsansatz war die Konzentration vesikulärer Proteine 1,5 - 2 mg/ml, während bei der Makrophagen-Endosomenfusion nur ungefähr 0,2 mg/ml an vesikulärem Protein vorlagen. In unserem Modellsystem war die Konzentration vesikulärer Proteine ca. 2 - 4 mg/ml, also ebenfalls sehr hoch. Die These, daß eine höhere Endosomen-Konzentration aufgrund einer größeren Häufigkeit von Interaktionen zwischen Endosomen zu einer schnelleren Kinetik des Prozesses führt, ist jedoch nicht in Einklang mit den Ergebnissen von Braell (1987), der nachweisen konnte, daß eine Verdünnung des Ansatzes nur zu einer Reduktion des Fusionsignales, nicht jedoch zu einem späteren Erreichen des Plateaus führt. Das Auftreten einer Plateau-Phase wird vom Autor mit einer Inaktivierung von für die Fusion notwendigen Faktoren erklärt.

Bei unterschiedlichen Versuchsansätzen, bzw. verschiedenen Zelllinien könnte diese Inaktivierung von Fusionsfaktoren mit unterschiedlicher Kinetik erfolgen. Eine weitere mögliche Ursache für einen Unterschied in der Fusionskinetik könnte natürlich auch ein abweichender Fusionsmechanismus sein.

So wäre es z.B. auch möglich, daß bei Hepatocyten Avidin- und Biotin-ASOR-beladene Endosomen bereits bei 0°C also vor dem eigentlichen Fusionstest einander binden können. Die Möglichkeit, daß der Andockmechanismus bereits bei 0°C abläuft, ist vor allem dann denkbar, wenn unter den gegebenen Bedingungen die dazu notwendigen Proteine bereits an die Membran assoziiert sind. Unter diesen Umständen würde die Erwärmung auf 37°C den Fusionsprozeß sofort in Gang setzen, und eine schnellere Kinetik wäre die Folge. Die bei den Ergebnissen beschriebene Lokalisation des NEM-Effektes auf die Membran der Endosomen könnte dafür ein Indiz sein.

Die Tatsache, daß für die Fusion zwischen frühen und späten Endosomen dieselbe Kinetik wie für die Fusion früher Endosomen untereinander registriert wurde, spricht für eine strukturelle Ähnlichkeit dieser beiden Endosomen-Populationen in Hepatocyten.

#### **5. 4. 3. 2. 2. Fusionseffizienz**

Die Fusionseffizienz, also das Ausmaß des Fusionssignales in Prozent des maximalen Signales war in unserem System deutlich vom Cytosol-Gehalt im Fusionsansatz abhängig. Es konnte eine Fusionseffizienz von ungefähr 60 - 70% bezogen auf intravesikulären Marker erreicht werden (bei 25 mg/ml Cytosol), und zwar sowohl für die Fusion früher Endosomen, als auch für die zwischen frühen und späten Endosomen. Dieser Wert entspricht etwa den Angaben von Gruenberg et al. (1989) für die Fusion früher Endosomen aus BHK-Zellen, während für Makrophagen-Endosomen eine Effizienz von 25 - 35% (bezogen auf latenten Marker: 35 - 50%, Diaz et al., 1988), für *Dityostelium discoideum* ein Wert von 30 - 35% (Lenhard et al., 1992 a) und für CHO-Zellen eine Effizienz bezogen auf intravesikulären Marker von nur etwa 12% (Braell, 1987) angegeben wurde. Für die Hepatom-Zelllinie HepG2 wurde eine Fusionseffizienz von 20% bei einer Cytosol-Konzentration von 5 mg/ml angeführt (Pitt & Schwartz, 1991). Dieser Wert war in etwa vergleichbar mit der Effizienz in unserem System bei gleicher Cytosol-Konzentration.

Die errechnete Fusionseffizienz darf jedoch nicht also absoluter, zwischen verschiedenen Versuchsanordnungen vergleichbarer Wert betrachtet werden. Sie ist von vielen unterschiedlichen, teilweise nicht genau kontrollierbaren Parametern abhängig; so z.B. von den Beladungsbedingungen, der Zahl von Marker-Molekülen pro Endosom, oder dem Verhältnis von Avidin-Molekülen zu Biotin-Molekülen im Test. Es ist z.B. denkbar, daß eine Präparation, die absolut gesehen gleich viel BASOR pro  $\mu\text{l}$  der Membransuspension enthält wie eine andere Präparation eine deutlich höhere Fusionseffizienz liefert wie diese, nur weil die Zahl der BASOR-Moleküle pro Endosom höher ist, und somit die gleiche Zahl von Fusionsereignissen mehr Reaktionsprodukt und somit ein größeres Signal und eine höhere theoretische Fusionseffizienz verursacht. Ebenso zu berücksichtigen wäre, daß bei verschiedenen BASOR-Präparationen eine unterschiedliche Zahl von Biotingruppen pro

BASOR-Molekül vorliegen kann. Ein weiterer Faktor der zur Verfälschung der errechneten Fusionseffizienz führen kann ist das Verhältnis Avidin zu Biotin, bzw. Avidin zu BASOR. Eine zu geringe Zugabe von Avidin-markierten Endosomen würde etwa zu einer Sättigung der Biotin-Bindungsstellen und zu einem reduzierten Fusionsignal führen. Eine ähnliche Verringerung des Signals würde entstehen, wenn ein Avidin-Molekül zwei Biotinreste bindet, wobei es unerheblich wäre, ob diese Biotinreste zu demselben oder zu unterschiedlichen BASOR-Molekülen gehören. Aufgrund dieser Überlegungen wurde so weit als möglich versucht Avidin im Überschuß zum Fusionsansatz zuzugeben.

#### **5. 4. 3. 2. 3. Cytosol-Abhängigkeit der Fusion**

Die Cytosol-Abhängigkeit der *in vitro* Fusion von Hepatocyten-Endosomen, war höher als für die meisten anderen Zelllinien beschrieben wurde.

Bis zur höchsten eingesetzten Cytosolkonzentration von 25 mg/ml konnte eine Erhöhung des Fusionsignales gemessen werden. Im Gegensatz zu den meisten anderen experimentellen Modellen waren also in unserem System cytosolische Faktoren limitierend. Da jedoch in der intakten Zelle noch eine weit höhere Konzentration an cytosolischen Proteinen vorliegt (bei Hepatocyten im Bereich von 130 mg/ml) ist es durchaus möglich oder sogar wahrscheinlich, daß die Cytosolkonzentration *in vivo* nicht limitierend ist.

Für die Makrophagen-Zelllinie J774-E wurde das Fusionsmaximum bereits bei 0,5 - 1 mg/ml Protein gefunden (Mayorga et al., 1989; Colombo et al., 1992 a), bei Endosomen aus CHO-Zellen wurde ein Plateau bei 1,5 mg/ml erreicht (Braell, 1987), für den amöbenartigen Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* lag das Fusionsmaximum bei 1 - 3 mg/ml Protein (Lenhard et al., 1992 a).

Bei Endosomen aus BHK-Zellen wurde jedoch eine Zunahme des Fusionsignals bis zu einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml beschrieben (Gorvel et al., 1991). Eine ähnliche Cytosol-Abhängigkeit ist auch bei der Hepatom-Zelllinie Hep-G2 gegeben; hier wurde ein linearer Anstieg der Fusion bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von 7 mg/ml Protein gemessen (Pitt & Schwartz, 1991). Bei dieser Arbeit wurde jedoch festgestellt, daß nur Cytosol-Präparationen aus Zellkulturen, nicht

aber aus frischem Gewebe, die Fusion unterstützten. Dies steht scheinbar im Widerspruch zu meinen Ergebnissen mit Cytosol, das aus isoliert perfundierter Leber gewonnen wurde. Eine mögliche Erklärung der Autoren für diesen Befund ist, daß das im normalen frischen Gewebe enthaltene Blut fusionsinhibierende Faktoren enthält, die bei der Perfusion ausgewaschen werden, und somit nicht mehr in die Cytosol-Präparation gelangen.

In unserem Fusionssystem war nicht nur Cytosol verwendbar, das in KAcSHM-Puffer präpariert worden war, sondern auch eine Präparation in 0,25 mol/l Saccharose/Hepes. Dies steht ebenfalls im Gegensatz zu den Befunden von Pitt & Schwartz, bei denen die Fusion in KCl/Hepes-Puffer durchgeführt wurde, und eine Cytosol-Präparation in 0,25 mol/l Saccharose die Fusion nicht unterstützte.

#### **5. 4. 3. 2. 4. Unabhängigkeit der Endosomenfusion vom Puffersystem**

In der vorliegenden Arbeit wurde eine auffallende Unabhängigkeit der Hepatocyten-Endosomenfusion vom verwendeten Puffersystem festgestellt. Bei vier verschiedenen Puffern (Kaliumacetat-Saccharose-Hepes, KCl-Saccharose-Hepes, KCl-Hepes und Saccharose-Hepes-Puffer) konnte kein signifikanter Unterschied in der Fusionseffizienz detektiert werden. Es muß jedoch festgestellt werden, daß natürlich durch die intrazellulären Ionen ein gewisser Anteil dieser Salze im Fusionspuffer gegeben ist. In vielen anderen Studien, bei denen eine Endosomenfusion untersucht wurde, wurde die Anwesenheit von Ionen als Voraussetzung für die Fusion beschrieben (Gruenberg & Howell, 1989. So wurde etwa für Endosomen aus CHO-Zellen ein Optimum bei 100 mmol/l KCl angegeben, und es konnten nur mehr 20% des ursprünglichen Fusionssignales in Gegenwart von 25 mmol/l KCl erreicht werden (Braell, 1987). Eine etwas niedrigere Ionen-Abhängigkeit dürfte bei Makrophagen-Endosomen vorliegen. Im Makrophagen-System war eine KCl-Konzentration von 50 mmol/l ausreichend, und KCl konnte durch die gleiche Konzentration an NaCl oder Kalium-Glukonat ohne Verlust von

Fusionssignal substituiert werden. Es fand jedoch keine Fusion in reinem Saccharose-Puffer statt (Diaz et al., 1988).

Im Gegensatz dazu stehen die Resultate der Endosomenfusion von *Dictyostelium discoideum*. Dabei wurde eine niedrige Ionenstärke als Voraussetzung für eine effiziente Fusion beobachtet. Ein optimales Fusionssignal wurde zwischen 0 und 25 mmol/l KCl gemessen, bei 50 mmol/l KCl war das Signal nur mehr 50% der Kontrolle und bei 100 mmol/l KCl konnte keine Fusion mehr detektiert werden. Ein ähnliche Abnahme des Fusionssignals trat bei steigenden Konzentrationen an NaCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf (Lenhard et al., 1992 a). Die Interaktion zwischen Hepatocyten-Endosomen und Lysosomen, die von Mullock et al. (1989) beschrieben wurde, und die in Folge als Fusionsprozeß dargestellt wurde (Mullock & Luzio, 1992), fanden ebenfalls in reinem Saccharose-Puffer ohne Salze statt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Ionen-Abhängigkeit der Fusionsvorgänge zeigen, daß dieser Faktor offensichtlich von der entsprechenden Zelllinie abhängig ist. Aufgrund von Unterschieden in der Ionen-Zusammensetzung des Cytosols verschiedener Zellarten erscheint es plausibel, daß auch die Fusionsprozesse, die in diesen Zellen stattfinden, nur unter den entsprechenden physiologischen Bedingungen optimal ablaufen. So könnte z.B. die Konfiguration von cytosolischen Proteinen oder Membranproteinen, die für eine Fusion essentiell sind, bei bestimmten Ionenbedingungen so verändert sein, daß ihre Funktion eingeschränkt ist.

#### **5. 4. 3. 2. 5. Lokalisation der NEM-Sensitivität**

Ebenso wie bei anderen Arbeiten konnte in dieser Studie eine Hemmbarkeit der Fusion durch das SH-Gruppen alkylierende Reagens N-Ethylmaleinimid beobachtet werden. Bei den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen war die NEM-Sensitivität hauptsächlich im Cytosol lokalisiert. Eine Zugabe von unbehandeltem Cytosol (1,5 mg/ml) zu NEM-behandelten postnukleären Überständen regenerierte die Fusionsfähigkeit von CHO-Endosomen nahezu vollständig (Braell, 1987); bei Endosomen der Hepatom-Zelllinie HepG2 konnte durch eine Cytosol-Zugabe von 0,5 mg/ml eine 70-prozentige Regenerierung der Fusion erreicht werden, wobei kein Unterschied in der restorativen Wirkung

zwischen HepG2- und J774-Cytosol festgestellt werden konnte (Pitt & Schwartz, 1991). Diese Studien zeigten also nicht nur, daß in den untersuchten Zelllinien die NEM-Sensitivität im Cytosol lag, sondern auch daß die NEM-sensitiven Faktoren wahrscheinlich nicht Spezies-, Gewebe-, oder Kompartiment-spezifisch sind.

Da auch beim vesikulären Transport zwischen den einzelnen Stufen des Golgi-Apparates eine Hemmung durch NEM gefunden wurde, und der dafür verantwortliche Faktor (NEM-sensitive factor, NSF) identifiziert werden konnte (Wilson et al., 1989), wurde die Rolle dieses Faktors bei der Endosomenfusion untersucht. Es konnte bewiesen werden, daß dieser Faktor auch bei der Endosomenfusion eine wesentliche Funktion hat.

Eine Blockierung von NSF durch einen monoklonalen IgM-Antikörper konnte die restorative Wirkung von Cytosol bei der Fusion NEM-behandelter J774-Endosomen-Präparationen fast vollständig eliminieren. Die Zugabe von reinem NSF zu NEM-inaktivierten postnukleären Überständen konnte die Fusionsaktivität zu 65% wieder herstellen (Diaz et al., 1989 b). Da auch der vesikuläre Transport zwischen ER und Golgi von NSF abhängt (Beckers et al., 1989) wurde geschlossen, daß für verschiedene intrazelluläre Fusionsphänomene ein gemeinsamer Mechanismus existiert, bei dem NSF von Bedeutung ist. Die Charakterisierung der Endosomenfusion humaner K562-Zellen, bei der ebenfalls eine im Cytosol lokalisierte NEM-Sensitivität gefunden wurde, ergab jedoch, daß die durch NEM verursachte Hemmung nicht auf NSF allein zurückgeführt werden kann (Wessling-Resnick & Braell, 1990 b). Nach einer Inkubation von dialysiertem Cytosol unter Bedingungen, die NSF rasch inaktivieren (bei 37°C in Abwesenheit von ATP), blieb dessen fusionsregenerierende Wirkung trotzdem erhalten. Außerdem konnte ein Überschuß an Anti-NSF Antikörper die Fusion nur um 25% reduzieren (Wessling-Resnick & Braell, 1990). Die Hemmung der Fusion durch NEM erfolgte also nicht nur aufgrund einer Inaktivierung von NSF und es erschien als wahrscheinlich, daß auch andere Proteine, bei denen funktionelle SH-Gruppen durch NEM alkyliert werden, im Fusionsprozeß von Bedeutung sind. Ein sehr ähnliches Verhalten wurde auch für den vesikulären Transport von Endosomen zum trans-Golgi Retikulum beschrieben, bei dem eine von NSF unabhängige NEM-Hemmbarkeit nachgewiesen werden konnte (Goda & Pfeffer, 1991).

Bei Untersuchungen, die zum Ziel hatten, die Lokalisation der NEM-Sensitivität der Endosomenfusion genauer zu charakterisieren, wurde



herausgefunden, daß diese zumindest bei der untersuchten Zelllinie (J774-Makrophagen) nicht ausschließlich im Cytosol lag (Diaz et al., 1988). Eine NEM-Behandlung sowohl des Cytosols, als auch der Vesikel reduzierte das Fusionsignal auf 8% der Kontrolle, eine NEM-Behandlung von Cytosol allein führte zu einem Restfusionsignal von 23%, während eine Inkubation der Vesikel mit NEM das Fusionsignal nur auf 84% verringerte. Daraus konnte geschlossen werden, daß zwar der Hauptteil der NEM-Sensitivität im Cytosol lokalisiert ist, ein Teil jedoch auch auf den Membranen.

Diese Erscheinung könnte bedeuten, daß die entsprechenden Proteine zwischen einem cytosolischen und einem Membran-assoziierten Zustand wechseln, daß sie sich jedoch im Gleichgewichtszustand hauptsächlich im Cytosol befinden.

Meine Studien im Hepatocyten-System zeigten die umgekehrte Relation. Eine NEM-Behandlung beider Membran-Präparationen führte zu einer fast vollständigen Hemmung der Fusion, während eine Inkubation des Cytosols mit NEM nur einen geringen Effekt hatte. Dieses Verhalten trat sowohl bei der Fusion früher Endosomen, als auch bei der Fusion zwischen frühen und späten Endosomen auf.

Es wäre denkbar, daß im Fall der Hepatocyten-Endosomen die NEM-inaktivierbaren Fusionsfaktoren (NSF, ev. andere Proteine) gemeinsam mit Kofaktoren bereits an einen Rezeptor der endosomalen Membran assoziiert sind, und nicht wie in anderen Zelltypen aus dem Cytosol rekrutiert werden müssen. In diesem Fall sind die in unserem System mit NEM erhaltenen Ergebnisse gut in Übereinstimmung mit dem Modell eines Fusionskomplexes aus Donor-Membran, Akzeptor-Membran, spezifischer (GTP-abhängiger) Andock-Stelle, NSF, SNAP und NSF-Rezeptor, wie es aus Ergebnissen mit Golgi-Fusionen erarbeitet und als Postulat auf andere Fusionsprozesse übertragen wurde (Wilschut, 1989; Wilson et al. 1991).

#### **5. 4. 3. 2. 6. Einfluß von Nigericin, Ammoniumchlorid und Benzylamin**

In der Anfangsphase der Untersuchung der Endosomenfusion *in vitro* erschien es möglich, daß das in Endosomen beobachtete saure Milieu eine Voraussetzung für eine effiziente Fusion ist. Dies hat sich in den verschiedenen Studien nicht bestätigt. Es wurde gezeigt, daß schwache

Basen, wie Chloroquin oder Ammoniumchlorid, die in ihrer undissoziierten Form durch die Endosomen-Membran diffundieren können, und das saure Milieu dort abpuffern, die Fusion von CHO-Endosomen nicht hemmen (Braell, 1987). Der intravesikulär niedrigere pH-Wert war also keine Voraussetzung für die Fusion. In der gleichen Studie konnte kein Einfluß der beiden Ionophoren Monensin und CCCP festgestellt werden. Diaz et al. (1988) berichteten für die Fusion von J774-Makrophagen-Endosomen ebenfalls keinen signifikanten Effekt der Ionophoren CCCP, Nigericin und Valinomycin. In Gegenwart von 10 mmol/l NH<sub>4</sub>Cl war das Fusionssignal 10% über dem Kontrollwert.

In unserem System wurde durch Ammoniumchlorid ebenfalls eine leichte, wenngleich auch statistisch nicht klar signifikante Erhöhung des Fusionssignals, induziert. Nigericin führte jedoch in einer Konzentration von 2 µmol/l zu einer deutlichen Erhöhung des Signals. Dieser Effekt könnte bedeuten, daß Ionen-Gradienten der Endosomen-Membranen, die von Nigericin abgebaut werden, normalerweise die Fusion hemmen. Da jedoch bei Proben, die unter Fusionsbedingungen in Gegenwart von Nigericin bei 37°C vorinkubiert wurden (siehe .....) im Vergleich zu vorinkubierten Kontrollproben ein signifikantes Restfusionssignal beobachtet wurde, und der Vorinkubationseffekt aller Wahrscheinlichkeit nach auf Fusionsvorgänge zurückzuführen ist, ist es möglich, daß Nigericin die Fusion unspezifisch stimuliert.

#### **5. 4. 3. 2. 7. Unabhängigkeit der Fusion zwischen frühen und späten endocytischen Kompartimenten von intakten Mikrotubuli**

In den bereits angeführten Arbeiten über die *in vitro* Fusion von Endosomen nahm das Fusionssignal früher Endosomen mit zunehmender Dauer der Marker-freien Inkubation bei der Beladung der zweiten Endosomen-Population deutlich ab (Braell, 1987; Diaz et al., 1988; Gruenberg et al., 1989). Diese Befunde wurden dahingehend interpretiert, daß frühe Endosomen nicht in der Lage sind mit späten Endosomen zu fusionieren. Bei der Untersuchung der Fusionsprozesse zwischen apikal und basolateral markierten Endosomen aus MDCK-Zellen wurde dann ebenfalls nachgewiesen, daß nur frühe apikale Endosomen bzw. nur frühe basolaterale Endosomen untereinander fusionieren, nicht aber frühe apikale mit frühen basolateralen. Wenn jedoch apikale und basolaterale

Carrier-Vesikel, die als Intermediat zwischen frühen und späten Endosomen anzusehen sind, in Gegenwart polymerisierter Mikrotubuli inkubiert wurden, so konnte eine Fusion detektiert werden (Bomsel et al., 1990). Bei der Interpretation dieses Befundes wurde darauf hingewiesen, daß das zwischen den Carrier-Vesikel beobachtete Fusionsignal auch auf eine Mikrotubuli-abhängige Fusion der Carrier-Vesikel mit späten Endosomen und eine darauffolgende Fusion der späten Endosomen untereinander zurückgeführt werden könnte. Bei vergleichbaren Studien in unpolarisierten Zellen (BHK-Zellen) wurde analog dazu eine durch intakte Mikrotubuli stimulierte Fusion zwischen frühen Carrier-Vesikel und späten Endosomen beschrieben (Aniento et al., 1993). Späte Endosomen konnten untereinander ohne Einfluß von Mikrotubuli fusionieren, ebenso wie frühe Endosomen. Daraus wurde geschlossen, daß der Fusionsprozeß zwischen kinetisch frühen und späten endocytischen Kompartimenten von Mikrotubuli abhängt, so wie auch *in vivo* eine Mikrotubuli-Abhängigkeit des Transportes von frühen (morphologisch peripheren) Phasen der Endocytose zu den späten Stadien gegeben ist. In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß gerade in BHK-Zellen ein Unterschied in der Protein-Zusammensetzung zwischen frühen Endosomen, frühen Carrier-Vesikel und späten Endosomen gezeigt wurde (Aniento et al., 1993; Emans et al., 1993). In Hepatocyten war ein vergleichbarer struktureller Unterschied nicht nachweisbar.

Aus dieser Beobachtung erscheint es auch möglich, daß frühe Endosomen in Hepatocyten ohne die Anwesenheit polymerisierter Mikrotubuli mit späten Endosomen fusionieren können, wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Auch wenn der Transport endocytischer Kompartimente *in vivo* von der Zellperipherie in den perikanalikulären Raum die Anwesenheit von Mikrotubuli erfordert, muß die Fusion zwischen frühen und späten Endosomen nicht Mikrotubuli-abhängig sein, vor allem, wenn diese Kompartimente eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen.

#### **5. 4. 3. 2. 8. Erhöhung der Endosomen-Dichte während der Fusion**

In dieser Arbeit konnte eine Erhöhung der Dichte früher Endosomen in Folge der *in vitro* Fusion nachgewiesen werden, indem die Position des Avidin-Biotin-Fusionsproduktes auf einem Percoll-Gradienten ermittelt

wurde. Da sogar die Dichte von Lysosomen erreicht wurde, ist dieses Ergebnis ein Hinweis dafür, daß die beladenen frühen Endosomen mit Lysosomen fusionieren, möglicherweise indirekt über eine Fusion mit späten Endosomen als Zwischenstufe. Eine Alternative wäre, daß es im Verlauf der Fusionsinkubation zu einer von der Fusion unabhängigen Änderung der endosomalen Dichte-Eigenschaften kommt, wie es bei einem Maturationsprozeß denkbar wäre. Eigene Versuche in Zusammenarbeit mit Prof. Murphy, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, bei denen die Dichte-Erhöhung von Endosomen in verschiedenen Puffern ohne Cytosol untersucht wurde, haben jedoch gezeigt, daß eine Inkubation in KAcSH-Puffer wie er für die Fusionstests verwendet wurde, keine Dichte-Erhöhung induzierte (Murphy et al., 1993). Deshalb dürfte die Erklärung der endosomalen Dichte-Erhöhung aufgrund von Fusionen mit dichteren Endosomen und Lysosomen eher zutreffen, auch wenn theoretisch ein Maturationsprozeß, der nur in Gegenwart von Cytosol, also unter Fusionsbedingungen, abläuft, ebenso dafür verantwortlich sein könnte.

Bis zur maximalen Inkubationsdauer von 90 min konnte eine Zunahme des Anteils an Fusionsprodukt im dichten Bereich des Gradienten gemessen werden. Nachdem jedoch sowohl die Endosomenfusion, als auch die Endosomen-Lysosomen-Fusion hinsichtlich der Bildung des Avidin-Biotin-Fusionsproduktes, also hinsichtlich der Mischung ihrer Inhalte, eine rasche Kinetik mit einer Plateau-Phase nach etwa 10 min aufwiesen, scheint es wahrscheinlich zu sein, daß die Einstellung der lysosomalen Dichte nach einer Endosomen-Lysosomen-Fusion im *in vitro* System einige Zeit in Anspruch nimmt. Es wäre möglich, daß die Fusion zwischen leichten Endosomen und dichten Lysosomen zuerst zu einem Kompartiment intermediärer Dichte führt, das erst in der Folge durch einen von der Fusion unabhängigen Prozeß eine typisch lysosomale Dichte einnimmt.

Eine vergleichbare Dichte-Erhöhung wurde zwar für späte Endosomen, die mit Lysosomen inkubiert wurden, beschrieben (Mullock et al., 1989), nicht aber für frühe Endosomen im Verlauf ihrer *in vitro* Fusion. Die Ergebnisse von Diaz et al. (1989 a) zeigten vielmehr, daß das Fusionsprodukt in einem leichten Bereich des Percoll-Gradienten bei etwa 1,045 g/ml blieb.

Die Interpretation der Autoren dafür war, daß ihr *in vitro* System den intrazellulären Vorgang, bei dem es zu einer Dichte-Erhöhung der

endocytischen Kompartimente kommt, nicht vollständig rekonstituieren konnte. Der wahrscheinliche Grund dafür ist die Tatsache, daß in dem Modellsystem der J774-Makrophagen, die für diese Studien eingesetzt wurden, frühe endocytische Kompartimente nicht mit späten fusionieren können (Diaz et al., 1988).

#### **5. 4. 3. 2. 9. Verlust der Fusionsfähigkeit durch Vorinkubation**

Es war mein Ziel zu untersuchen, ob im Hepatocyten-System während der *in vitro* Fusion der Endosomen auch andere Prozesse analog zu den Endocytose-Vorgängen *in vivo* ablaufen.

Da in der intakten Zelle neben den Fusionsprozessen auch vielfältige andere Erscheinungen auftreten, wäre es durchaus möglich, daß ein Teil dieser Phänomene auch *in vitro* abläuft. Neben der Erhöhung der endosomalen Dichte, zählen dazu auch Änderungen des sauren Milieus der Endosomen, sowie Segregationsprozesse, bei denen kolokalisierende Verbindungen in unterschiedliche Kompartimente sortiert werden.

So wurde etwa in einer Arbeit von Wessling-Resnick & Braell (1990 a) festgestellt, daß eine Präinkubation von PNS in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems zu einer Hemmung der Endosomenfusion führt, indem der entsprechende Marker (Biotin-Transferrin oder Avidin- $\beta$ -Galaktosidase) in ein nicht mehr fusogenes Kompartiment (rezyklisierende Endosomen bzw. späte Endosomen) segregiert wird. Andererseits wurde von einer anderen Arbeitsgruppe auch beobachtet, daß eine Dichte-Erhöhung von Makrophagen-Endosomen mit einer Abnahme der Fusionsfähigkeit einhergeht (Diaz et al., 1991). Dieselbe Gruppe berichtete auch eine Abnahme der Fusionsfähigkeit der Endosomen durch eine Vorinkubation bei 37°C, und stellte dabei fest, daß Fusionsprozesse zwischen den vorinkubierten Endosomen ablaufen (Diaz et al., 1989 a).

Auch in dem hier beschriebenen Hepatocyten-System stellte sich heraus, daß die Vorinkubation einer der beiden Hepatocyten-Membranpräparationen in Gegenwart von ATP bei 37°C das Fusionssignal reduziert. Es war nun herauszufinden, ob eine Maturation der Endosomen für diesen Verlust der Fusionsfähigkeit verantwortlich ist, oder eine

Ausschleusung des Markers aus dem fusionsfähigen Kompartiment in Vesikel, die nicht mehr mit den komplementär beladenen Endosomen fusionieren können (Segregation). Die dritte prinzipielle Möglichkeit war, daß es bei der Vorinkubation zu Fusionen der gleichartig beladenen Endosomen und in der Folge zu einer Verzehrung von Fusionsfaktoren kommt, sodaß keine detektierbare Fusion mit dem zweiten Marker mehr auftreten kann.

Die im Lauf dieser Arbeit erzielten Ergebnisse über die Fusion zwischen frühen und späten Endosomen, sowie das zwischen frühen Endosomen und Lysosomen beobachtete Fusionssignal, sprechen jedenfalls gegen die Möglichkeit, daß eine Maturation, also eine Reifung der Endosomen zu einem nicht-fusogenen Kompartiment, die Ursache für die Abnahme der Fusionsfähigkeit durch die Vorinkubation darstellt. Ein weiterer Hinweis gegen diese Hypothese war der Befund, daß eine Vorinkubation in Gegenwart von Ammoniumchlorid zum gleichen Fusionsverlust führt wie bei der Kontrolle, also daß auch eine Blockierung der progressiven Azidifizierung der Endosomen, die als Teilbereich oder sogar Voraussetzung der Maturation angesehen wird, keinen Effekt zeigt.

Ebensowenig war ein Einfluß intakter Mikrotubuli (nach Polymerisierung in Gegenwart von Taxol) bemerkbar. Der Vorinkubationseffekt wird also von Mikrotubuli weder gehemmt noch stimuliert.

Bei Vorinkubationstests in verschiedenen Puffern hat sich herausgestellt, daß nur in Gegenwart des Fusionspuffers eine rasche Eliminierung der Fusionsfähigkeit auftritt, nicht jedoch bei einer Präinkubation der Membran-Präparationen alleine. Nachdem die Kinetik des Verlusts an Fusionsfähigkeit durch die Vorinkubation ident war mit der Fusionskinetik selbst, lag der Schluß nahe, daß es sich beim Vorinkubationseffekt um einen mit der Fusion verbundenen Prozeß handeln könnte. Ein Verlust der Fusionsfähigkeit durch eine rein physikalische Schädigung der Endosomen schien unwahrscheinlich, da sich die Latenz des Markers während der Vorinkubation nicht wesentlich änderte.

Die Hypothese, daß es während der Vorinkubation zu Fusionserscheinungen kommt, die durch einen Verbrauch an Fusionsfaktoren zu einer Hemmung der nachfolgenden detektierbaren Fusion führen, schien somit am wahrscheinlichsten zu sein. Der nächste Schritt war der Versuch die Faktoren, die bei der Vorinkubation verbraucht werden, zu charakterisieren und wenn möglich zu

identifizieren. Eine Zugabe von frischem Cytosol nach der Vorinkubation führte zu keiner Regenerierung der Fusionsfähigkeit, dafür aber die Zugabe einer Präparation peripherer Membranproteine. Das heißt, daß es während der Vorinkubation zu einem Verbrauch oder einer Inaktivierung von Proteinen kommt, die im Gleichgewichtszustand nicht im Cytosol, sondern an Membranen assoziiert auftreten. In diesem Zusammenhang muß auch darauf hingewiesen werden, daß gerade die Wiederherstellung der durch die Vorinkubation verlorengegangenen Fusionsfähigkeit dem Testsystem eine höhere Aussagekraft verleiht, als wenn die Interpretation der Ergebnisse nur aufgrund eines Verlusts an Fusionsignal erfolgte. Durch die Reversibilität des Vorinkubationseffektes wird eindeutig gezeigt, daß es sich bei diesem Effekt um einen spezifischen Vorgang handelt, und nicht bloß um eine temperaturabhängige Schädigung der Endosomen.

Die nähere Charakterisierung der peripheren Membranprotein-Präparation zeigte, daß sie eindeutig empfindlich gegen NEM-Behandlung ist und auch in einem intermediären Ausmaß gegen  $GTP\gamma S$ . Die NEM-Sensitivität der für die Fusion essentiellen peripheren Membranproteine ist auch in Übereinstimmung mit dem Ergebnis, daß bei der Hepatocyten-Endosomenfusion die Empfindlichkeit gegen NEM hauptsächlich die Membranen betrifft. Es ist aber durchaus denkbar, daß dabei nicht nur bereits an die Membran assoziierter NSF betroffen ist, sondern auch andere Proteine. Die partielle Sensitivität gegen  $GTP\gamma S$ -Behandlung könnte bedeuten, daß der gesamte Komplex aus GTP-bindenden Proteinen, der davon abhängigen Andockstelle an der Endosomen-Membran, NSF, SNAP und NSF-Rezeptor durch die Vorinkubation inaktiviert wird (Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob dieser für den Golgi-Apparat charakterisierte Fusionskomplex in ähnlicher Form auch bei Endosomen manifestiert ist.) Die SDS-PAGE-Analyse der Präparation peripherer Membranproteine zeigte zwei Hauptbanden bei etwa 38 kDa und 48 kDa, sowie zahlreiche größere und kleinere Proteine. Interessanterweise zeigten beide Hauptproteine das gleiche Molekulargewicht wie zwei periphere Membranproteine, die als Hauptkomponenten fusogener Endosomen in BHK-Zellen identifiziert wurden (Emans et al., 1993). Bei dieser Arbeit wurde untersucht welche Proteine nach einer Ultraschall-Fragmentierung von Endosomen durch Fusion auf Akzeptor-Endosomen übertragen werden können. Nach der Ultraschall-Fragmentierung wurden nur 5 Proteine mit hoher Effizienz

übertragen, davon waren zwei Membranproteine und drei periphere Membranproteine mit jeweils 48 kDa, 38 kDa und 14 kDa. Das 38 kDa-Protein wurde als Annexin II identifiziert.

Annexin II ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, das bereits bei sehr niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen fest an Membranen gebunden ist und vor allem durch die p60<sup>src</sup>-Kinase phosphoryliert werden kann (Glenney, 1987; Gerke, 1989), die an endosomalen Membranen lokalisiert wurde (Kaplan et al., 1992). Es hat sich herausgestellt, daß Annexin II die Aggregation und Fusion von Phospholipid-Vesikeln mit Chromaffin Granula verursacht (Blackwood & Ernst, 1990). Von Emans et al. (1993) wurde deshalb diskutiert, daß Annexin II an der Bildung von Interaktionen zwischen endosomalen Membranen beteiligt sein könnte. Die Gruppe der Annexine besteht aus mindestens 13 Proteinen mit einer hoch konservierten Wiederholungssequenz, die bei den kleineren Annexinen (35 - 38 kDa) viermal, und beim ~65 kDa Annexin achtmal vorkommt, und für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung verantwortlich zu sein scheint. Annexin VI scheint eine Rolle bei der Abschnürung von Clathrin-umhüllten Vesikeln zu spielen (möglicherweise beim Schließen des Vesikel-Halses); Annexin I, dürfte eine Funktion bei der Bildung der Membraneinschlüsse von "multivesicular bodies" haben. Die Kristallstruktur von Annexin V, das den Annexinen II und IV sehr ähnlich ist, deutet auf eine Gemeinsamkeit mit Tunnel-bildenden Membranproteinen hin. Nachdem postuliert wurde, daß die Bildung einer Protein-Pore zwischen zwei Membranen, bzw. eines "Protein-Kragens" ein wesentlicher Schritt der Membranfusion sein könnte, wurde diskutiert, daß diese Porenbildung möglicherweise von Annexinen übernommen wird (Gruenberg & Emans, 1993). Für Hepatocyten von Sprague-Dawley-Ratten wurde kürzlich gezeigt, daß Annexin VI mit einem Molekulargewicht von ca. 68 kDa ein Hauptprotein der cytoplasma-tischen Seite der Endosomen darstellt (Jäckle et al., 1994). Falls ein Annexin auch eines der peripheren Membranproteine in unserem System darstellt, so wäre es möglich, daß eine Inaktivierung des Annexins für den Verlust an Fusionsfähigkeit bei der Vorinkubation verantwortlich ist. Ob die NEM-Sensitivität der peripheren Membranprotein-Präparation auf NSF zurückzuführen ist, oder auf ein Annexin kann nicht zweifelsfrei festgestellt werden, da die NEM-Sensitivität der Annexine noch nicht näher untersucht wurde (V. Gerke, persönliche Mitteilung). Der intermediäre Effekt von GTP $\gamma$ S wäre mit einer partiellen Inaktivierung GTP-bindender Proteine (hauptsächlich rab 5-Protein) erklärbar.



#### 5. 4. 3. 2. 10. *In vitro* Fusion von Endosomen mit Lysosomen

Die Interaktion zwischen Lysosomen und Endosomen wurden zuerst nur durch einen indirekten Nachweis mit Hilfe des Dichte-Unterschieds zwischen Endosomen und Lysosomen genauer dokumentiert (Mullock et al., 1989). Dabei wurden Hepatocyten-Endosomen ohne Differenzierung in kinetisch frühe oder späte Kompartimente mit ASOR markiert, und die Dichte-Verschiebung des Markers zu einer lysosomalen Dichte nach Inkubation in Gegenwart unmarkierter Lysosomen gemessen und postuliert, daß diese durch eine Fusion zwischen Endosomen und Lysosomen hervorgerufen wird (Mullock et al., 1992). Durch eine möglichst hohe Reinheit der eingesetzten Lysosomen-Fraktion wurde versucht die erwünschte Spezifität der Reaktion zu gewährleisten. Bei diesen Studien, die als indirekte Fusionstests zu bezeichnen sind, wurde beobachtet, daß von gleichzeitig endozytiertem polymerem IgA nur der Anteil die Dichte-Verschiebung mitmacht, der sich bereits in einem Kompartiment intermediärer Dichte befindet, während der Teil der mit Endosomen geringer Dichte (frühen Endosomen) komigriert, keine Dichte-Erhöhung erfährt. Dieser Befund wurde dahingehend interpretiert, daß frühe Endosomen nicht in der Lage sind mit Lysosomen zu interagieren, was im Widerspruch zu meinen Ergebnissen steht. Die pIgA-Lokalisation am Dichtegradienten war aber nicht eindeutig mit der von ASOR vergleichbar. Außerdem bedeutet die Tatsache, daß pIgA im weniger dichten Bereich des Gradienten keine Dichte-Verschiebung erfuhr, nicht zwingend, daß frühe Endosomen an sich nicht mit Lysosomen fusionieren, da es sich bei pIgA nicht um einen Endocytose- sondern um einen Transcytose-Marker handelt.

Die indirekten Fusionstests von Mullock et al. wurden in jüngster Zeit von derselben Arbeitsgruppe auch durch direkte Fusionstests erweitert, bei denen die Mischung der Inhalte von Endosomen und Lysosomen als Meßprinzip herangezogen wurde (Kuwana et al., 1993; Mullock et al., 1994). Späte Endosomen wurden mit Avidin-konjugiertem Asialofetuin beladen, Lysosomen mit biotinyliertem polymerem IgA, das zu einem gewissen Prozentsatz nicht nur den transzytotischen Weg durchläuft, sondern auch den lysosomalen. Die Beladung erfolgte jedoch unspezifisch durch intravenöse Injektion des Markers (10 min *in situ* für die Beladung später Endosomen und 35 - 45 min für die Beladung von Lysosomen),

wodurch im Fall der Endosomen-Markierung sowohl frühe, als auch späte Endosomen beladen waren, bzw. im Fall der Lysosomen-Markierung alle endocytischen Kompartimente. Die fehlende Spezifität der Beladung wurde dann durch den Versuch, eine höhere Reinheit der Präparation zu erzielen, kompensiert. Es wurde jedoch nicht versucht zwischen frühen und späten Endosomen exakt zu differenzieren. Im Gegensatz zum Testsystem, bei dem die Dichte-Verschiebung gemessen wurde, zeigte dieser Fusionstest kein Signal in Abwesenheit von Cytosol. In Analogie zu anderen Fusionstests wurde dabei auch eine NEM-Hemmmbarkeit festgestellt (Mullock et al., 1994).

In dem von mir eingesetzten experimentellen Ansatz wurde die *in vitro* Fusion zwischen Hepatocyten-Endosomen und Lysosomen ebenfalls direkt über die Vermischung der beiden Kompartiment-Inhalte nachgewiesen. Dabei wurden beide Reaktionspartner durch geeignete Beladungsbedingungen spezifisch markiert. Deshalb bedeutet die Anwesenheit anderer Kompartimente als der zu untersuchenden keine Gefahr, daß Artefakt-Signale gemessen werden. Beim Versuchsansatz von Mullock et al. (1989) ist hingegen eine möglichst hohe Reinheit der Lysosomen-Fraktion eine Voraussetzung für korrekte Aussagen. Die spezifische Beladung von Lysosomen erfolgte in unserem System durch den nicht hydrolysierbaren Marker Biotin-Dextran; für den Versuchsansatz wurde ein Lysosomen-angereichertes Zentrifugat eingesetzt. Die endosomalen Reaktionspartner waren mit Avidin, bzw. im Fall der späten Endosomen mit galaktosyliertem Avidin markiert. Im Lauf der Fusion mit den markierten Lysosomen entsteht folglich ein meßbares Avidin-Biotin-Reaktionsprodukt. Aufgrund der lysosomalen Proteasen ist nun natürlich möglich, daß der Avidin-Anteil des Komplexes abgebaut wird. Dies würde zu einer Verringerung des Fusionssignales führen, die jedoch im Verlauf der gewählten Reaktionsdauer von 30 min nicht beobachtet wurde. Es kann jedoch prinzipiell nicht zu einem artifiziellen Fusionssignal kommen. Sobald ein Signal detektierbar ist, muß angenommen werden, daß tatsächlich eine Fusion stattgefunden hat. Diese Voraussetzung ist im Versuchsansatz von Mullock et al. (1989) nicht unbedingt gegeben. Eigenen Experimenten zufolge ist es durchaus möglich, daß Hepatocyten-Endosomen unter entsprechenden Bedingungen ohne eine Fusion mit Lysosomen eine Dichte-Erhöhung bzw. eine Änderung ihrer Zentrifugationseigenschaften erfahren. Dafür scheint

jedoch die Anwesenheit von Salzen (KCl ...) notwendig zu sein, die im Reaktionspuffer von Mullock et al. nicht enthalten waren.

Im Gegensatz zu den Befunden von Mullock et al. (1989) konnte ich mit unserem Testsystem ein eindeutiges Fusionssignal detektieren, wenn frühe Endosomen und Lysosomen mit den beiden komplementären Markern beladen waren, was für eine Fusion früher Endosomen mit Lysosomen spricht. Theoretisch könnten auch frühe Endosomen zuerst mit späten fusionieren, und diese dann, wie auch von Mullock et al. postuliert, mit Lysosomen. Meiner Ansicht nach verläuft die Fusion jedoch nicht über späte Endosomen als Zwischenstufe, da keine Verzögerung der Fusionskinetik beobachtet werden konnte. Die Tatsache, daß in allen Experimenten frühe und späte Endosomen ähnliche Fusionseigenschaften aufwiesen, ist ein Hinweis dafür, daß sich diese beiden kinetisch und räumlich in der Zelle differenzierten endocytischen Kompartimente funktionell nicht wesentlich unterscheiden. Somit erscheint eine direkte Fusion zwischen frühen Endosomen und Lysosomen durchaus möglich. Ein weiterer Unterschied zwischen meinen Ergebnissen und den Befunden von Mullock et al. (1989) besteht in der NEM-Sensitivität der Reaktion. In unserem Fusionstest konnte die Endosomen-Lysosomen-Fusion so wie bisher alle anderen Fusionsprozesse durch NEM gehemmt werden. Dies war bei den Experimenten von Mullock et al. (1989) nicht der Fall. Das könnte möglicherweise daran liegen, daß die NEM-Sensitivität meinen Beobachtungen zufolge bei Hepatocyten nicht im Cytosol, sondern an den Membranen lokalisiert ist. Wenn nicht beide Membran-Präparationen mit NEM behandelt werden, kann somit die NEM-Sensitivität unentdeckt bleiben. Dementsprechend wurde in einer späteren Arbeit von Mullock et al. (1994) ebenso wie in unserem Testsystem eine eindeutige Hemmbarkeit der Fusion durch NEM aufgezeigt.

#### **5. 4. 3. 2. 11. Durchfluß-Analyse fluoreszenzmarkierter Endosomen zur Messung der *in vitro* Fusion**

Die Durchfluß-Analyse von FITC-Dextran beladenen Endosomen und Lysosomen schien ein guter methodischer Ansatz zur Charakterisierung von Größenänderungen subzellulärer Kompartimente zu sein. Mit Standardpartikel wurde eine sehr gute Linearität zwischen 0,364 und 1,6

µm festgestellt. Bei der Analyse der gesamten Vesikel-Population wurde jedoch auch eine große Zahl nicht markierter Kompartimente gemessen. Deshalb erwies sich die Analyse unter Verwendung eines Fluoreszenz-Grenzwertes, unter dem ein Kompartiment nicht erfaßt wurde, als günstig, um genauere Aussagen über die relevanten Organellen treffen zu können.

Mit Hilfe dieser Methode wurde auch die Temperatur-Abhängigkeit der *in vitro* Fusion von Endosomen ermittelt. Ähnlich wie in anderen untersuchten Zelllinien (Wessling-Resnick & Braell, 1990 a; Beaumelle & Hopkins, 1989; Diaz et al., 1988; Lenhard et al., 1992 a;) konnte kein Fusionsignal bei 10°C detektiert werden. Erst bei 15°C konnte im Hepatocyten-System eine Größenzunahme und damit eine Fusion festgestellt werden. Dieses Resultat ist gut mit dem Ergebnis vereinbar, daß bei 16°C endocytische Marker bis in frühe, fusogene Endosomen, nicht aber darüber hinaus transportiert werden. Bis zu 37°C, also der physiologischen Temperatur, konnte eine Steigerung des Fusions-signales beobachtet werden.

Das Ergebnis, daß eine Inkubation fluoreszenzmarkierter Lysosomen unter Fusionsbedingungen nicht wie bei den Endosomen zu einer Erhöhung des Side Scatter Wertes und damit zu einer Größenzunahme führt, spricht gegen eine Fusion von Lysosomen untereinander. Theoretisch könnte zwar eine Fusion stattfinden, ohne detektiert zu werden, wenn sie aufgrund von gleichzeitig ablaufenden Fissionsprozessen kompensiert würde; dies ist jedoch unter den gegebenen Bedingungen nicht zu erwarten.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde ebenfalls darauf hingewiesen, daß es in ihrem System scheinbar zu keiner *in vitro* Fusion von Lysosomen untereinander kommt (Diaz et al., 1989 a), obwohl es *in vivo* nach der Fusion ganzer Zellen zu einem raschen Austausch und Vermischung der Lysosomen-Inhalte kommen kann (Ferris et al., 1987; Deng et al., 1991). Dieser Unterschied könnte entweder darauf beruhen, daß *in vivo* ein Austausch zwischen Lysosomen und Endosomen stattfindet, der letzten Endes zu einer Vermischung lysosomaler Inhalte führt, oder darauf, daß die *in vitro* Bedingungen der Endosomenfusion nicht geeignet sind für eine Fusion von Lysosomen untereinander, wie sie eventuell *in vivo* vorkommt.

## **6. CONCLUSIO**

### **1. Apikale Endocytose**

Es konnte ein System etabliert werden, in dem durch retrograde Infusion in den Gallengang einer isoliert perfundierten Leber nur die apikale Seite der Hepatocyten markiert wurde. In der Folge erschienen im pericanaliculären Bereich intrazelluläre Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von etwa 0,5  $\mu\text{m}$ , die zumindest partiell mit apikalen Membranproteinen kolokalisierten. Die markierten endo-cytischen Kompartimente waren in der Lage ihren Innenraum anzusäuern. Eine gleichzeitige apikale und basolaterale Endocytose zweier unterschiedlicher Fluorophore, gefolgt von einer Durchfluß-Analyse einzelner Zellkompartimente, deutet darauf hin, daß sich die beiden Endocytosewege in Hepatocyten nach 2 - 5 min in Vesikeln mit einem Durchmesser von etwa 0,45  $\mu\text{m}$  treffen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die apikale Endocytose in dieser Form erst durch die Injektion induziert wurde.

### **2. Apikal-basolateraler Transport**

Das optimierte System zur Markierung der apikalen Seite wurde dazu eingesetzt, einen apikal-basolateralen Transport zu untersuchen. Das Auftreten von Markierungssubstanzen (HRP, FITC-Dextran) auf der basolateralen Seite zeigte etwa 3 - 4 min nach der Erwärmung auf 37°C ein Maximum. Die unter diesen Bedingungen transportierte Menge lag im Bereich von 1  $\mu\text{l/g}$  Leber und ist theoretisch durch einen trans-zellulären Transport erklärbar. Dennoch konnte nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um einen parazellulären Transport handelt.

### **3. Basolateral-apikale Transcytose**

Es konnten Versuchsbedingungen gefunden werden, unter denen in der isoliert perfundierten Leber die Clathrin-abhängige Endocytose und Transcytose von Asialoglykoproteinen gehemmt ist, und die ähnlich sind zu Bedingungen, die im Zellkultursystem eine Clathrin-abhängige Endocytose inhibieren. Diese Versuchsparameter wurden auch zur Untersuchung der Transcytose von HRP und FITC-Dextran herangezogen. Der Transport von FITC-Dextran wird unter diesen Bedingungen kaum beeinflusst, was darauf hinweist, daß in Hepatocyten ein Clathrin-unabhängiger Endocytose- und Transcytose-Weg existiert.

Dies ist für die Leber bisher noch nicht gezeigt worden. Die biliäre Sekretion von HRP läßt sich hingegen nicht auf einen unbeeinflussten Fluid-Phase-Transport zurückführen. Sie wird durch jene Bedingungen, die die Clathrin-abhängige Transcytose von Asialo-glykoproteinen hemmen, ungefähr im gleichen Ausmaß inhibiert. Außerdem konnte eine Bindung von HRP bei 4°C beobachtet werden (auch in Gegenwart von Mannan, um die Mannose-Rezeptoren von Kupffer- und Endothelzellen zu blockieren). Folglich scheint HRP ebenfalls über eine Rezeptor-vermittelte oder eine adsorptive Endocytose internalisiert zu werden. Das biphasische Auftreten von HRP in der Galle dürfte nicht, wie bisher von vielen Autoren angenommen, durch das Auftreten eines parazellulären und eines transzellulären Transport erklärbar sein, da der als parazellulär bezeichnete Transport durch eine reduzierte Temperatur, oder durch Bedingungen, die die Endocytose von Asialoglykoproteinen hemmen, inhibierbar ist. Folglich scheinen beide Transportwege transzellulär und Clathrin-abhängig zu sein.

#### **4. Fusionsprozesse**

Die Rekonstituierung verschiedener endocytischer Fusionsprozesse *in vitro* führte zu dem Ergebnis, daß sowohl kinetisch frühe, als auch kinetisch späte Endosomen in Abwesenheit intakter Mikrotubuli miteinander fusionieren können. Dies wurde in anderen bisher untersuchten Zelllinien noch nicht beobachtet, und ist ein Hinweis dafür, daß die Regulation endocytischer Prozesse in unterschiedlichen Zellarten anders ablaufen kann. Die Endosomenfusion zeigte hinsichtlich der Kinetik, der Cytosolabhängigkeit und des Effektes von NEM andere Eigenschaften, als bisher für einige andere Zelllinien beschrieben wurde. Die Lokalisation NEM-sensitiver Fusionsfaktoren ließ darauf schließen, daß diese in einem höheren Ausmaß als bei anderen Zelltypen Membran-assoziiert sind. Experimente, bei denen eine der beiden Endosomen-Populationen bei 37°C in Gegenwart von ATP vorinkubiert wurde, führten zu einem Verlust der Fusionsfähigkeit. Dies dürfte nicht auf einer Veränderung der Eigenschaften der Endosomen (Maturation), oder auf einer Segregation des Markers in ein nicht fusogenes Kompartiment beruhen, sondern auf einer Verzehrung von Fusionsfaktoren durch Fusionsprozesse innerhalb der Endosomenpopulation. Der Verlust an Fusionsfähigkeit konnte durch eine Zugabe peripherer Membranproteine wieder rückgängig gemacht werden, nicht jedoch durch eine Zugabe von

Cytosol. Folglich dürften jene Fusionsfaktoren, die während der *in vitro*-Fusion verbraucht werden, Membran-assoziierte Proteine sein.

Im Gegensatz zu Ergebnissen mit anderen Zelllinien wurde im Zuge der *in vitro*-Fusion auch eine Erhöhung der endosomalen Dichte, zum Teil bis auf den lysosomalen Wert, beobachtet. Dies ist in Einklang mit Ergebnissen, die auf eine *in vitro*-Fusion von Endosomen mit Lysosomen hinweisen. Ein Fusionsignal wurde auch dann detektiert, wenn Lysosomen mit einer Membran-Präparation inkubiert wurden, bei der die frühen Endosomen markiert waren. Diese potentielle Fusion früher Endosomen mit Lysosomen könnte jedoch auch über späte Endosomen als Zwischenstufe ablaufen. Schließlich konnte ein Versuchssystem aufgebaut werden, bei dem Fusionsexperimente mit Einzelorganellen-Durchflußanalysen kombiniert wurden. Dabei konnte gezeigt werden, daß die 90°-Lichtstreuung fluoreszenz-markierter Endosomen, die mit der Größe dieser Kompartimente korreliert, im Verlauf einer *in vitro*-Fusion zunimmt. Diese Erscheinung konnte bei Lysosomen-Fusionstests nicht beobachtet werden, was darauf hindeutet, daß bei den entsprechenden Bedingungen Lysosomen möglicherweise nicht untereinander fusionieren.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

**Altstiel L. & Branton D.:** Fusion of coated vesicles with lysosomes: Measurement with a fluorescence assay. *Cell* 32, 921-929 (1983).

**Anbari M.,** Root K.V. & Van Dyke R.W.: Role of Na,K-ATPase in regulating acidification of early rat liver endocytic vesicles. *Hepatology* 19 (4), 1034-1043 (1994).

**Anderson R.G.W.:** Potocytosis of small molecules and ions by caveolae. *Trends Cell Biol.* 3, 69-72 (1993).

**Aniento F.,** Emans N., Griffiths G., Gruenberg J.: Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* 123(6 Pt 1): 1373-87 (1993).

**Apodaca G.,** Katz L.A. & Mostov K.E.: Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes. *J. Cell Biol.* 125, (1) 67-86, (1994).

**Arai H.,** Terres G., Pink S. & Forgac M.: Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* 263, 8796-8802 (1988).

**Arias,** Jakoby, Popper, Schachter & Shafritz (Editors): *The Liver - Biology and Pathobiology*, Raven Press (1988).

**Balch W.E.,** Glick B.S. & Rothman J.E.: *Cell* 39, 405-416 (1984).

**Balch W.E.:** Small GTP-binding proteins in vesicular transport. *TIBS* 15, 473-477 (1990).

**Barasch J.,** Kiss B., Prince A., Saiman L., Gruenert D. & Al-Awqati Q.: Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 352, 70-73 (1991).



**Bartles J.R.**, Feracci H.M., Stieger, F. & Hubbard A.L.: Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane *in vivo*: Comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation.

*J. Cell Biol.* 105, 1241-1251 (1987).

**Barroso M. & Sztul E.S.:** Basolateral to apical transcytosis in polarized cells is indirect and involves BFA and trimeric G protein sensitive passage through the apical endosome. *J. Cell. Biol.* 124, 83-100, (1994).

**Bartosek I.**, Guaitani A. & Miller L.L., *Isolated liver perfusion and its applications.* Raven Press, New York (1973).

**Beaumelle B.D. & Hopkins C.R.:** High-yield isolation of functionally competent endosomes from mouse lymphocytes. *Biochem. J.* 264, 137-149 (1989).

**Beck K.A.**, Chang M., Brodsky F.M. & Keen J.H.: Clathrin assembly protein AP-2 induces aggregation of membrane vesicles: A possible role for AP-2 in endosome formation. *J. Cell Biol.* 119 (4), 787-796 (1992).

**Beckers C.J.**, Block M.R., Glick B.S., Rothman J.E. & Balch W.E.: Vesicular transport between the endoplasmatic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein. *Nature* 339, 397-398 (1989).

**Beltzer J.P. & Spiess M.:** In vitro binding of the asialoglycoprotein receptor to the  $\beta$ -adaplin of plasma membrane coated vesicles. *EMBO J.* 10, 3735-3742 (1991).

**Blackwood R.A. & Ernst J.D.:** Characterization of  $Ca^{2+}$ -dependent phospholipid-binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *Biochem. J.* 266, 195-200 (1990).

**Blomhoff R.**, Nenseter M.S., Green M.H. & Berg T.: A multicompartamental model of fluid-phase endocytosis in rabbit liver parenchymal cells. *Biochem. J.* 262, 605-610 (1989).

- Bomsel M.**, Parton R., Kuznetsov S.A., Schroer T.A. & Gruenberg J.: Microtubule- and motor-dependent fusion in vitro between apical and basolateral endocytic vesicles from MDCK cells. *Cell* 62, 719-731 (1990).
- Boyer J.L.**, Graf J. & Meier P.J.: Hepatic transport systems regulating  $\text{pH}_i$ , cell volume and bile secretion. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 415-438 (1992).
- Braell W.A.**: Fusion between endocytic vesicles in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1137-1141 (1987).
- Braulke T.**, Hasilik A. & von Figura K.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 441-449 (1988).
- Breitfeld P.P.**, Casanova J.E., McKinnon W.C. & Mostov K.E.: Deletion in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor differentially affect endocytic rate and postendocytic traffic. *J. Biol. Chem.* 265, 13750-13757 (1990).
- Broadwell R.D.**: Transcytosis of macromolecules through the blood-brain barrier: a cell biological perspective and critical appraisal. *Acta-Neuropathol-Berl.* 79(2): 117-28 (1989).
- Brown W.R. & Kloppel T.M.**: The Liver and IgA: Immunological, cell biological and clinical implications. *Hepatology* 9 (5), 763-784 (1989).
- Bucci C.**, Parton R.G., Mather I.H., Stunnenberg H., Simons K., Hoflack B. & Zerial M.: The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70, 715-728 (1992).
- Buckmaster M.J.**, Ferris A.L. & Storrie B.: Effects of pH, detergent and salt on aggregation of chinese-hamster-ovary-cell lysosomal enzymes. *Biochem. J.* 249, 921-923 (1988).
- Cain C. C.**, Sipe D.M. & Murphy R.F.: Regulation of endocytic pH by the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 544-548 (1989).

**Carter L.L.**, Redelmeier T.E., Wollenweber L.A. & Schmid S.L.: Multiple GTP-binding proteins participate in clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 120 (1), 37-45 (1993).

**Casanova J.E.**, Apodaca G. & Mostov K.E.: An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* 66, 65-75 (1991).

**Casanova J.E.**, Breitfeld P.P., Ross S.A. & Mostov K.E.: Phosphorylation of the polymeric immunoglobulin receptor is required for its efficient transcytosis. *Science* 248, 742-745 (1990).

**Casciola-Rosen L.A.**, Renfrew C.A., Hubbard A.L.: Lumenal labeling of rat hepatocyte endocytic compartments. Distribution of several acid hydrolases and membrane receptors. *J. Biol. Chem.* 267(17), 11856-64 (1992).

**Chavrier P.**, Gorvel J.-P., Stelzer E., Simons K., Gruenberg J. & Zerial M.: *Nature* 353, 769-772 (1991).

**Chavrier P.**, Simons K. & Zerial M.: The complexity of the rab and rho GTP-binding protein subfamily revealed by a PCR cloning approach. *Gene* 112, 261-264 (1992).

**Clague M.J.**, Urbé S., Aniento F. & Gruenberg J.: Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J. Biol. Chem.* 269 (1), 21-24 (1994).

**Colombo M.I.**, Gonzalo S., Weidman P. & Stahl P.: Characterization of Trypsin-sensitive Factor(s) Required for Endosome-Endosome Fusion. *J. Biol. Chem.* 266 (34), 23438-23445 (1991).

**Colombo M.I.**, Lenhard J.M., Mayorga L.S. & Stahl P.D.: Reconstitution of Endosome Fusion: Identification of Factors Necessary for Fusion Competency. *Meth. Enzymol.* 219, 32-44 (1992 a).

**Colombo M.I.**, Mayorga L.S., Casey P.J. & Stahl P.D.: Evidence of a role for heterotrimeric GTP-binding proteins in endosome fusion. *Science* 255, 1695-1697 (1992 b).

- Cosson P.**, de Curtis I., Pouyssegur J., Griffiths G. & Davoust J.: Low cytoplasmic pH inhibits endocytosis and transport from the trans-Golgi network to the cell surface. *J. Cell Biol.* 108, 377-387 (1989).
- Courtoy P.J.:** Dissection of endosomes, in "*Intracellular trafficking of proteins*", edited by C. Steer & J. Hanover, Cambridge University Press (1991).
- Davoust J.**, Gruenberg J. & Howell K.E.: Two threshold values of low pH block endocytosis at different stages. *EMBO J.* 6 (12), 3601-3609 (1987).
- De Duve C.:** The lysosome concept. In "*Lysosomes*", Ciba Found. Symp., Churchill, London, ed. A.V. S. de Reuck, M.P. Cameron. pp 1-35 (1963).
- De Duve C.:** Die Zelle - Expedition in die Grundstruktur des Lebens, *Spektrum der Wissenschaft*, Heidelberg (1986).
- Deng Y.**, Griffiths G. & Storrie B.: Comparative behaviour of lysosomes and pre-lysosome compartment (PLC) in *in vivo* cell fusion experiments. *J. Cell Science* 99, 571-582 (1991).
- Diaz R.**, Mayorga L. & Stahl P.: *In vitro* fusion of endosomes following receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* 263 (13), 6093-6100 (1988).
- Diaz R.**, Mayorga L.S., Mayorga L.E. & Stahl P.: *In vitro* clustering and multiple fusion among macrophage endosomes. *J. Biol. Chem.* 264 (22), 13171-13180 (1989 a).
- Diaz R.**, Mayorga L.S., Weidmann P.J., Rothman J.E. & Stahl P.D.: Vesicle fusion following receptor-mediated endocytosis requires a protein active in Golgi transport. *Nature* 339, 398-400 (1989 b).
- Diaz R.**, Colombo M.I., Koval M., Mayorga L.S., Stahl P.D.: Endosomal Density Shift Is Related to a Decrease in Fusion Capacity. *Europ. J. Cell Biol.* 56 (2), 223-232 (1991).
- Diment S. & Stahl P.:** Macrophage endosomes contain protease which degrade endocytosed protein ligands. *J. Biol. Chem.* 260, 15311-15317 (1985).

**Dini L.,** Lentini A., Mantile G., Massimi M. & Devirgiliis L.: Receptor-mediated endocytosis of galactose and mannose exposing ligands: an electron microscopic study on adult and neonatal cultured rat hepatocytes. *Biol. Cell* 74, 217-224 (1992).

**Dunn W.A.,** La Badie J.H. & Aronson N.N.: Inhibition of <sup>125</sup>J-asialofetuin catabolism by leupeptin in the isolated perfused rat liver and in vivo. *J. Biol. Chem.* 254, 4191-4196 (1979).

**Dunn K.W. & Maxfield F.R.:** Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J. of Cell Biol.* 117 (2), 301-310 (1992).

**Emans N.,** Gorvel J.-P., Walter C., Gerke V., Kellner R., Griffiths G. & Gruenberg J.: Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J. Cell Biol.* 120 (6), 1357-1369 (1993).

**Felberbauer F.X.:** Fluorescent Sensors in Intact Organs: Fiber Optic Measurement of Intracellular pH in the Isolated Perfused Rat Liver; *Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Wien, (1992).*

**Felder S.,** Miller K., Moehren G., Ullrich A., Schlessinger J. & Hopkins C.R.: Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* 61, 623-634 (1990).

**Ferris A.L.,** Brown J.C., Park R.D. & Storrie B.: Chinese Hamster Ovary Cell lysosomes rapidly exchange contents. *J. Cell Biol.* 105 (6), 2703-2712 (1987).

**Fuchs R.,** Ellinger A., Pavelka M., Peterlik M. and Mellman I.: Endocytic coated vesicles do not exhibit ATP-dependent acidification in vitro. *J. Cell Biol.* 105, 91a (1987).

**Fuchs R.,** Schmid S. & Mellman I.: A possible role for Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in regulating ATP-dependent endosome acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 539-543 (1989 a).

**Fuchs R.**, Male P. & Mellman I.: Acidification and ion permeabilities of highly purified rat liver endosomes. *J. Biol. Chem.* 264, 2212-2220 (1989 b).

**Gao B.**, Biosca J., Craig E.A., Greene L.E & Eisenberg E.: Uncoating of coated vesicles by yeast hsp70 proteins. *J. Biol. Chem.* 266 (29), 19565-19571 (1991).

**Geffen I.**, Wessels H.P., Roth J., Shia M.A. & Spiess M.: Endocytosis and recycling of subunit H1 of the asialoglycoprotein receptor is independent of oligomerization with H2. *EMBO J.* 8, 2855-2862 (1989).

**Gerke V.**: Tyrosine protein kinase substrate p36: a member of the annexin family of Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding proteins. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 14, 449-451 (1989).

**Geuze H.J.**, Slot J.W. & Schwartz A.L.: Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution. *J. Cell. Biol.* 104, 1715-1724 (1987).

**Glenney J.R.**: Calpactins: calcium-regulated membrane-skeletal proteins. *Bioessays* 7, 173-175 (1987).

**Glickman J.N.**, Conibear E. & Pearse B.M.F.: Specificity of binding of clathrin adaptors to signals on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *EMBO J.* 8, 1041-1047 (1989).

**Goda Y. & Pfeffer S.R.**: Identification of a novel, N-ethylmaleimide-sensitive cytosolic factor required for vesicular transport from endosomes to the trans-Golgi network in vitro. *J. Cell Biol.* 112 (5), 823-831 (1991).

**Goldstein J.L.**, Brown M.S., Anderson R.G.W., Russel D. & Schneider W.: Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL-receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 1-39 (1985).

**Goltz J.S.**, Wolkoff A.W., Novikoff P.M., Stockert R.J. & Satir P.: A role for microtubules in sorting endocytic vesicles in rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7026-7030 (1992).

**Gorvel J.-P.**, Chavrier P., Zerial M. & Gruenberg J.: rab5 controls early endosome fusion *in vitro*. *Cell* 64, 915-925 (1991).

**Gottlieb T.A., Ivanov I.E., Adesnik M & Sabatini D.D.:** Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J. of Cell Biol.* 120 (3) 695-710 (1993).

**Goud B. & McCaffrey M.:** Small GTP-binding proteins and their role in transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 626-633 (1991).

**Graf J. & Peterlik M.:** Ouabain mediated sodium uptake and bile formation by the isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 230, 876-885 (1976).

**Graham R.C. & Karnovsky M.J.:** *J. Histochem. Cytochem.* 14, 291-302 (1966).

**Griffiths G., Hoflack B., Simons K., Mellman I. & Kornfeld S.:** The mannose-6-phosphate-receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 52, 329-341 (1988).

**Griffiths G. & Gruenberg J.:** The arguments for pre-existing early and late endosomes. *Trends Cell Biol.* 1, 5-9 (1991).

**Gruenberg J.E. & Howell K.E.:** Reconstitution of vesicle fusions occurring in endocytosis with a cell-free system. *EMBO J.* 5 (12), 3091-3101 (1986).

**Gruenberg J. & Howell K.E.:** Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 453-481 (1989).

**Gruenberg J., Griffiths G. & Howell, K.E.:** Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles *in vivo* and with an assay of vesicle fusion *in vitro*. *J. Cell Biol.* 108, 1301-1316 (1989).

**Gruenberg J. & Emans N.:** Annexins in membrane traffic. *Trends Cell Biol. in Cell Biol.* 3, 224-227 (1993).

**Hagmann J., Dagan D. & Burger M.M.:** Release of endosomal content induced by plasma membrane tension: Video image intensification time lapse analysis. *Exp. Cell Research* 198, 298-304 (1992).

**Hansen S.H., Sandvig K. & van Deurs B.:** The preendosomal compartment comprises distinct coated and noncoated endocytic vesicle populations.

*J. Cell Biol.* 113 (4), 731-741 (1991).

**Hansen S.H.**, Sandvig K. & van Deurs B.: Molecules internalized by clathrin-independent endocytosis are delivered to endosomes containing transferrin receptors (1993).

**Harding C.V.**, Collins D.S., Slot J.W., Geuze H.J. & Unanue E.R.: Liposome-encapsulated antigens are processed in lysosomes, recycled, and presented to T-cells. *Cell* 64, 393-401 (1991).

**Hardison W.G.M. & Lowe P.J.:** The passage of molecules into bile: paracellular and transcytotic pathways. *Hepatic Transport in Organic Substances*, ed. E. Petzinger, R. Kinne, H. Sies; Springer Verlag, Berlin-Heidelberg (1989).

**Hardison W.G.M.**, Lowe P.J. & Shanahan M.: Effect of molecular charge on para- and transcellular access of Horseradish Peroxidase into rat bile. *Hepatology* 9(6), 866-871 (1989).

**Hayakawa T.**; Cheng O., Ma A. & Boyer J.L.: Taurocholate stimulates transcytotic vesicular pathways labeled by Horseradish Peroxidase in the isolated perfused rat liver. *Gastroenterology* 99, 216-228 (1990).

**Hayakawa T.**; Katagiri K.; Hoshino M.; Nakai T.; Ohiwa T.; Kumai T.; Miyaji M.; Takeuchi T.; Corasanti J. & Boyer J.L.: Papaverine inhibits transcytotic vesicle transport and lipid excretion into bile in isolated perfused rat liver. *Hepatology*.16(4): 1036-42 (1992).

**Haylett T. & Thilo L.:** Endosome-Lysosome fusion at low temperature. *J. Biol. Chem.* 266 (13), 8322-8327 (1991).

**Heuser J.E. & Anderson R.G.W.:** Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* 108, 389-400 (1989).

**Hewlett L.J.**, Prescott A.R. & Watts C.: The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J. Cell Biol.* 124 (5), 689-703 (1994).



**Hirt R.P.;** Hughes G.J.; Frutiger S.; Michetti P.; Perregaux C.; Poulain-Godefroy O.; Jeanguenat N.; Neutra M.R.; Kraehenbuhl J.P.: Transcytosis of the polymeric Ig receptor requires phosphorylation of serine 664 in the absence but not the presence of dimeric IgA. *Cell* 74(2): 245-55 (1993).

**Hopkins C.R. & Trowbridge I.S.:** Internalization and processing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A431 cells. *J. Cell Biol.* 97, 508-521 (1983).

**Hopkins C.R.,** Gibson A., Shipman M. & Miller K.: Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature* 346, 335-339 (1990).

**Hopkins C.R.:** Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. *TIBS* 17, 27-31 (1992).

**Hoppe C.A.,** Connolly T.P. & Hubbard A.L.: Transcellular transport of polymeric IgA in the rat hepatocyte: Biochemical and morphological characterization of the transport pathway. *J. Cell Biol.* 101, 2113-2123 (1985).

**Hubbard A.L.:** Endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 675-683 (1989).

**Hunziker W.;** Whitney J.A.; Mellman I.: Selective inhibition of transcytosis by brefeldin A in MDCK cells. *Cell* 67(3): 617-27 (1991).

**Hunziker W.,** Male P. & Mellman I.: Differential microtubule requirements for transcytosis in MDCK cells. *EMBO J.* 9 (1), 3515-3525 (1990).

**Jäckle S.,** Beisiegel U., Rinninger F., Buck F., Grigoleit A., Block A., Gröger I., Greten H. & Windler E.: Annexin VI, a marker protein of hepatocytic endosomes. *J. Biol. Chem.* 269 (2), 1026-1032 (1994).

**Jahraus A.,** Storrie B., Griffiths G. & Desjardins M.: Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late endosome compartment. *J. Cell Science* 107, 145-157 (1994).

**Kaetzel C.S.**, Robinson J.K., Chintalacharuvu K.R., Vaerman J.R., Lamm M.E.: The Polymeric Immunoglobulin Receptor (Secretory Component) Mediates Transport of Immune Complexes Across Epithelial Cells - A Local Defense Function for IgA.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 19, 8796-8800 (1991).

**Kan K.S. & Coleman R.:** The calcium ionophore A23187 increases the tight-junctional permeability in rat liver. *Biochem. J.* 256, 1039-1041 (1988).

**Kaplan K.B.**, Swedlow J.R., Varmus H.E. & Morgan D.O.: Localization of pp60c-src with endosomal membranes in mammalian fibroblasts.

*J. Cell Biol.* 118, 321- 334 (1992).

**Karlson P.:** *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1984).

**Karnovsky M.J.:** *J. Cell Biol.* 27, 137-138A (1965).

**Kato Y.**, Sato H., Ichikawa M., Suzuki H., Sawada Y., Hanano M., Fuwa T. & Sugiyama Y.: Existence of two pathways for the endocytosis of epidermal growth factor by liver: Phenylarsine oxide-sensitive and -insensitive pathways.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8507-8511 (1992).

**Kerr M.A.:** The structure and function of human IgA.

*Biochem J.* 271,285-296 (1990).

**Kinsella B.T. & Maltese W.A.:** rab GTP-binding proteins implicated in vesicular transport are isoprenylated *in vitro* at cysteines within a novel carboxyl-terminal motif. *J. Biol. Chem.* 266 (13), 8540-8544 (1991).

**Klapper H.**, Wuskovsky P., Vaerman J.-P., Sztuhl E. & Fuchs R.: Sorting of pIgA and asialoglycoprotein occurs in early, mildly acidic endosome compartment. *J. Cell. Biol.* 111, 203a (1990).

**Klapper H.**, Graf J. & Fuchs R.: Temperature dependence of transcytotic pathways in rat liver. *Endocytosis*, ed. by P. Courtoy, NATO ASI Series, H62, 301-307 (1992).

**Klausner R.D.**, Donaldson J.G. & Lippincott-Schwartz J.: Brefeldin A: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116 (5), 1071-1080 (1992).

**Kleinig H. & Sitte P.:** *Zellbiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1986).

**Killisch I.**, Steinlein P., Römisch K., Hollinshead R., Beug H. & Griffiths G.: Characterization of early and late endocytic compartments of the transferrin cycle. *J. Cell Science* 103, 211-232 (1992).


**Kok J.W.**, Hoekstra K., Eskelinen S. & Hoekstra D.: Recycling pathways of glycosylceramide in BHK-cells: distinct involvement of early and late endosomes. *J. Cell Science* 103, 1139-1152 (1992).

**Kornfeld S. & Mellman I.:** The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 483-525 (1989).

**Kuwana T.**, Mullock B.M., Luzio J.P.: Identification of a protein capable of causing fusion of endosome and lysosome membranes. *Biochem Soc Trans.* 21(2): 299-300 (1993)

**Lämmli U.K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).

**Larkin J.M.**, Sztul E.S. & Palade G.E.: Phosphorylation of the rat hepatic polymeric IgA receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 4759-4763 (1983).

  
**Larkin J.M. & Palade G.E.:** Transcytotic vesicular carriers for polymeric IgA receptors accumulate in rat hepatocytes after bile duct ligation. *J. Cell Science* 98, 205-216 (1991).

**Lenhard J.M.**, Mayorga L. & Stahl P.D.: Characterization of endosome-endosome fusion in a cell-free system using *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 267 (3), 1896-1903 (1992 a).

**Lenhard J.M.**, Kahn R.A. & Stahl P.D.: Evidence for ADP-ribosylation factor (ARF) as a regulator of *in vitro* endosome-endosome fusion. *J. Biol. Chem.* 267 (18), 13047-13052 (1992 b).

**LeSage G.D.**, Robertson W.E. & Baumgart M.A.: Demonstration of vesicular-dependent bile-flow in the sucrose-loaded rat. *Gastroenterology* 99, 478-487 (1990).

**Lin H.**, Moore M., Sanan D. & Anderson R.: Reconstitution of clathrin-coated pit budding from plasma membranes. *J. Cell Biol.* 114, 881-891 (1991).

**Lin H.**, Sudhof T. & Anderson R.: Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits. *Cell* 70, 283-291 (1992).

**Lippincott-Schwartz J.**, Yuan L., Tipper C., Amherdt M., Orci L. & Klausner R. D.: Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 67, 601-616 (1991).

**Lodish H.F.:** Recognition of complex oligosaccharides by the multisubunit asialoglycoprotein receptor. *TIBS* 16, 374- 377 (1991).

**Lombardi D.;** Soldati T.; Riederer M.A.; Goda Y.; Zerial M.; Pfeffer S.R.: Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO J.* 12(2): 677-82 (1993).

**Lowe P.J.**, Miyai K., Steinbach H. & Hardison W.G.M.: Hormonal regulation of hepatocyte tight junction permeability. *Am. J. Physiol.* 255, G454-G461 (1988).

**Madshus I.H.**, Sandvig K., Olsnes S. van Deurs B.: Effect of reduced endocytosis induced by hypotonic shock and potassium depletion on the infection of Hep2 cells by picornaviruses. *J. Cell. Physiol.* 131, 14-22 (1987).

**Malhotra V.**, Orci L., Glick B.S., Block M.R. & Rothman J.E.: Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. *Cell* 54, 221-227 (1988).

**Marsh M. & Helenius A.:** Adsorptive endocytosis of Semliki Forest Virus. *J. Mol. Biol.* 142, 439-454 (1980).

**Matter A.**, Orci L. & Rouiller C.: A study on the permeability barriers between Disse's space and the bile canaliculus. *J. Ultrastructure Res. Supplement* 11, 1-71 (1969).

**Matter K.**, Whitney J.A., Yamamoto E.M. & Mellman I.: Common signals control low density lipoprotein receptor sorting in endosomes and the Golgi complex of MDCK cells. *Cell* 74, 1053-1064 (1993).

**Mayorga L.S.**, Diaz R. & Stahl P.D.: Plasma membrane-derived vesicles containing receptor-ligand complexes are fusogenic with early endosomes in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* 263 (33), 17213-17216 (1988).

**Mayorga L.S.**, Diaz R. & Stahl P.D.: Reconstitution of intracellular vesicle fusion in a cell-free system after receptor-mediated endocytosis. *Meth. Cell Biol.* 31, 179-196 (1989 a).

**Mayorga L.S.**, Diaz R., Colombo M.I. & Stahl P.D.: GTP $\gamma$ S stimulation of endosome fusion suggests a role for a GTP-binding protein in the priming of vesicles before fusion. *Cell Regulation* 1, 113-124 (1989 b).

**Mayorga L.S.**, Colombo M.I., Lennartz M., Brown E.J., Rahman K.H., Weiss R., Lennon P.J. & Stahl P.D.: Inhibition of endosome fusion by phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) inhibitors points to a role for PLA<sub>2</sub> in endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10255-10259 (1993 a).

**Mayorga L.S.**, De Veca M.G., Colombo M.I. & Bertini F.: Effect of pH and ATP on the equilibrium density of lysosomes. *J. Cell. Physiol.* 156, 303-310 (1993 b).

**McClain D.A. & Olefsky J.M.:** *Diabetes* 37, 806-815 (1988).

**McLean & Nakane:** *J. Histochem. Cytochem.* 22: 1077-1083 (1974).

**Meier P.J.:** Canalicular membrane transport processes; in "*Hepatic Transport and Bile Secretion*", ed. by Tavoloni & Berk, Raven Press, New York, (1993)

**Mellman I.**, Fuchs R., Helenius A.: Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 663-700 (1986).

**Miettinen H.M.**, Matter K., Hunziker W., Rose J.K. & Mellman I.:  
Fc Receptor Endocytosis Is Controlled by a Cytoplasmic Domain Determinant  
That Actively Prevents Coated Pit Localization.  
*Journal of Cell Biology* 116 (4), 875-888 (1992).

**Morris S.A.**, Ahle S. & Ungewickell E.: Clathrin-coated vesicles.  
*Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 684-690 (1989).

**Moss A.L. & Ward W.F.:** Multiple Pathways for Ligand Internalization in Rat  
Hepatocytes . 1. Effects of Anoxia, Phenylarsine Oxide and Monensin.  
*J. Cell. Physiol.* 149: 2, 313-318 (1991 a).

**Moss A.L. & Ward W.F.:** Multiple Pathways for Ligand Internalization in Rat  
Hepatocytes. 2. Effect of Hyperosmolarity and Contribution of Fluid-Phase  
Endocytosis. *J. Cell. Physiol.* 149: 2, 319-323 (1991 b).

**Mostoc K.E.**, Friedlander M. & Blobel G.: The receptor for transepithelial  
transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains.  
*Nature* 308, 37-43 (1984).

**Mullock B.M.**, Branch W.J., van Schaik M., Gilbert L.K. & Luzio J.P.:  
Reconstitution of an endosome-lysosome interaction in a cell-free system. *J. Cell  
Biol.* 108, 2093-2099 (1989).

**Mullock B.M. & Luzio J.P.:** Reconstitution of rat liver endosome-lysosome  
fusion in vitro. *Methods-Enzymol.* 219: 52-60 (1992).

**Mullock B.M.**, Perez J.H., Kuwana T., Gray S.R. & Luzio J.P.: Lysosomes can  
fuse with a late endosomal compartment in a cell-free system from rat liver. *J.  
Cell Biol.* 126 (5), 1173-1182 (1994).

**Murphy R.F.**, Powers S. & Cantor C.R.: Endosome pH measured in single cells  
by dual fluorescence flow cytometry: Rapid acidification of insulin to pH 6. *J.  
Cell Biol.* 98, 1757-1762 (1984).

**Murphy R.F.:** Maturation models for endosome and lysosome biogenesis.  
*Trends Cell Biol.* 1, 77-82 (1991).

- Murphy R.F.:** Models of endosome and lysosome traffic.  
*Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes* 1, 1-17 (1993).
- Murphy R.F., Schmid J.A. and Fuchs R.:** Endosome maturation: Insights from somatic cell genetics and cell-free analysis.  
*Biochem. Soc. Transactions* 21 (3), 716-720 (1993).
- Musil L. & Baenziger J.U.:** Proteolytic processing of rat liver membrane secretory component: cleavage activity is localized to bile canicular membranes.  
*J. Biol. Chem.* 263, 15799-15808 (1988).
- Oka J.A., Christensen M.D. & Weigel P.H.:** Hyperosmolarity inhibits galactosyl receptor-mediated but not fluid phase endocytosis in isolated rat hepatocytes.  
*J. Biol. Chem.* 264 (20), 12016-12024 (1989).
- Okamoto C.T., Shia S.P., Bird C., Mostov K.E. & Roth M.G.:** The cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor contains two internalization signals that are distinct from its basolateral signal.  
*J. Biol. Chem.* 267,9925-9932 (1992).
- Parton R.G., Prydz K., Bomsel M., Simons K. & Griffiths G.:** Meeting of the apical and basolateral endocytic pathways of the Madin-Darby Canine Kidney cell in late endosomes.  
*J. Cell. Biol.* 109 (6), 3259-3272 (1989).
- Parton R.G., Schrotz P., Bucci C. & Gruenberg J.:** Plasticity of early endosomes.  
*J. Cell Science* 103, 335-348 (1992).
- Pearse B.M.F. & Robinson M.S.:** Clathrin, adaptors and sorting.  
*Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 151-171 (1990).
- Pelchen-Matthews A., Boulet I., Littman D.R., Fagard R. & Marsh M.:** The protein tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> inhibits CD4 endocytosis by preventing entry of CD4 into coated pits.  
*J. Cell Biol.* 117 (2), 279-290 (1992).
- Pelham H.R.B.:** Multiple targets for Brefeldin A. *Cell* 67: 449-451 (1991).

**Perez J.H.**, Branch W.J., Smith L., Mullock B.M. & Luzio J.P.: Investigation of endosomal compartments involved in endocytosis and transcytosis of polymeric immunoglobulin A by subcellular fractionation of perfused isolated rat liver. *Biochem. J.* 251, 763-770 (1988).

**Pfeffer S.R.:** GTP-binding proteins in intracellular transport. *Trends Cell Biol. in Cell Biol.* 2, 41-46 (1992).

**Pierre P.**, Scheel J., Rickard J.E. & Kreis T.E.: CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* 70, 887-900 (1992).

**Prydz K.**, Hansen S.H., Sandvig K. & van Deurs B.: Effects of Brefeldin A on endocytosis, transcytosis and transport to the Golgi complex in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 119 (2), 259-272 (1992).

**Pryer N.K.**, Wuestehube L.J. & Schekman R.: Vesicle-mediated protein sorting. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 471-516 (1992).

**Pitt A. & Schwartz A.L.:** Reconstitution of human hepatoma endosome-endosome fusion in vitro: potential roles for an endoprotease and a phosphoprotein phosphatase. *Eur. J. Cell Biol.* 55(2): 328-35 (1991).

**Pitt A.**, Mayorga L.S., Schwartz A.L. & Stahl P.D.: Assays for phagosome-endosome-fusion and phagosome protein recycling. *Methods Enzymol.* 219, 21-31 (1992).

**Racoosin E.L. & Swanson J.A.:** Maropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J. Cell Biol.* 121 (5), 1011-1020 (1993).

**Ramadori G.**, Rieder H. & Knittel T.: Biology and Pathobiology of Sinusoidal Liver Cells, in "*Hepatic Transport and Bile Secretion*", ed. by Tavoloni & Berk, Raven Press, New York, (1993)

**Roederer M.**, Barry J.R., Wilson R.B. & Murphy R.F.: Endosomes can undergo an ATP-dependent density increase in the absence of dense lysosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 51, 229-234 (1990).



**Roederer M.**, Bowser R. & Murphy R.F.: Kinetics and temperature dependence of exposure of endocytosed material to proteolytic enzymes and low pH: Evidence for a maturation model for the formation of lysosomes.

*J. Cell. Physiol.* 131, 200-209 (1987).

**Roman I.D.**, Monte M.J., Gonzalez-Buitrago J.M., Esteller A. & Jiménez R.: Inhibition of hepatocytary vesicular transport by Cyclosporin A in the rat: Relationship with cholestasis and hyperbilirubinemia. *Hepatology* 12, 83-91 (1990).

**Salminen A. & Novick P.:** *Cell* 47, 527-538 (1987).

**Salzman N.H. & Maxfield F.R.:** Fusion accessibility of endocytic compartments along the recycling and lysosomal endocytic pathways in intact cells. *J. Cell Biol.* 109, 2097-2104 (1989).

**Sandvig K.**, Olsnes S., Petersen O.W. & van Deurs B.: Control of coated-pit function by cytoplasmic pH. *Meth. Cell Biol.* 32, 365-382 (1989).

**Sandvig K. & van Deurs B.:** Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid phase markers without alteration in Transferrin endocytosis. *J. Biol. Chem.* 265 (11), 6382-6388 (1990).

**Scharschmidt B.F.**, Lake J.R., Renner E.L., Licko V. & Van Dyke R.W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (24), 9488-9492 (1986).

**Scheel J. & Kreis T.E.:** Motor protein independent binding of endocytic carrier vesicles to microtubules *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 266 (27), 18141-18148 (1991).

**Schmid J.A.**, Klapper H. & Fuchs R.: Characterization of basolateral and apical endocytic pathways in rat hepatocytes. In: "*Hepatic Endocytosis of Lipids and Proteins*"; edited by E. Windler and H. Greten, Seite 31-36, W. Zuckerschwerdt Verlag (1992).

**Schmid J.A.:** The acidic environment in endocytic compartments.

*Biochem. J.* 303 (2), 679-680 (1994).

**Schmid S.L.**, Fuchs R., Male P. & Mellman I.: Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell* 52, 73-83 (1988).

**Schmid S.L.**, Fuchs R., Kielian M., Helenius A. & Mellman I.: Acidification of endosome subpopulations in wild-type chinese hamster ovary cells and temperature-sensitive acidification-defective mutants. *J. Cell Biol.* 108, 1291-1300 (1989).

**Schmid S.L. & Smythe E.:** Stage-specific assays for coated pit formation and coated vesicle budding *in vitro*. *J. Cell Biol.* 114, 860-880 (1991).

**Schmid S.L.:** The mechanism of receptor-mediated endocytosis: More questions than answers. *BioEssays* 14 (9), 589-596 (1992).

**Schmid S.L.:** Biochemical requirements for the formation of clathrin- and COP-coated transport vesicles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 621-627 (1993).

**Scott L.J. & Hubbard A.L.:** Dynamics of four rat liver plasma membrane proteins and polymeric IgA receptor. *J. Biol. Chem.* 267 (9), 6099-6106 (1992).

**Shi L.B.**, Fushimi K., Bae H.R. & Verkman A.S.: Heterogeneity in ATP-dependent acidification in endocytic vesicles from kidney proximal tubule. Measurement of pH in individual endocytic vesicles in a cell free system. *Biophys. J.* 59 (6), 1208-1217 (1991).

**Silbernagl S. & Despopoulos A.:** *Atlas der Physiologie*. Deutscher Taschenbuch-Verlag, Thieme-Verlag, Stuttgart (1983).

**Smythe E.**, Carter L.L. & Schmid S.L.: Cytosol- and clathrin-dependent stimulation of endocytosis *in vitro* by purified adaptors. *J. Cell Biol.* 119 (5), 1163-1171 (1992).

**Smythe E.;** Smith P.D.; Jacob S.M.; Theobald J.; Moss S.E.: Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells. *J. Cell. Biol.* 124(3): 301-6 (1994).

**Sosa M.A.**, Schmidt B., von Figura K. & Hille-Rehfeld A.: In vitro binding of plasma membrane coated vesicle adaptors to the cytoplasmic domain of lysosomal acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* 268 (17), 12537-12543 (1993).

**Söllner T.**, Whiteheart S.W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P. & Rothman J.E.: SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324 (1993).

**Steele-Mortimer O.**, Clague M.J., Huber L.A., Chavrier P., Gruenberg J. & Gorvel J.-P.: The N-terminal domain of a rab protein is involved in membrane-membrane recognition and/or fusion. *EMBO J.* 13 (1), 34-41 (1994).

**Stefaner I.**: Effect of short-time bile duct ligation on endocytic and transcytotic pathways in rat liver. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Universität für Bodenkultur, Wien* (1994).

**Steinman R.M.**, Brodie S.E. & Cohn Z.A.: Membrane flow during pinocytosis: a stereologic analysis. *J. Cell Biol.* 68, 665-687 (1976).

**Stenmark H.**, Parton R.G., Steele-Mortimer O., Lütcke A., Gruenberg J. & Zerial M.: Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13 (6), 1287-1296 (1994).

**Stoorvogel W.**, Strous G.J., Geuze H.J., Oorschot V. & Schwartz A.L.: Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 65, 47-427 (1991).

**Sztul E.**, Kaplin A., Saucan L. & Palade G.: Protein traffic between distinct plasma membrane domains: isolation and characterization of vesicular carriers involved transcytosis. *Cell* 64, 81-89 (1991).

**Sztul E.**: Transcytotic vesicle fusion with plasma membrane. *Methods Enzymol.* 219, 44-51 (1992).

**Sztul E.**; Colombo M.; Stahl P.; Samanta R.: Control of protein traffic between distinct plasma membrane domains. Requirement for a novel 108,000 protein in

the fusion of transcytotic vesicles with the apical plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 268(3), 1876-85 (1993).

**Taylor T.C. & Melançon P.:** *J. Cell Biol.* 115, 245a (1991).

**Thomas L.,** Clarke P.R., Pagano M. & Gruenberg J.: Inhibition of membrane fusion *in vitro* via Cyclin B but not Cyclin A. *J. Biol. Chem.* 267 (9), 6183-6187 (1992).

**Tomoda H.,** Kishimoto Y. & Lee Y.C.: *J. Biol. Chem.* 264, 15445-15450 (1989).

**Tooze J. & Hollinshead M.:** Tubular early endosomal networks in AtT20 and other cells. *J. Cell Biol.* 115 (3), 635-654 (1991).

**Tooze J. & Hollinshead M.:** In AtT20 and HeLa cells Brefeldin A induces the fusion of tubular endosomes and changes their distribution and some of their endocytic properties. *J. Cell Biol.* 118 (4), 813-830 (1992).

**Trowbridge I.S.:** Endocytosis and signals for internalization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 634-641 (1991).

**Trowbridge I.S.,** Collawn J.F. & Hopkins C.R.: Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 129-161 (1993).

**Tuomikoski T.,** Felix M.-A., Dorée M. & Gruenberg J.: Inhibition of endocytic vesicle fusion *in vitro* by the cell-cycle control protein kinase cdc2. *Nature* 342, 942-945 (1989).

**Van der Sluijs P.,** Hull M., Zahraoui A., Tavitian A., Goud B., & Mellman I.: The Small GTP-Binding Protein rab4 Is Associated with Early Endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6313-6317 (1991).

**Van der Sluijs P.,** Hull M., Webster P., Male P., Goud B., & Mellman I.: The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70, 729-740 (1992 a).

**Van der Sluijs P.,** Hull M., Huber L.A., Male P., Goud B., & Mellman I.: Reversible phosphorylation-dephosphorylation determines the localization of rab4 during the cell cycle. *EMBO J.* 11 (12), 4379-4389 (1992 b).

**Van Dyke R.W. & Belcher J.D.:** Acidification of three types of liver endocytic vesicles: similarities and differences. *Am. J. Physiol.* 266: C81-94 (1994).

**Vasile E.,** Simunescu M. & Simunescu N.: Visualization of the binding, endocytosis and transcytosis of low density lipoproteins in the arterial endothelial cells in situ. *J. Cell Biol.* 96, 1677- 1689 (1983).

**Wall D.A. & Hubbard A.L.:** Receptor-mediated endocytosis of Asialoglycoproteins by rat liver hepatocytes: Biochemical characterization of the endosomal compartments. *J. Cell Biol.* 101, 2104-2112 (1985).

**Wan J.;** Taub M.E.; Shah D. & Shen W.C.: Brefeldin A enhances receptor-mediated transcytosis of transferrin in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 267(19): 13446-50 (1992).

**Warren G.:** Trawling for receptors. *Nature* 346, 318-319 (1990).

**Waters M.G.,** Griff I.C. & Rothman J.E.: Proteins involved in vesicular transport and membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 615-620 (1991).

**Watts C. & Marsh M.:** Endocytosis: What goes in and how?. *J. Cell Science* 103, 1-8 (1992).

**Wessling-Resnick M. & Braell W.A.:** The sorting and segregation mechanism of the endocytic pathway is functional in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* 265 (2), 690-699 (1990 a).

**Wessling-Resnick M. & Braell W.A.:** Characterization of the mechanism of endocytic vesicle fusion *in vitro* . *J. Biol. Chem.* 265 (28), 16751-16759 (1990 b).

**Wilschut J.:** Intracellular membrane fusion.

*Curr. Opin. Cell Biol.* 1: 639-647 (1989).

**Wilson D.W.,** Wilcox C.A., Flynn G.C., Chen E., Kuang W.-J., Henzel W.J., Block M.R., Ullrich A. & Rothman J.E.: A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast.

*Nature* 339, 355-359 (1989).

**Wilson D.W.,** Whiteheart S.W., Orci L. & Rothman J.E.: Intracellular membrane fusion. *TIBS* 16: 334-337 (1991).

**Wilson D.W.,** Whiteheart S.W., Wiedmann M., Brunner M. & Rothman J.E.: A multisubunit particle implicated in membrane fusion.

*J. Cell Biol.* 117 (3), 531-538 (1992).

**Wood S.A.,** Park J.E. & Brown W.J.: Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes. *Cell* 67, 591-600 (1991).

**Woodman P.G. & Warren G.:** Isolation of functional coated, endocytic vesicles.

*J. Cell Biol.* 112 (6), 1133-1141 (1991).

**Zen K.,** J Biwersi J., N Periasamy N. & AS Verkman A.S.: Second messenger regulate endosomal acidification in Swiss 3T3 fibroblasts.

*J. Cell Biol.* 119 (1), 99-110 (1992).

**Zerial M. & Stenmark H.:** Rab GTPases in vesicular transport.

*Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 613-620 (1993).

**Zhang J.,** Myers M. & Forgac M.: Characterization of the  $V_0$ -domain of the coated vesicle (H<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 267 (14), 9773-9778 (1992).

## ANHANG A: PUFFERLÖSUNGEN

### Krebs-Henseleith Puffer (KHB):

	mmol/l	mg/l	g/5 l
NaCl	118,40	6920	34,60
KCl	4,75	354	1,77
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,19	162	0,81
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,185	292	1,46
CaCl <sub>2</sub>	2,57	286	1,43
NaHCO <sub>3</sub>	25,00	2100	10,50
D-Glucose · H <sub>2</sub> O		1000	5,00
Na-Taurocholat		9	0,045

### Fusionspuffer:

	KAcSHM	KCISHM	SHM	KCIHM
K-Acetat:	100 mM	-	-	-
KCl:	-	100 mM	-	150 mM
Saccharose:	85 mM	85 mM	250 mM	-
Hepes:	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
MgCl <sub>2</sub> :	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM

mit KOH auf jeweils pH 7,4 eingestellt

### 10x Additiv-Puffer:

2% BSA	100 µl 10% BSA
20 mmol/l MgCl <sub>2</sub>	10 µl 1 mol/l MgCl <sub>2</sub>
10 mmol/l DTT	5 µl 1 mol/l DTT
200 µmol/l EGTA	12,5 µl 8 mmol/l EGTA
0,5 mg/ml Biocytin	25 µl Biocytin (10 mg/ml)
A. bidest.	347,5 µl

<b>10x ATP-regenerierender Puffer:</b>	<b>Endkonz.</b>
100 µl 40 mmol/l K-ATP	1 mmol/l
100 µl 200 mmol/l Phosphokreatin	5 mmol/l
20 µl (2200 units/ml) Phosphokreatin-Kinase	11 u/ml
200 µl Fusionspuffer	

**10x ATP-verbrauchender Puffer:**

5 µl Hexokinase-Suspension (Sigma H5625)  
 Zentrifugation: 2 min bei 12000 g, Entfernung des Überstandes, Zugabe von  
 40 µl 0,5 mol/l Deoxy-Glukose und 160 µl A. bidest.;  
 Endkonzentration: 5 u/ml Hexokinase, 10 mmol/l Deoxy-Glukose.

**10x Stop-Puffer:**

10% Triton X100	200 µl 25% Triton X100
1% SDS	25 µl 20% SDS
0,5 mg/ml Biocytin	25 µl Biocytin (10 mg/ml)
Fusionspuffer	250 µl

<b>10x Detergent:</b>	200 µl 25% Triton X100
	25 µl 20% SDS
	275 µl Fusionspuffer

<b>10x Block-Puffer:</b>	0,5 mol/l NaCl
	0,1 mol/l Tris/HCl pH 7,4
	0,01 mol/l EDTA

<b>1x Block-Puffer:</b>	Verdünnung des 10x Block-Puffers
	+ BSA (0,2%)
	+ SDS (0,1%)
	+Triton X100 (1%)



## **ANHANG B: The acidic environment in endocytic compartments (Johannes A. Schmid; Biochem. J. 303, 679-680 (1994))**

After coupling of ligands like low-density lipoproteins, transferrin, growth factors etc., to their corresponding receptors on the cytoplasmic membrane and the internalization via clathrin-coated pits, receptor ligand complexes enter endocytic compartments with an acidic environment. The acidification of the lumen is achieved by H<sup>+</sup>-ion pumping ATPases in the endosomal membrane. The endosomal acidity is important for the dissociation of (some) ligands from their receptors so that receptors can be recycled and used for further rounds of internalization. Different approaches to measure the apparent pH in endosomes indicated that the compartments are less acidic at earlier stages of endocytosis than at later ones. These differences were suggested to have a central role in the processing and sorting of internalized ligands since, *in vitro* various receptor ligand complexes dissociate at different pH-values [1,2].

The finding that acidification during endocytosis shows stage-specific differences implies that mechanisms for its regulation have to exist. Several possibilities for this regulation were discussed, like different numbers of ATPase molecules per vesicle, modulation of their activity (for instance by covalent modifications) or regulation of the ion permeabilities of endosomal membranes [1]. Subsequently, it was observed that in some cell strains 'early' endosomes can regulate their luminal acidity by modulation of the membrane potential, for example by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases [3,4] or by Cl<sup>-</sup>-channels which themselves can be modulated by second messengers [5].

Since H<sup>+</sup>-ATPases are electrogenic, that means they pump H<sup>+</sup>-ions without the movement of counter-ions, an interior positive membrane potential acts against a further acidification.

The attempts to quantify the degree of acidity in different endocytic compartments in terms of pH-values are reasonable for larger, vacuolar type compartments. For very

small compartments along the endocytic route, however, it seems to be questionable whether the classical pH-concept can be applied to the system.

Coated vesicles or carrier vesicles, for instance, with diameters of about 100 nm and a corresponding volume of  $5 \times 10^{-19}$  l, would contain mathematically only 0.3 free  $H^+$ -ions for maintaining a pH of 6.0 ( assuming volume =  $(4 \text{ radius}^3 \pi)/3$ ,  $10^{-6}$  mol  $H^+$ /l and  $6.022 \times 10^{23}$  ions/mol). That means not even one single free  $H^+$ -ion would have to be in such a vesicle to make it acidic.

In principle, the same considerations apply to small substructures that are part of the complex system of endosomes. They could be important for the entire process of endocytosis, since recent investigations showed that the shape of early endocytic compartments (at least of some cell types) is much more tubulo-reticular than previously assumed, with tubules of just 30 to 50 nm in diameter [6,7]. The observations of the endocytic traffic in living Hep-2 cells by video image microscopy that were carried out by Hopkins et al. [6], indicated that the endosomal system of these cells consists of a network of interconnected tubules through which boluses move that carry receptor ligand complexes. The boluses could be identical to multivesicular bodies or carrier vesicles that are observed in electron microscopy, since the connecting tubules that do not appear in electron microscopical pictures seem to be sensitive to the chemical fixatives usually used for the preparation for microscopy.

These findings led to a new conception of endosomes as interconnected networks where boluses move along tubules trawling for receptors [8]; an idea that is somehow contradictory to the classical models of endocytosis with separate endosomes.

If we want to apply the classical pH-concept to such tubular endosomes of 30 nm diameter, we come to the conclusion that a pH of 6.0 would mean only one free  $H^+$ -ion in a section of more than 2  $\mu\text{m}$ . Therefore it seems obvious that we have to think in terms of probabilities of occurrence of  $H^+$ -ions rather than concentrations for the submicroscopical environment of these compartments. According to the pH-theory there could be an  $OH^-$ -ion in the tubule as well, but the probability for it would be

much lower than for an  $H^+$ -ion. Since the molecular basis for the pH-dependent dissociation of receptor ligand complexes is not clear, we cannot conclude that certain conditions that are necessary *in vitro* are equally important for the dissociation within the endosomal system *in vivo*. It is imaginable that a certain frequency of collisions between  $H^+$ -ions and receptors is necessary for a conformational change of the receptor and the dissociation of the ligand. On the other hand, a certain probability of occurrence of  $H^+$ -ions relative to  $OH^-$ -ions could influence the probability of the open state of the receptor and the dissociation of the ligand would just occur if the receptor remained in its open state over a given period of time. We could think of the probability distribution of  $H^+$ -ions as an  $H^+$ -ion orbital. The density of the orbital at a defined site would be proportional to the activity of  $H^+$ -ions at this position. Thus the distance between  $H^+$ -ATPases and receptors would be important for the interaction of  $H^+$ -ions with the receptor ligand complex and its dissociation.

Besides the lack of exact knowledge about the interaction of receptors with  $H^+$ -ions *in vivo* we have no detailed understanding about the behaviour of  $H^+$ -ions themselves in the endosomal micro-environment. The pH-value describes the activity of  $H^+$ -ions only for ideal aqueous solutions with sufficient precision. Within endosomes, however, we have high protein concentrations and a big number of ionic charges and we do not know the activity coefficient of  $H^+$ -ions in these solutions. It is unlikely that the classical rules of free diffusion apply to the case of a heterogeneous phospholipid-bilayer enclosed environment like the endosomal lumen. It is possible that the activity coefficient or the probability of occurrence of  $H^+$ -ions is higher in the proximity of the membrane compared with more distal regions, due to the inside positive membrane potential. The radial mobility of  $H^+$ -ions in the tubule could be reduced by the membrane potential whereas the overall mobility could be influenced by the charged phospholipid groups. On the other hand, ion gradients along the membrane tubule or axial potential differences could regulate the axial mobility of  $H^+$ -ions as well. A belt of  $Na^+/K^+$ -ATPases, for instance, could generate a positive

zone which acts as a barrier for the movement of  $H^+$ -ions or in other terms lowers the density of their probability distribution.

Since the endosomal membrane has a high permeability for  $H^+$ -ions as long as counter-ions are available [9],  $H^+$ -ions pumped into the endosomal lumen by  $H^+$ -ATPases can get out again with a certain probability, leading to a lateral decrease of the orbital density depending on the distance from the  $H^+$ -ATPase.

These characteristics as well as the possibility of barrier zones for  $H^+$ -movement would mean that different regions of complex endocytic compartments or tubulo-reticular endosomes can be differently acidic, even if they are linked. If this possibility proves to be true, it would defeat one of the main criticisms of the concept of an endosomal reticulum, namely the argument that it cannot explain the occurrence of differently acidic endosomal compartments and the functional role of pH-differences for endocytic traffic.

Regardless which model of endocytosis is closer to reality, we should be careful not simply to transfer idealized concepts which were developed for the inorganic chemistry of aqueous solutions, like the pH-concept, to the submicroscopical level of biological systems if we want to consider the complexity of these systems.

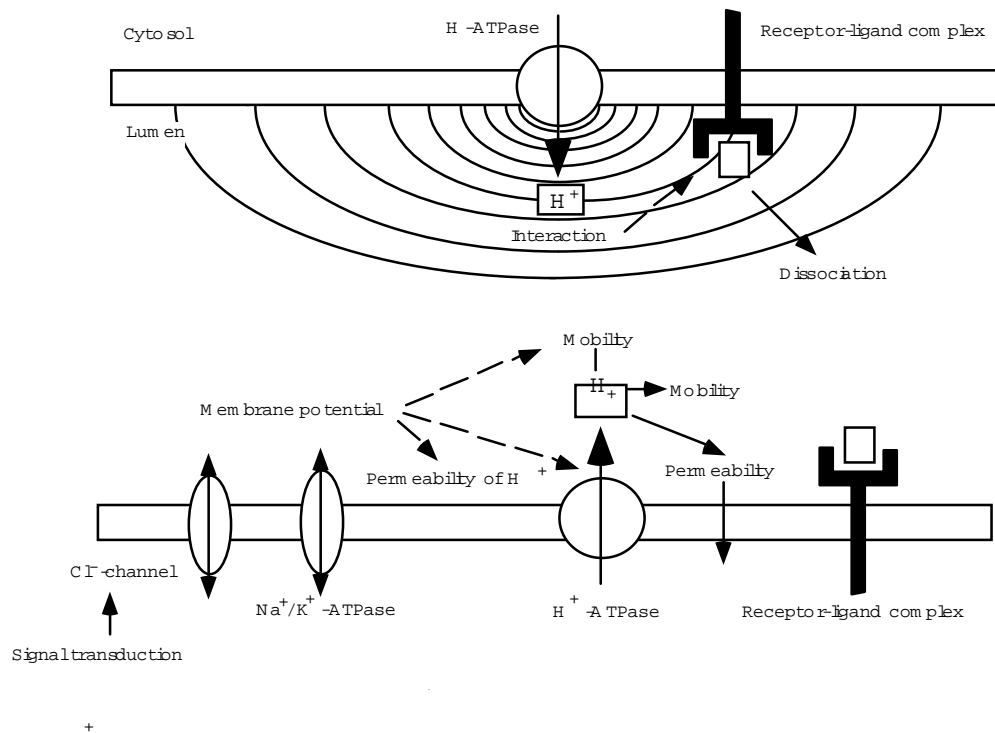
**Johannes A. Schmid**

*Department of General and Experimental Pathology*

*University of Vienna*

*AKH, Waehringer Guertel 18-20,*

*A-1090 Vienna, Austria*



**Figure 1: Model of the acidic micro-environment in endocytic compartments**

The contour lines around the  $H^+$ -ATPase in the upper part of the figure indicate the density of the  $H^+$ -orbital (the probability of occurrence of  $H^+$ -ions). The distance of a receptor ligand complex from the  $H^+$ -ATPase and therefore the position in the  $H^+$ -orbital would be important for the probability of dissociation. The lower part shows the possible influence of the membrane potential which is modulated by ion channels or electrogenic ion pumps, on the  $H^+$ -ATPase, the permeability of  $H^+$ -ions through the endosomal membrane and their mobility in the lumen.

## References:

- 1 Mellman, I., Fuchs, R. and Helenius, A. (1986) *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 663-700
- 2 Hubbard, A.L. (1989) *Curr. Opinion Cell Biol.* **1**, 675-683
- 3 Fuchs, R., Schmid, S. and Mellman, I. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 539-543
- 4 Cain, C.C., Sipe, D.M. and Murphy, R.F. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 544-548
- 5 Zen, K., Biwersi, J., Periasamy, N. and Verkman, A.S. (1992) *J. Cell Biol.* **119**, 99-110
- 6 Hopkins, C.R., Gibson, A., Shipman, M and Miller, K. (1990) *Nature* **346**, 335-339
- 7 Tooze, J. and Hollinshead, M. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 635-653
- 8 Warren, G. (1990) *Nature* **346**, 318-319
- 9 Fuchs, R., Male, P. and Mellman, I. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 2212-2220

## ABKÜRZUNGEN

A431	humane Adenokarzinom-Zelllinie
AtT20	neuroendokrine Zelllinie
A. bidest.	Aqua bidestillata
Abb.	Abbildung
ASOR	Asialo-Orosomucoid
ADP	Adenosin-Diphosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATP $\gamma$ S	Adenosin- $\gamma$ -thio-Triphosphat
BASOR	biotinyliertes Asialo-Orosomucoid
BHK	Baby Hamster Kidney - Cells
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
CHO	Chinese Hamster Ovary - Cells
cpm	counts per minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	decays per minute
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	2-(Aminoethyl)-Glykolether-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter (Lichtstreuung nach vorne)
GTP	Guanosintriphosphat
GTP $\gamma$ S	Guanosin- $\gamma$ -Thio-Triphosphat
h	Stunden
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IE	Internationale Einheiten
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Hep 2	humane Karzinom-Zelllinie
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HepG2	humane Hepatom-Zelllinie
HRP	Horse Radish Peroxidase (Kren-Peroxidase)

K562	eine humane erythroleukämische Zelllinie
kDa	Kilodalton
KAcSHM	K-Acetat/Saccharose/Hepes/Magnesium-Puffer
KCIHM	KCl/Hepes/Magnesium-Puffer
KCISHM	KCl/Saccharose/Hepes/Magnesium-Puffer
KHB	Krebs-Henseleith-Buffer
LDL	Low Density Lipoprotein
MDCK	Madin Darby Canine Kidney-Cells
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
min	Minuten
NEM	N-Ethylmaleinimid
NSF	NEM-sensitive factor
PBS	Phosphate Buffered Saline Solution
pIgA	polymeres Immunglobulin A
PC12	neuroendokrine Zelllinie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Postnuclear Supernatant
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen/min)
R.T.	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Na-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHM	Saccharose/Hepes/Magnesium-Puffer
sec	Sekunden
SNAP	soluble NSF attachment protein
SNARE	SNAP-Rezeptor
SSC	Side Scatter (Lichtstreuung im Winkel von 90°)
TBS	Tris buffered saline solution
TGN	trans-Golgi network (trans-Golgi Reticulum)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
t-SNARE	target SNAP-receptor (target soluble N-ethylmaleimid sensitive factor attachment protein receptor)
Vero	Fibroblasten-Zelllinie
v-SNARE	vesicular SNAP-receptor