**Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II –**
**Molekulare Zellbiologie**
**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**
**Direktorin: Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel**

# Bedeutung des LDL-Rezeptor-Related Protein 1 für den zellulären Stoffwechsel der ApoE-Isoformen

**Dissertation**
**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von**
**Marijke Sornsakrin**
**aus Hamburg**

**Hamburg 2007**

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 29. Oktober 2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. h.c. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. M. Merkel

Prüfungsausschuss: Stellvertreter: Prof. Dr. F. Rinninger

# Inhaltsverzeichnis

**1 Arbeitshypothese und Fragestellung 1**

**2 Einleitung 2**

2.1 Stoffwechsel der Lipoproteine 2
2.1.1 Stoffwechselwege exogener Lipide 3
2.1.2 Stoffwechselwege endogener Lipide 5
2.2 Bedeutung der Lipoprotein-Rezeptoren 6
2.2.1 Struktur und Funktion von Lipoprotein-Rezeptoren 6
2.2.2 Rolle von LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel 10
2.2.3 Wirkung von Insulin auf LRP1 10
2.3 Intrazellulärer Stoffwechsel von Chylomikronen-Remnants 12

**3 Material und Methoden 18**

3.1 Geräte 18
3.2 Verbrauchsmittel 18
3.3 Chemikalien 19
3.4 Zellkultur 19
3.5 DNA-Transfektion in HEK293- und HIR-11-Zellen 20
3.6 Proteinbestimmung nach SDS-Lowry 21
3.7 Herstellung von Fluoreszenz-markierten Liganden 22
3.7.1 Präparation von TRL und trypsinierten TRL 22
3.7.2 Markierung von rekombinanten ApoEx und Assoziation an TRL 23
3.8 Aufnahme-Experimente 26
3.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 28
3.8.2 In Gel Fluoreszenzdetektion und Quantifizierung 28
3.9 Pulse-Chase-Experimente 29
3.10 Western Blot 30
3.10.1 Multiplex-Western 32
3.11 Indirekte Fluoreszenz 33
3.12 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie 34

**4 Ergebnisse 35**

4.1 Präparation und Charakterisierung Fluoreszenz-markierter Lipoproteine 35
4.2 LRP1-EGFP-Expression in HEK293-Zellen 38
4.3 Insulin-abhängige Aufnahme von LRP1-Liganden 48
4.4 LRP1-abhängiges ApoE-Recycling 55

**5 Diskussion 60**

5.1 Bedeutung von LRP1 für die Aufnahme postprandialer Lipoproteine 60
5.2 Bedeutung von LRP1 für das ApoE-Recycling 64

**6 Zusammenfassung 67**

**7 Literaturverzeichnis 68**

**8 Anhang 80**

8.1 Abkürzungsverzeichnis 80
8.2 Danksagung 81
8.3 Lebenslauf 82
8.4 Erklärung 83

# 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Während die postprandial im Darm synthetisierten Chylomikronen (CM) im Blut von der Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert werden, wird Apolipoprotein E (ApoE) von Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) auf die entstehenden CM-Remnants (CR) transferiert. ApoE bindet an hepatische Lipoprotein-Rezeptoren, insbesondere an den LDL-Rezeptor (LDLR) und das LDL-Rezeptor-Related Protein 1 (LRP1) (Beisiegel, 1995). Die Bindungsaffinität der drei ApoE-Isoformen an den LDLR, und damit auch ihre zelluläre Aufnahme, ist unterschiedlich groß (Schneider et al., 1981). In dieser Arbeit sollte im ersten Teil untersucht werden, inwieweit LRP1 die Aufnahme von CR in Abhänigigkeit von den ApoE-Isoformen beeinflusst. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls untersucht, ob das anabol wirkende, postprandial ausgeschüttete Hormon Insulin diesen Prozess beeinflusst.

Nach Internalisierung ApoE-haltiger CR entgeht ApoE dem Degradierungsweg und gelangt über periphere Endosomen zurück zur Plasmamembran, wo es resezerniert wird (Heeren et al., 2001). Dieser Prozess wird durch HDL induziert (Heeren et al., 2003) und gewährleistet vermutlich eine hohe ApoE-Plasmaverfügbarkeit in der postprandialen Phase. In diesem Zusammenhang wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht, welche Rolle LRP1 für das HDL-induzierte Recycling der ApoE-Isoformen spielt und inwieweit sich das Recycling der drei Isoformen voneinander unterscheidet.

# 2 Einleitung

## 2.1 Stoffwechsel der Lipoproteine

Lipide gehören neben Kohlenhydraten und Eiweißen zu den wichtigsten Energielieferanten des menschlichen Organismus. Sie sind außerdem Grundbestandteil von biologischen Membranen, Steroidhormonen und Gallensäuren. Durch den Transport im Blutplasma werden den einzelnen Organen Lipide zugeführt und zwischen den Geweben ausgetauscht. Es lassen sich freie Fettsäuren, Phospholipide und freies Cholesterin von den hydrophoben Triglyzeriden und Cholesterinestern unterscheiden. Während freie Fettsäuren im Plasma überwiegend an Albumin gebunden transportiert werden, werden die anderen Lipide, aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit, zu mizellaren Komplexen mit Proteinen, den Apolipoproteinen, zusammengesetzt. Es entstehen die sogenannten Lipoproteine (Havel und Kane, 2001). Diese Partikel bestehen aus zu Mizellen angeordneten Oberflächenkomponenten, den Phospholipiden, freiem Cholesterin und den Apolipoproteinen, davon zu unterscheiden sind die im Kern angeordneten hydrophoben Triglyzeride und Cholesterinester. Lipoproteine werden nach Dichte, Größe, elektrischer Ladung und Lipid-Apolipoproteinanteilen in fünf verschiedene Klassen unterteilt (Gotto et al., 1986). Die Dichte steigt mit abnehmender Größe der Partikel. Die größten und zugleich mit der geringsten Dichte ausgestatteten Lipoproteine sind die triglyzeridreichen CM. Sie weisen eine Dichte von δ=0,93 g/ml und einen Durchmesser von Ø 75-1200 nm auf, sie bestehen zu 98% aus Lipiden, wobei die Triglyzeride hier den weitaus größten Anteil einnehmen. Der Proteinanteil der CM beträgt nur etwa 2%. Mit zunehmender Dichte und abnehmendem Durchmesser sowie abnehmendem Triglyzerid- und zunehmendem Apolipoprotein-Anteil folgen die *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL, Ø 30-80 nm, δ=0,93-1,006 g/ml), die *Intermediate Density Lipoproteins* (IDL, Ø 25-35 nm, δ=1,006-1,019 g/ml), die *Low Density Lipoproteins* (LDL, Ø 18-25 nm, δ=1,019-1,063 g/ml) und die *High Density Lipoproteins* (HDL, Ø 5-12 nm, δ=1,063-1,210 g/ml), die einen Apolipoproteinanteil von bis zu 55% aufweisen können.

Apolipoproteine ermöglichen den Lipiden die Löslichkeit im Blutplasma und spielen, zusammen mit ihren Rezeptoren, eine entscheidende Rolle im Lipidstoffwechsel (Ribalta et al., 2003). Sie bestimmen die Geschwindigkeit des Lipoproteinumsatzes, vermitteln über Interaktion mit Oberflächenproteinen und Rezeptoren die spezifische Aufnahme in die Zelle, sind als Kofaktoren an verschiedenen enzymatischen Reaktionen beteiligt und stabilisieren die Lipoproteinstruktur mittels amphipathischer Helices.

Im Lipoproteinmetabolismus des Menschen läßt sich grundsätzlich der Stoffwechselweg über die Nahrung zugeführter Lipide von der Verstoffwechselung vom Organismus selbst synthetisierter Lipide unterscheiden. Es kann somit von einem exogenen und einem endogenen Stoffwechselweg der Lipide gesprochen werden.

### 2.1.1 Stoffwechselwege exogener Lipide

Die mit der Nahrung zugeführten Triglyzeride werden nach Emulgation durch die Magen- und Pankreaslipase in Di- und Monoglyzeride sowie freie Fettsäuren gespalten. Die entstandenen Spaltprodukte bilden mit Gallensäuren, Cholesterin und Phospholipiden Mizellen, die von den Dünndarmepithelzellen resorbiert werden, wobei die Gallensäuren über den enterohepatischen Kreislauf wieder in die Leber gelangen. Vor Integration in Mizellen werden die mit der Nahrung aufgenommenen Cholesterinester durch die pankreatische Cholesterinesterase hydrolysiert. Kurzkettige Fettsäuren gelangen, aufgrund ihrer relativ guten Wasserlöslichkeit, über die Vena Portae zur Leber. Langkettige Fettsäuren hingegen werden in den Enterozyten zur Resynthese von Triglyzeriden genutzt. Dies geschieht durch Übertragung freier Fettsäuren auf β-Monoglyzeride oder durch komplette Neusynthese aus α-Glyzerophosphat und freien Fettsäuren. In den Mucosazellen wird das resorbierte Cholesterin verestert und mit Triglyzeriden, Phospholipiden und Apolipoproteinen (ApoA-I, ApoA-IV und ApoB-48) zu triglyzeridreichen CM komplexiert. Die CM werden in der Lymphe transportiert und unter Umgehung der Leber über den Ductus Thoracicus dem venösen Blutkreislauf zugeführt (Hussain et al., 1996; Kane, 1996). Sowohl im Interstitium der Dünndarmzotten als auch im Blut nehmen die CM aus HDL stammende Apolipoproteine ApoC-I, ApoC-II und ApoC-III auf, wobei ApoC-II essentieller Kofaktor der LPL ist. Durch die katalytische Aktivität der endothelständigen LPL, die den Heparansulfatproteoglykanen der extrazellulären Matrix aufsitzt, werden die Triglyzeride der CM intravaskulär hydrolysiert. Im Fett- und Muskelgewebe werden die entstehenden freien Fettsäuren nun als Triglyzeride gespeichert oder durch ß-Oxidation der Energiegewinnung zur Verfügung gestellt (Olivecrona und Olivecrona, 1995; Mahley und Ji, 1999; Merkel et al., 2002). Im Verlauf der intravaskulären Lipolyse wird von HDL stammendes ApoE auf die CM transferiert (Imaizumi et al., 1978; Imaizumi et al., 1978), überschüssige Apolipoproteine und Phospholipide werden abgegeben. Es entstehen die kleineren sogenannten CM-Remnants, an die nun ebenfalls die LPL assoziiert ist (Zambon et al., 1996). Die LPL bindet mit hoher Affinität an LRP1 und kann so die CR-Aufnahme vermitteln (Beisiegel et al., 1991; Heeren et al., 2002; Zheng et al., 2006). Durch Bindung an hepatische Lipoprotein-Rezeptoren

vermittelt ApoE die CR-Aufnahme in Hepatozyten, die Affinität der CR zu LDLR und LRP1 wird durch ApoE wesentlich erhöht (Bradley und Gianturco, 1986; Beisiegel et al., 1989; Kowal et al., 1989; Beisiegel et al., 1991; Beisiegel, 1995; Beisiegel und Heeren, 1997; Rohlmann et al., 1998).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem ubiquitär in allen Geweben vorkommenden (Swertfeger und Hui, 2001) ApoE und seinen Isoformen E2, E3 und E4, die durch die Allele epsilon II, epsilon III und epsilon IV kodiert werden. Die Allelfrequenz liegt für εII bei 11%, für εIII bei 72%, und für εIV bei 17% (Zannis et al., 1981). Dieser genetische Polymorphismus führt zu einem Aminosäurenaustausch an den Positionen 112 und 158 (Utermann et al., 1980; Mahley und Rall, 2000). Die häufigste Isoform E3 besitzt an der Position 112 ein Arginin und an der Position 158 ein Cystein, während ApoE2 an beiden Positionen ein Cystein und ApoE4 an beiden Positionen ein Arginin aufweist (Weisgraber et al., 1981; Chou et al., 2005). ApoE besteht aus 299 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 34 kDa auf (Chou et al., 2005). ApoE kommt eine entscheidende Rolle im Lipoproteinstoffwechsel zu. Durch seine Interaktion mit Mitgliedern der LDL-Rezeptor-Familie (Beisiegel et al., 1989) ist es wichtiger Bestandteil in der Vermittlung der zellulären Aufnahme von CR sowie beim Transport von Lipiden im Plasma und Zentralnervensystem. Es hat Einfluß auf die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen, der Alzheimer Erkrankung, wirkt mit in der Regulation von Immunprozessen und möglicherweise sogar bei Infektionserkrankungen (Mahley und Rall, 2000; Hatters et al., 2006). Die drei Isoformen haben unterschiedliche Auswirkungen auf das Risiko eine Atherosklerose oder die Alzheimer Erkrankung zu entwickeln. ApoE3 wird als Normvariante der Isoformen betrachtet (Mahley und Rall, 2000). ApoE3 und ApoE4, nicht jedoch ApoE2, zeigen eine starke Bindungsaffinität an den LDLR (Schneider et al., 1981). Die verminderte, LDLR-vermittelte, Internalisierung ApoE2-haltiger CR in die Leber führt zu einer Akkumulation von postprandialen CR im Plasma. Dies trägt zu der Assoziation des ApoE2-Allels mit der familiären Hyperlipoproteinämie Typ III bei (Mahley, 1988; Mahley und Rall, 2000). Dabei kommt es zu erhöhten Triglyzerid- und Cholesterinwerten im Plasma sowie zu einem erhöhten Atheroskleroserisiko (Mahley et al., 1999). Jedoch entwickeln lediglich 5% der homozygoten ApoE2-Träger eine Hyperlipoproteinämie (Mahley et al., 1999). Dieser scheinbare Widerspruch kann mit der hepatischen Expression von LRP1 erklärt werden. LRP1 bindet, im Gegensatz zum LDLR, ApoE2 und ApoE3 mit vergleichbarer Affinität (Ruiz et al., 2005). Auf diese Weise könnte LRP1 die verminderte ApoE2-CR-Aufnahme über den LDLR kompensieren. Weiterhin konnte in vitro gezeigt werden, dass die CR-assoziierte LPL die eingeschränkte ApoE2-Funktion durch Interaktion mit Proteoglykanen und Lipoprotein-Rezeptoren ausgleichen kann (Mann et

al., 1999). Es ist jedoch bisher nicht geklärt, ob dies auch in vivo einen effizienten Kompensationsmechanismus darstellt. ApoE4 hat, im Vergleich zu ApoE3, eine leicht erhöhte Affinität gegenüber dem LDLR und vermittelt sehr effizient die Internalisierung triglyzeridreicher Lipoproteine (Bohnet et al., 1996; Knouff et al., 1999; Heeren et al., 2004). Es bindet im Plasma mit höherer Affinität an VLDL und weniger an HDL, wohingegen ApoE3 bevorzugt mit HDL assoziiert ist (Gregg et al., 1986; Weisgraber, 1990; Dong et al., 1994; Saito et al., 2003). ApoE4 korreliert mit hohen LDL-Cholesterin-Spiegeln, erhöhten Triglyzerid- sowie niedrigen HDL-Werten (Davignon et al., 1988; Dallongeville et al., 1992), es ist assoziiert mit einem erhöhten Atheroskleroserisiko und der Entwicklung der Alzheimer Erkrankung (Davignon et al., 1988; Roses, 1996; Mahley und Rall, 2000).

### 2.1.2 Stoffwechselwege endogener Lipide

Im Hungerzustand ist der Körper in der Lage, triglyzeridreiche VLDL in der Leber zu synthetisieren, um periphere Gewebe mit Lipiden zu versorgen. Triglyzeride werden als Substrate der Energiegewinnung zur Verfügung gestellt, Cholesterin wird als Membranbaustein und für die Synthese von Steroidhormonen und Vitamin D bereitgestellt. Im Verlauf des peripheren VLDL-Abbaus entstehen IDL und LDL. Jedes in der Leber synthetisierte VLDL-Partikel enthält ein Molekül ApoB-100, ApoE und kleine Mengen ApoC. Je nach Partikelgröße, Dichte und entsprechender Flotationsrate in der Ultrazentrifuge werden große, triglyzeridreiche $VLDL_1$ von kleineren, triglyzeridarmen $VLDL_2$ unterschieden (Packard und Shepherd, 1997). Gelangen die VLDL durch Exozytose in den Disse-Raum und anschließend in die Blutzirkulation, nehmen sie weitere Moleküle ApoE und ApoC von HDL auf. Die endothelständige LPL katalysiert, aktiviert durch ApoC-II, die Hydrolyse der Triglyzeride in den VLDL, ähnlich wie bei den CM. Dabei werden ApoC und freies Cholesterin auf HDL transferiert und freie Fettsäuren für die peripheren Gewebe bereitgestellt. Es entstehen die IDL, diese sind kleiner und relativ reich an Cholesterinestern und ApoE. Bedingt durch ihren hohen ApoE-Anteil können sie direkt über den LDL-Rezeptor wieder in die Hepatozyten aufgenommen werden. Es können jedoch alternativ, nach weiterer LPL- und Hepatische Lipase-vermittelter Hydrolyse der Triglyzeride, aus IDL auch LDL entstehen. Dabei geht ihr ApoE-Anteil verloren und es werden, vermittelt durch die Aktivität des Cholesterin-Ester-Transfer-Proteins, Cholesterinester aus HDL aufgenommen. Die cholesterinreichen LDL können nun über die rezeptorbindende Domäne des ApoB-100 via LDL-Rezeptor in Hepatozyten und extrahepatische Gewebe aufgenommen werden (Brown und Goldstein, 1986), um diese

mit Cholesterin zu versorgen. Die Regulation der intrazellulären Cholesterinkonzentration erfolgt zum einen über die Expression des LDLR, zum anderen über die Induktion von Schlüsselenzymen der zellulären de-novo-Synthese. Ein weiterer Mechanismus des LDL-Katabolismus wird als Scavenger-Pathway bezeichnet. Dieser LDLR-unabhängige Mechanismus ist nicht sättigbar und übernimmt etwa ein Drittel der zellulären LDL-Aufnahme über adsorptive Endozytose, Pinozytose und Scavenger-Rezeptoren, die spezifisch modifizierte LDL binden können. Eine erhöhte LDL-Konzentration im Plasma ist nachgewiesen als wesentlicher Risikofaktor für atherosklerotische Gefäßveränderungen und damit für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung (Austin, 1991; Gotto, 1998; Wilson et al., 1998; Karpe, 1999). Besonders kleine dichte LDL werden nur langsam aus dem Plasma eliminiert, sind leicht oxidierbar und können, aufgrund ihrer hohen Affinität zu Proteoglykanen des Gefäßendothels, leicht an Gefäßwänden binden und diese penetrieren (Lamarche et al., 1997). Nach oxidativen Veränderungen können LDL in Endothelzellen die Ausprägung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen stimulieren und so eine Steigerung der Plättchenaggregation bewirken. Zudem kann nun LDL-Cholesterin über Interaktion mit Scavenger-Rezeptoren in Makrophagen aufgenommen werden. Makrophagen transformieren auf diese Weise in sogenannte Schaumzellen, die bereits im frühen Verlauf atherosklerotischer Läsionen beobachtet werden (Krieger und Herz, 1994; Shashkin et al., 2005). Cholesterin kann vom Organismus nur in Form von freiem Cholesterin oder als Gallensäuren über die Leber, über den sogenannten reversen Cholesterintransport, ausgeschieden werden.

## 2.2 Bedeutung der Lipoprotein-Rezeptoren

### 2.2.1 Struktur und Funktion von Lipoprotein-Rezeptoren

Lipoprotein-Rezeptoren können in der LDL-Rezeptor-Familie zusammengefaßt werden, ihr Aufbau verfügt über charakteristische Strukturdomänen (Schneider und Nimpf, 2003). Sie spielen eine entscheidende Rolle in der rezeptorvermittelten Endozytose vieler unterschiedlicher Liganden, darunter, wie oben beschrieben, die verschiedenen Lipoproteine. Sie regulieren diverse biologische Prozesse, wie Proteaseaktivität oder Lipid- und Vitaminstoffwechsel. Einige Mitglieder der Familie nehmen auch an zellulären Signaltransduktionswegen und an Entwicklung und Erhalt des Nervensystems teil (Herz und Bock, 2002; Nykjaer und Willnow, 2002; Strickland et al., 2002; Stolt und Bock, 2006). Wichtige Mitglieder dieser Familie sind LDL-Rezeptor (LDLR) (Brown und Goldstein,

1986), LDLR-Related Protein (LRP1) (Herz et al., 1988), Megalin (LRP2, GP 330) (Raychowdhury et al., 1989), *very low-density lipoprotein receptor* (VLDLR) (Takahashi et al., 1992), LR 11 (sorLA) (Yamazaki et al., 1996), *apolipoprotein E receptor type 2* (apoER2) (Kim et al., 1996), LRP-3,-4,-5,-6 und LRP1B (Schneider und Nimpf, 2003). Das hier zu besprechende LRP1 unterscheidet sich von den übrigen Mitgliedern der LDLR-Familie sowohl in Größe (Herz und Strickland, 2001) als auch in vermittelter Endozytoserate (Li et al., 2001).

LRP1 erhielt seinen Namen aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum LDLR (Herz et al., 1988). Es wird vorwiegend in der Leber und im Gehirn exprimiert. LRP1 verfügt, wie der LDLR, über die für die Ligandenbindung notwendige Eigenschaft, Calcium zu binden. Es handelt sich um einen ubiquitär vorkommenden (Moestrup et al., 1992), multifunktionalen Rezeptor, der identisch mit dem α2-Makroglobulin-Rezeptor ist (Strickland et al., 1990). LRP1 ist ein 600 kDa großes, aus 4525 Aminosäuren bestehendes Oberflächenprotein, es wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Die N-terminale, extrazelluläre Domäne umfasst 4400 Aminosäuren, es folgen die Transmembrandomäne aus 25 und der C-terminale, intrazelluläre Teil aus 100 Aminosäuren (Herz et al., 1990). In dem trans-Golgi-Kompartiment erfolgt die proteolytische Spaltung des 600 kDa umfassenden Vorläuferproteins (Herz et al., 1990), es wurde hierfür die Protease Furin identifiziert (Willnow et al., 1996). Dabei entstehen zwei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 515 bzw. 85 kDa. Die größere N-terminale α-Untereinheit ist über eine nichtkovalente Bindung mit der kleineren C-terminalen β-Untereinheit verbunden (Herz et al., 1990). Die proteolytische Prozessierung durch Furin ist für den intrazellulären Transport von LRP1 scheinbar nicht notwendig, eine reduzierte Aktivität von Furin korreliert jedoch mit einer verminderten, über LRP1 vermittelten Endozytoserate (Willnow et al., 1996). Studien mit der avianen Form von LRP1 ergaben wiederum keine Notwendigkeit der proteolytischen Prozessierung für die Endozytosefunktion von LRP1 im Huhn (Ko et al., 1998). In seiner Struktur enthält LRP1 die für die LDLR-Familie charakteristischen Einheiten (Abb. 1). Im extrazellulären Teil finden sich die cysteinreichen Ligandenbindungsdomänen (Neels et al., 1999) und *Epidermal Growth Factor*- (EGF-) Vorläufer-Homologiedomänen, letztere bestehend aus drei EGF-Repeats und sechs YWTD-Repeats, die in einer propellerähnlichen Struktur angeordnet sind (Springer, 1998). Es folgt die Transmembrandomäne, der sechs EGF-Repeats vorausgehen. Die intrazelluläre Domäne besteht aus zwei NPxY-Motiven (Asparagin-Prolin-x-Tyrosin), die als Erkennungssignal einer schnellen Internalisierung des Rezeptors von der Zelloberfläche dienen (Chen et al., 1990; Herz und Strickland, 2001; Stolt und Bock, 2006) und weiterhin aus einem YxxL-

Motiv, das als dominantes Endozytose-Signal beschrieben wird (Li et al., 2000). In LDLR, VLDLR oder apoER2 ist das YxxL-Motiv nicht zu finden (Schneider und Nimpf, 2003).

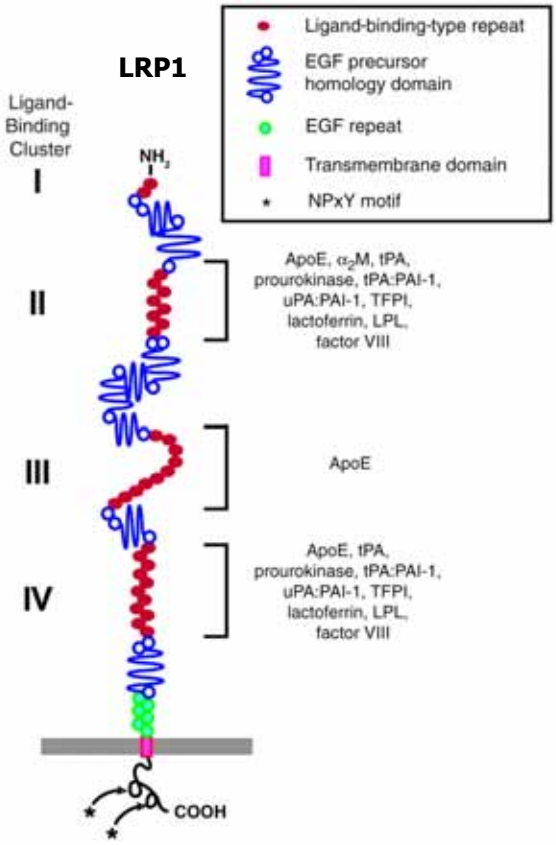


**Abb. 1: Struktur des LDL-Rezeptor-Related Protein 1 (LRP1)** (Herz und Strickland, 2001)**.** Die Ligandenbindungsdomänen von LRP1 sind in vier Bindungsclustern angeordnet. Jedem Cluster folgt eine oder mehrere EGF-Homologiedomänen. Der Transmembrandomäne gehen EGF-Repeats voraus. Der zytoplasmatische Teil besteht aus zwei NPxY-Motiven.

Die Ligandenbindungsdomänen lassen sich in die Bindungscluster I bis IV unterteilen. Für Cluster I ist bisher keine Ligandeninteraktion beschrieben. Cluster II und IV binden die Mehrzahl der momentan beschriebenen LRP1-Liganden, die meisten von ihnen binden mit gleicher Affinität an beide genannten Bindungsdomänen. ApoE bindet auch an Cluster III. LRP1 besitzt die Fähigkeit, mehr als 30 strukturell unterschiedliche Liganden mit hoher Affinität zu binden. Diese Befähigung ergibt sich aus Struktur und Verteilung der Ligandenbindungsdomänen sowie aus den zahlreichen Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor (Neels et al., 1999; Herz und Strickland, 2001).

LRP1 fungiert sowohl als Endozytose-Rezeptor als auch als wichtiges regulierendes Protein in verschiedenen Signaltransduktionswegen. Im Kapitel 2.2.2 wird die rezeptorvermittelte Endozytose im Bereich des Lipoproteinstoffwechsels näher

beschrieben. Auch außerhalb des Lipoproteinstoffwechsels finden sich zahlreiche Liganden, über deren Internalisierung LRP1 einen wesentlichen Einfluß auf Regulation und Homöostase des Stoffwechsels hat. Zu den extrazellulären Liganden zählen u.a. Proteasen und Protease-Inhibitor-Komplexe (Strickland et al., 1990), Infektionserreger sowie ihre Toxine, die teils ausschließlich über LRP1 von der Zelle internalisiert werden (Kounnas et al., 1992; Herz und Strickland, 2001). LRP1 soll zudem indirekt in die Regulation der Aktivität lysosomaler Enzyme involviert sein, die für die intrazelluläre Degradierung von Lipiden zuständig sind. Dies erfordert ein Sphingolipid-Aktivator-Protein, dessen Transport durch LRP1 und den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor vermittelt wird (Hiesberger et al., 1998; Herz und Strickland, 2001).

Einen Hinweis auf die entscheidende Rolle von LRP1 bei der Signaltransduktion in unterschiedlichen Geweben geben Studien, in denen LRP1, nach Bindung des Liganden α2-Makroglobulin, den neuronalen Calcium-Einstrom über den N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA-) Rezeptor vermittelt (Bacskai et al., 2000). Bei der Protektion der Gefäßwand kommt LRP1 ebenfalls eine wichtige Funktion zu. Der *platelet-derived growth factor* (PDGF) vermittelt, über seinen gleichnamigen Rezeptor, die Proliferation glatter Muskelzellen, fördert die Aneurysmabildung und über die Einlagerung von LDL-Cholesterin in die Gefäßwand die Bildung von Atherosklerose. LRP1 formt einen Komplex mit dem PDGF-Rezeptor (PDGFR) und kann darüber die Unversehrtheit der Gefäßwand erhalten und der Atherosklerose mittels Kontrolle der PDGFR-Aktivität vorbeugen (Boucher et al., 2003). PDGF scheint darüber hinaus auch direkt an LRP1 zu binden. Es wird ein Co-Rezeptorverhältnis von LRP1 und PDGFR beschrieben, nach PDGF-Stimulation co-lokalisieren die Rezeptoren in *coated pits* und endosomalen Kompartimenten. Der vom PDGFR initiierte Signaltransduktionsweg kann scheinbar von LRP1 moduliert werden (Newton et al., 2005). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass ApoE inhibierend auf die PDGF-induzierte Zellmigration wirkt, dabei ist die vorherige ApoE-Bindung an LRP1 erforderlich (Swertfeger und Hui, 2001; Swertfeger et al., 2002). Studien zeigten weiterhin, dass Urokinase, über einen LRP1-abhängigen Signalweg, die Zellkontraktion glatter Gefäßmuskelzellen reguliert (Nassar et al., 2002). Im Bereich des ZNS kommt LRP1 eine Mitbeteiligung bei der Entwicklung der Alzheimer-Demenz zu (Zerbinatti und Bu, 2005). Vermutlich führt die übermäßige zerebrale Ablagerung des Amyloid-β-Peptids, ein proteolytisches Fragment des in der Plasmamembran vorkommenden Amyloid-Precursor-Proteins, zu der Entwicklung dieser Erkrankung (Gandy, 2005). Als Konsequenz einer vermehrten Internalisierung des Amyloid-Precursor-Proteins durch LRP1 kommt es zu einer verstärkten Sekretion von Amyloid-β (Waldron et al., 2006). Darüber hinaus ist LRP1 ein Rezeptor für zahlreiche mit der Alzheimer Erkrankung assoziierte Liganden. Hier

sind insbesondere ApoE und das α2-Makroglobulin zu nennen (Heeren et al., 2004; Waldron et al., 2006).

Das 39 kDa umfassende *receptor-associated protein* (RAP) (Herz et al., 1991; Bu und Schwartz, 1998), ein im ER zu findendes Protein, ist der einzige Ligand, der an alle Ligandenbindungsmotive von LRP1 binden kann (Herz und Strickland, 2001). Es fungiert als Chaperon, unterstützt demnach die einwandfreie Faltung des Proteins im ER (Bu, 1998; Lazic et al., 2006). Daraufhin bleibt es zunächst an LRP1 assoziiert, womit es die vorzeitige Ligandeninteraktion verhindert und für eine sichere Passage in dem frühen Sekretionsverlauf sorgt. RAP stellt einen kompetitiven Inhibitor für die Ligandenbindung dar (Herz et al., 1991; Bu, 2001; Lazic et al., 2006). Williams et al. untersuchten die direkte Korrelation zwischen dem Grad der RAP-Bindung und dem Grad der Ligandeninhibition. Es zeigte sich, dass bei Sättigung der RAP-Bindungsstellen, LRP1 die Fähigkeit weitere Liganden zu binden, verliert. Es kontrolliert auf diese Weise die Aktivität des Rezeptors (Williams et al., 1992).

### 2.2.2 Rolle von LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel

Wie unter Punkt 2.1.1 beschrieben, sind LRP1 und LDLR in vivo für die rezeptorvermittelte Endozytose von CR in der Leber verantwortlich (Willnow et al., 1994; Rohlmann et al., 1998). Die hepatische Aufnahme von CR wird durch Bindung von ApoE an LDLR und LRP1 sowie durch Bindung von CR-assoziierter LPL an LRP1 vermittelt. LPL erhöht zudem die Bindungsfähigkeit ApoE-assoziierter Lipoproteine an LRP1 (Beisiegel et al., 1991; Heeren et al., 2002). LRP1 scheint in der postprandialen Phase von Lipiden eine bedeutende Rolle zu spielen (Veniant et al., 1998) und muss als der wichtigste hepatische CR-Rezeptor angesehen werden. Vermutlich durch Insulin stimuliert (Descamps et al., 1993; Zhang et al., 2004), kann LRP1 die CR schnell und effizient aus dem Blut entfernen. Die Bindungsaffinitäten der ApoE-Isoformen an den LDLR sind unterschiedlich (Schneider et al., 1981), ApoE2 bindet mit herabgesetzter Affinität. LRP1 bindet ApoE2 und ApoE3 mit vergleichbarer Affinität (Ruiz et al., 2005). Auf diese Weise könnte LRP1 die verminderte ApoE2-CR-Aufnahme über den LDLR kompensieren und so die damit erhöhten Risiken für Hyperlipoproteinämie Typ III und Atherosklerose vermindern.

### 2.2.3 Wirkung von Insulin auf LRP1

Insulin ist ein Peptidhormon aus 51 Aminosäuren, es lassen sich eine A- und eine B-Kette unterscheiden. Die aus 21 Aminosäuren bestehende A-Kette ist über zwei Disulfidbrücken

mit der aus 30 Aminosäuren gebildeten B-Kette verbunden. Biosynthese und Speicherung von Insulin erfolgen in den β-Zellen des Pankreas. Posttranslational entsteht in den Ribosomen zunächst ein Vorläufermolekül, das Präproinsulin. Nach Prozessierung des Vorläufermoleküls sowie Faltung und Schließung der Disulfidbrücken wird im ER das Proinsulin gebildet, das nun aus einer A- und B- sowie einer zwischengeschalteten C-Kette besteht. Das nach Abspaltung des C-Peptids fertig gestellte Insulin gelangt vom ER in den Golgi-Apparat und von dort in die Sekretgranula der β-Zellen. Aus diesen sogenannten β-Granula kann Insulin durch Exozytose freigesetzt werden. Insulin vermittelt seine Wirkung über Bindung an den Insulin-Rezeptor, einem transmembranösen Glykoprotein mit intrinsischer Protein-Tyrosinkinaseaktivität. Es werden verschiedene zelluläre Substrate, die sogenannten Insulin-Rezeptor-Substrat-Proteine (IRS-Proteine), phosphoryliert und auf diesem Wege die Insulin-Antwort in den verschiedenen insulinsensitiven Organen, wie Leber, Fett- und Muskelgewebe, vermittelt (White, 1998). Nach der Nahrungsaufnahme kommt es zu einer erhöhten Insulin-Ausschüttung mit nachfolgender Erhöhung der Glukoseaufnahme in Skelettmuskulatur und Fettgewebe und auf diese Weise zu einer Verminderung des postprandial erhöhten Blutglukosespiegels. Die deutliche Erhöhung der Glukoseaufnahme in Adipozyten, bei Stimulation mit Insulin, ist vermutlich Folge eines speziellen zellulären Mechanismus. Bindung von Insulin an seinen Rezeptor stimuliert die Phosphorylierung der IRS-Proteine und führt zu deren Bindung und Aktivierung der Phosphatidylinositol- (PI-) 3-Kinase (Shepherd et al., 1998) mit deren Transport zu bzw. Wirkung auf intrazelluläre, GLUT-4-enthaltende Vesikel (Heller-Harrison et al., 1996). Es kommt daraufhin zu einer Translokation des Glukosetransporters GLUT-4 aus einem intrazellulären Pool an die Plasmamembran (Rea und James, 1997). Die vermehrte Präsentation eines Endozytose-Proteins an der Zelloberfläche, durch Stimulation mit Insulin, wurde ebenfalls für den Transferrin-Rezeptor (TfR) beschrieben, auch hier zeigte sich ein PI-3-Kinase-abhängiger Mechanismus (Ko et al., 2001). Weiterhin wurde eine Regulation der endozytotischen Funktion von LRP1 in Adipozyten durch Insulin beschrieben. Dabei wird die Umverteilung von LRP1 an die Zelloberfläche stimuliert (Corvera et al., 1989) und eine Erhöhung der Endozytoseaktivität des Rezeptors, für Lipoproteine in postprandialen Adipozyten, bewirkt (Descamps et al., 1993). Im Rahmen dieser Translokation aus intrazellulären Kompartimenten an die Plasmamembran scheint die Aktivierung der PI-3-Kinase ebenfalls eine entscheidende Rolle zu spielen (Ko et al., 2001). Studien zeigten für LRP1, ebenso wie für den TfR, eine Verdoppelung der Oberflächenpräsentation unter Insulin-Stimulation. Für GLUT-4 wurden allerdings weitaus höhere Werte beschrieben (Ko et al., 2001). Über die Translokation von LRP1 hinaus konnte gezeigt werden, dass Insulin dieses auch in spezielle Membranbereiche leiten

kann. Es kommt zu einer Anreicherung von LRP1 in sogenannten Caveolae, Invaginationen der Plasmamembran (Zhang et al., 2004). In Adipozyten finden sich in diesen Caveolae noch viele weitere Signalrezeptoren, darunter auch der Insulin-Rezeptor (Cohen et al., 2003) und der translozierte Glukosetransporter GLUT-4 (Scherer et al., 1994; Cohen et al., 2003).

## 2.3 Intrazellulärer Stoffwechsel von Chylomikronen-Remnants

Nach der rezeptorvermittelten Endozytose werden die Liganden der entsprechenden Rezeptoren intrazellulär unterschiedlich sortiert. Für LDL konnte gezeigt werden, dass die Ligandenbindung an einen Rezeptor über *Clathrin-Coated-Pits*, spezielle Segmente der Zellmembran, zur zellulären Aufnahme der Rezeptor-Ligand-Einheit führt. Es kommt zu Invagination und Abschnürung der Vesikel und damit zur Internalisierung (Anderson et al., 1977). Nach Verschmelzung der nun als *Clathrin-Coated-Vesicles* bezeichneten Zellorganellen mit sogenannten sortierenden Endosomen kommt es, durch eine ATP-abhängige Absenkung des pH-Wertes (<6,0) in den Vesikeln, zur Dissoziation von Rezeptor und Ligand (Nelson, 1992). Diese Strukturen werden nun als *Compartment of Uncoupling Receptor and Ligand* (CURL) bezeichnet. Es handelt sich um große vesikuläre Organellen mit tubulären Fortsätzen. In den Fortsätzen enthalten sind die Rezeptoren, wohingegen sich die Liganden im Vesikellumen befinden (Geuze et al., 1983). Durch Abschnürung und Clathrin-Ummantelung der tubulären Fortsätze werden die Rezeptoren im Sinne eines Recyclings zurück zur Zellmembran transportiert (Mukherjee et al., 1997). Hier stehen sie nun erneut der Bindung von Liganden zur Verfügung. Die sich nach Rezeptor-Ligand-Dissoziation im Lumen befindenen Liganden werden unter weiterer Ansäuerung (pH=5,0-6,0) zu Lysosomen transportiert und nach Vesikelfusion vollständig degradiert. Für den TfR wurde eine andere Variante des Rezeptor-Recyclings beschrieben (Octave et al., 1983). An Transferrin (Tf) gebundenes Eisen wird über den TfR internalisiert. Während das Eisen vom Tf abdissoziiert, bleibt Tf über Apotransferrin an seinen Rezeptor gebunden. Der TfR-Komplex wird über Recycling-Kompartimente zurück an die Zelloberfläche transportiert, der Komplex zerfällt und der Rezeptor kann nun erneut eisenbeladenes Tf binden (Dautry-Varsat, 1986). Wie der LDLR ist LRP1 ein Transmembranprotein, das via *Clathrin-Coated-Pits* internalisiert wird und über endosomale Kompartimente zurück zur Plasmamembran gelangt (Lund et al., 1989). Im

Gegensatz zum Abbau von LDL konnte gezeigt werden, dass ApoE nicht lysosomal degradiert, sondern in einem Recycling-Prozess für die Synthese ApoE-haltiger HDL wiederbenutzt wird (Heeren et al., 2003). In der folgenden Abbildung wird der derzeitige Wissensstand zum ApoE-Recycling schematisch dargestellt (Abb. 2).

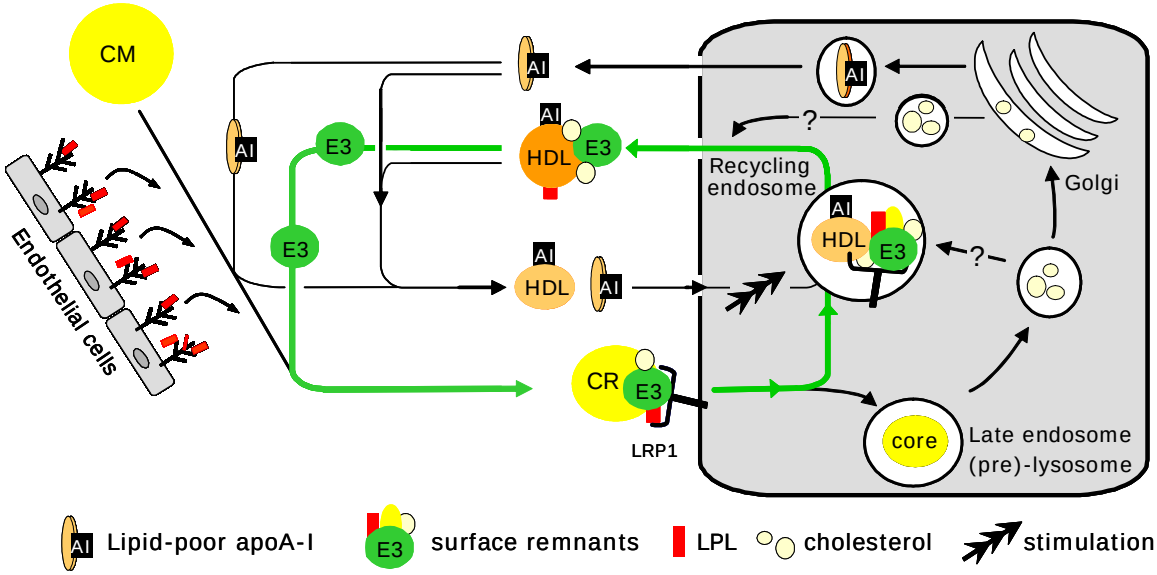


**Abb. 2: Postprandialer Lipoproteinstoffwechsel** (Heeren et al., 2006)**.** Die Nahrungslipide werden im Darm in CM eingebaut. Im Blut werden die Triglyzeride der CM durch die Aktivität der endothelständigen LPL hydrolysiert. Bei der Hydrolyse wird ApoE aus HDL auf die entstehenden CR transferiert. Nachdem ~50% der Triazylglyzeride am Endothel des Muskel- bzw. Fettgewebes hydrolysiert wurden, löst sich LPL von den Proteoglykanen der Endothelzellen ab und assoziiert mit den entstandenen CR. Die so mit ApoE und LPL angereicherten CR werden effizient über LRP1 in die Leber aufgenommen. Intrazellulär desintegrieren die CR zu ApoE-haltigen ‚Surface Remnants' und zu einem aus ApoB48 und Lipiden bestehenden Kernpartikel, der zum Abbau in die Lysosomen transportiert wird. Die ApoE-haltigen ‚Surface Remnants' verbinden sich mit Cholesterin und nach Aufnahme ApoE-freier HDL werden diese als ApoE-haltige HDL sezerniert. Die so gebildete $HDL_E$ steht dann wieder zur Verfügung, um in der postprandialen Phase ApoE auf die CM zu übertragen.

Nach Internalisierung gelangen die CR zunächst in periphere Endosomen, wo sie desintegrieren und ihre Bestandteile unterschiedlich sortiert werden (Heeren und Beisiegel, 2001). Während der Lipidanteil und ApoB lysosomal degradiert werden, verbleiben ApoE, ApoC und LPL in den peripheren Endosomen und gelangen erneut an die Plasmamembran, wo sie resezerniert werden können (Heeren et al., 1999; Heeren et al., 2001; Heeren et al., 2003). Diese Recycling-Endosomen sind eindeutig von den perinukleären Transferrin-Recycling-Kompartimenten zu unterscheiden (Heeren et al., 1999; Mamdouh et al., 2000) und wurden als periphere Rezeptor-Recycling-Kompartimente beschrieben (Heeren et al., 1999). Möglich wäre, dass eine pH-Resistenz

und die feste Bindung von ApoE an LDLR und/oder LRP1, ähnlich der Transferrin-Rezeptor-Bindung, die intrazelluläre Dissoziation des Rezeptor-ApoE-Komplexes verhindern (Tabas et al., 1991; Fazio et al., 1999; Heeren et al., 2006). ApoE würde auf diese Weise dem Degradierungsweg entgehen und könnte über den Recyclingweg resezerniert werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Verbindung zwischen ApoE-Recycling und HDL-Metabolismus besteht (Heeren et al., 1999; Heeren et al., 2001; Heeren et al., 2003; Hasty et al., 2005). Neben seiner Funktion als extrazellulärer Cholesterinakzeptor fungiert extrazelluläres HDL auch als Akzeptor für resezernierte ApoE und stimuliert das Recycling von internalisierten ApoE (Heeren et al., 1999; Heeren und Beisiegel, 2001; Heeren et al., 2003). Sowohl HDL als auch ApoE können den Cholesterinefflux vermitteln (von Eckardstein et al., 2001; Heeren et al., 2003). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass HDL-induziertes ApoE-Recycling von zellulärem Cholesterinefflux aus endosomalen Kompartimenten begleitet wird und diesen somit steigert (Heeren et al., 2003). Dabei konnte eine Co-Lokalisation von internalisierten ApoE und *early endosome antigen 1* (EEA1), einem Marker für frühe Endosomen, festgestellt werden. Diese Endosomen beinhalten außerdem Cholesterin. Nach HDL-Inkubation konnten gleichzeitig ApoE-Recycling und Cholesterinefflux aus peripheren, frühen Endosomen beobachtet werden. In diesen Endosomen co-lokalisieren außerdem von HDL stammende ApoA-I. Es ist anzunehmen, dass von HDL stammende ApoA-I internalisiert und zu ApoE/Cholesterin-enthaltenden Endosomen transportiert werden, um so ApoE-Recycling und Cholesterinefflux zu vermitteln (Rees et al., 1999; Heeren et al., 2003). In *fast performance liquid chromatography*- (FPLC-) Analysen sezernierter Proteine, zum einen aus Makrophagen, zum anderen aus Leberzellen nach Pulse-Chase-Experimenten, konnte resezerniertes ApoE in der HDL-Fraktion identifiziert werden (Heeren et al., 2001; Hasty et al., 2005). Dies läßt vermuten, dass internalisiertes ApoE die Zelle in umgestalteter, lipidierter Form verläßt. Eine intrazelluläre Bildung ApoE-haltiger HDL ist somit denkbar. Unklar ist jedoch noch, ob HDL-Partikel oder lediglich ApoA-I zu endosomalen ApoE/Cholesterin-Komplexen gelangen. Vermutlich setzt der zelluläre Cholesterinefflux die Bindung von HDL/ApoA-I an die Zelloberfläche voraus, diese erfolgt über Rezeptoren wie *ATP-Binding-Cassette-Transporter A1* (ABCA1) oder *Scavenger Receptor class B I* (SR-BI), sie erleichtern die Internalisierung von HDL/ApoA-I (Krieger, 2001; Zheng et al., 2001; Ragozin et al., 2005; Yokoyama, 2006). Für ABCA1 wurde die Aufnahme in die Zelle sowie eine steigernde Wirkung auf den Cholesterinefflux beschrieben (Chen et al., 2001; Oram, 2002). Der membranständige SR-BI bindet ebenfalls HDL und ist an Endozytose und Resekretion der HDL-Partikel beteiligt (Silver et al., 2001). Auch für SR-BI konnte eine mit der HDL-Aufnahme einhergehende

Internalisierung gezeigt werden (Silver et al., 2001). Die Regulierung des ABCA1- und SR-BI-vermittelten Cholesterineffluxes ist kompetitiv und verläuft wahrscheinlich unabhängig voneinander (Chen et al., 2000). Die Rolle von SR-BI und ABCA1 für das ApoE-Recycling ist bislang jedoch nicht geklärt (Heeren et al., 2006).
Die Assoziation internalisierter ApoA-I mit intrazellulären ApoE/Cholesterin-Komplexen könnte zur Bildung ApoE-angereicherter HDL führen. Dieser Mechanismus würde zum Erhalt hoher HDL-Spiegel und einer kontinuierlichen Bereitstellung von ApoE im Plasma führen und damit den intravaskulären ApoE-Transfer von HDL zu CR und deren Clearance über die Leber beschleunigen (Heeren und Beisiegel, 2001). In Makrophagen würde das HDL-induzierte ApoE-Recycling zu einem erhöhten Cholesterintransport aus der Peripherie führen und so die Bildung atherosklerotischer Schaumzellen verhindern (Huang et al., 1995; Heeren et al., 2003; Hasty et al., 2005; Heeren et al., 2006). Sowohl endogenem als auch exogenem ApoE kommen hier also anti-atherosklerotische Eigenschaften zu, die vorwiegend auf der Induktion des Cholesterineffluxes beruhen und dadurch den reversen Cholesterintransport vermitteln (Curtiss und Boisvert, 2000; Greenow et al., 2005). Die ApoA-I- und ApoE-induzierte Cholesterinefflux-Steigerung peripherer Zellen scheint maßgeblich für den effizienten reversen Cholesterintransport zur Leber verantwortlich zu sein (Silver et al., 2001).
Dies zeigt die physiologische Relevanz von exogenem ApoE in Lipid-Homöstase und Atherosklerose-Protektion.

CR werden über LDLR und LRP1 schnell aus dem Plasma eliminiert, es ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, ob und in welcher Form die beiden Rezeptoren an der Regulation des ApoE-Recyclings beteiligt sind. Eine Rolle des LDLR in der ApoE-Resekretion wird beschrieben (Rensen et al., 2000). Das ApoE-Recycling postprandialer ApoB48-haltiger CR hängt jedoch nicht vom LDLR ab und läßt somit auf eine LRP1-Beteiligung an diesem Prozess schließen (Fazio et al., 1999; Heeren et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass internalisiertes ApoE und Cholesterin in Frühendosomen an LRP1 assoziiert vorliegen (Heeren et al., 2003); dies ist hinweisend darauf, dass LRP1 verantwortlich dafür sein könnte, dass ApoE in das Recycling-Kompartiment gelangt. In Maus-Hepatozyten wurde andererseits gezeigt, dass das ApoE-Recycling, in Abwesenheit von LDLR und gleichzeitig verminderter LRP1-Expression, nicht wesentlich vermindert war (Farkas et al., 2004). Es scheint hier eine sehr komplexe Situation vorzuliegen. So könnten spezifische Adapterproteine von LDLR und LRP1 für die Regulation des zielgerichteten Transportes der ApoE-Rezeptor-Komplexe in Membran-Subdomänen des Endozytose-Kompartimentes verantwortlich sein. Es wurde, zum Beispiel, das

Adapterprotein ARH beschrieben, auch *low density lipoprotein receptor adaptor protein* genannt, das über eine Phosphotyrosin-bindende Domäne verfügt (Garcia et al., 2001). Diese verbindet den LDLR mit Clathrin und dem Clathrin-assoziierten Adaptinprotein-Komplex 2 (AP2) und scheint auf diese Weise die LDLR-Internalisierung hepatozellulärer Frühendosomen zu regulieren (He et al., 2002; Michaely et al., 2004; Sirinian et al., 2005). Die nach Ligandenbindung erfolgende Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils von LRP1 modifiziert die Assoziation von LRP1 mit Adapterproteinen und reguliert seine endozytotische Funktion (Ranganathan et al., 2004). Demnach könnte der Transport von internalisiertem ApoE zu peripheren Recycling-Kompartimenten also auch über Regulation durch intrazelluläre Adapterproteine erfolgen (Heeren et al., 2006).

Auch ApoE selbst trägt vermutlich zu seinem intrazellulären Verlauf bei (Heeren und Beisiegel, 2001; Farkas et al., 2004). Es scheint wesentliche Unterschiede im Recycling der ApoE-Isoformen zu geben (Heeren et al., 2004), die in dieser Arbeit u.a. untersucht werden sollen. ApoE kommt, wie unter 2.1.1 beschrieben, in drei Isoformen vor. Ob und inwieweit sich der intrazelluläre Weg von ApoE2 von dem der Isoformen E3 und E4 unterscheidet, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Die ApoE4-Bindung an LDLR und LRP1 ist vergleichbar mit der ApoE3-Bindung an diese Rezeptoren (Bohnet et al., 1996; Knouff et al., 1999; Mamotte et al., 1999; Heeren et al., 2004). Dennoch haben ApoE3 und ApoE4 sehr unterschiedliche Auswirkungen auf den Lipoproteinstoffwechsel. Die für diese Differenzen verantwortlichen zellulären Mechanismen sind jedoch noch nicht gänzlich verstanden. In Hepatozyten konnte gezeigt werden, dass zelluläre Bindung, Internalisierung, endosomaler Transport und Abbau von ApoE3- und ApoE4-haltigen CR in Frühendosomen, vergleichbar sind (Heeren et al., 2004). So wäre anzunehmen, dass ungleiches Recycling zu den unterschiedlichen Auswirkungen der Isoformen beiträgt.
HDL stimuliert das Recycling von internalisierten ApoE3, womit ein effizienter Mechanismus geliefert wird, um das Plasma wieder mit ApoE-haltigen HDL-Partikeln anzureichern (Heeren et al., 2003). In der postprandialen Phase kann HDL so ApoE für die Anreicherung von CR und damit der hepatischen Clearance von CR bereitstellen. Die ApoE-Isoformen scheinen auf unterschiedliche Weise die Mobilisation intrazellulären Cholesterins zu beeinflussen. Studien mit Fibroblasten und Astrozyten zeigten eine verminderte Wirkung von ApoE4 in der Vermittlung des Cholesterineffluxes im Vergleich zu ApoE3 (Huang et al., 1995; Michikawa et al., 2000). ApoE3-Recycling geht mit einer Steigerung des Cholesterineffluxes einher, in Makrophagen wirkt dies der Ausbildung atherosklerotischer Schaumzellen entgegen (Huang et al., 1995; Hasty et al., 2005). ApoE4 hingegen akkumuliert intrazellulär und kann während des Recycling-Prozesses

nicht effizient mit HDL-Partikeln assoziieren (Heeren et al., 2004). Der pH-Abfall in Frühendosomen könnte zu einer Strukturveränderung der internalisierten ApoE4 führen und deren Bindung an Untereinheiten endosomaler Membranen vermitteln, die nicht in Recycling-Kompartimente geleitet werden. Hierdurch würde schließlich der Transfer von ApoE4 zu lipidarmen HDL-Partikeln während des Recyclings inhibiert werden (Heeren et al., 2006). Dies führt nicht nur zu niedrigen HDL-Spiegeln im Plasma, sondern auch zu verminderter CR-Clearance mit nachfolgender CR-Akkumulation und postprandialer Hypertriglyzeridämie. Die reduzierten Spiegel HDL-assoziierter ApoE, aufgrund von beeinträchtigtem ApoE4-Recycling, könnten also den verzögerten Umsatz von CR-Partikeln bei ApoE4-Trägern erklären (Bergeron und Havel, 1996; Knouff et al., 1999). In peripheren Organen oder auch in lipidgefüllten Schaumzellen könnte die zelluläre ApoE4-Akkumulation mit reduziertem Cholesterinefflux assoziiert sein. Das beeinträchtigte ApoE4-Recycling könnte so auch das erhöhte Risiko für die Entwicklung einer Atherosklerose erklären (Gregg et al., 1986; Davignon et al., 1988; Weisgraber, 1990; Dallongeville et al., 1992; Heeren et al., 2004). Die damit verbundenen erhöhten LDL-Cholesterin-Spiegel bei ApoE4-Trägern lassen verschiedene Überlegungen zu deren Ursache zu. Es könnte zu einer cholesterininduzierten Herunterregulierung der hepatischen LDLR kommen, dies aufgrund zunächst erhöhter ApoE4-CR-Aufnahme (Davignon et al., 1988; Mamotte et al., 1999), folgendem beeinträchtigten ApoE4-Recycling und konsekutiver intrazellulärer Cholesterinakkumulation (Heeren et al., 2004). Die Herunterregulierung der LDLR-Expression würde dann zu erhöhten LDL-Cholesterin-Spiegeln im Plasma führen. Daneben könnte das beeinträchtigte ApoE4-Recycling auch direkt auf den Lipidstoffwechsel einwirken und so für die ungünstigen atherosklerotischen Effekte verantwortlich sein (Malloy et al., 2004). Weiterhin könnte die intrazelluläre ApoE4-Akkumulation und feste ApoE4-Bindung an LDLR und LRP1 das Recycling der Lipoprotein-Rezeptoren zur Zelloberfläche verhindern und infolgedessen die LDL- und CR-Aufnahme einschränken (Heeren et al., 2006).

In dieser zellbiologischen Arbeit sollten die molekularen Mechanismen des ApoE-Recyclings, ein Prozess, der offensichtlich bei einer Vielzahl von physiologisch relevanten Stoffwechselwegen beteiligt ist, näher charakterisiert werden.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Geräte

- Brutschrank (Binder)
- Zellkultur Werkbank „Hera Safe" (Heraeus)
- Wärmebad SW-20C (Julabo)
- Absauggerät Miniport für Zellkultur
- Tischabsaugpumpe „ECOM-P 4153" (Eppendorf)
- CASY1 TT (Schärfe System GmbH, Reutlingen)
- Lichtmikroskop (Olympus)
- Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 100" (Zeiss)
- Konfokales Laser Scanning Mikroskop „LSM 510 META" (Zeiss)
- Thermomixer „Compact" (Eppendorf)
- Vortexer "Reax 2000" (Heidolph)
- Wärmekasten (Heraeus)
- Laborzentrifuge „1-15K" (Sigma)
- Ultrazentrifuge „L7-55" mit „Swing-out Rotor SW 40" und passenden Zentrifugationsröhrchen (Beckman)
- Elektrophoresekammer (Invitrogen)
- Power Supply „Power PAC 200" (BioRad)
- Elisareader „Biotrak II" (Amersham Biosciences)
- Digital Sonifier (Branson)
- Typhoon 9410 "Variable Mode Imager" (Amersham Biosciences)
- Entwicklermaschine X-OMAT 1000 Processor (Kodak)

## 3.2 Verbrauchsmittel

Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc, Falcon und Greiner bezogen.

## 3.3 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in analytischer bzw. in HPLC-Reinheit bei den Firmen Sigma Chemie (Steinheim), Serva (Heidelberg) und Merck (Darmstadt) bezogen.

## 3.4 Zellkultur

**a) Material**

- Humane Embryonale Nierenzellen HEK293
- Reuber H35 rat FAO Hepatoma cells (freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Seitz, UKE Hamburg)
- Human-Insulin-Receptor-11-, HIR-11-Zellen (freundlich zur Verfügung gestellt von Lilly Forschung, Hamburg)
- Nährmedium
    - ➔ DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium mit GlutaMAX-I (mit 1000 mg/L Glukose für HEK293- und FAO-Zellen; mit 4500 mg/L Glukose für HIR-11- und FAO-Zellen) (Gibco)
    - ➔ 2,5% Fetales Kälber Serum (im Nährmedium für HEK293- und FAO-Zellen) bzw. 10% (im Nährmedium für HIR-11-Zellen) (Biochrom KG)
    - ➔ 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Invitrogen Corporation)
    - ➔ 100 µg/ml Zeocin (im Nährmedium für HIR-11-Zellen) (Invitrogen)
- D-PBS, Dulbecco's-Phosphate Buffered Saline (Gibco, Invitrogen)
- Trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen Corporation)
- Zellkulturflaschen 75 $cm^2$ „Cellstar" (Greiner Bio-One)
- 6-Well-Platten (Falcon und Nunc)
- Coverslips mit einem Durchmesser von 13 mm (Assistent)
- Pasteurpipetten
- Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml; Falcon)
- CASY1 TT (Schärfe System GmbH, Reutlingen)

**b) Methode**

Zur Vermeidung mikrobieller Kontamination wurden alle Zellkulturarbeiten an einer speziellen Werkbank (Bench) mit sterilen Instrumenten durchgeführt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (HEK293-, HIR-11- und FAO-Zellen) wurden nach einer einheitlichen Methode kultiviert, in 75 $cm^2$ Zellkulturflaschen gezüchtet und bei 37°C mit 5% $CO_2$ im Brutschrank gelagert. Bei Erreichen einer Konfluenz der Zellen wurden diese mittels Trypsinierung auf weitere 75 $cm^2$ Zellkulturflaschen verteilt oder zur Durchführung von Versuchen in definierter Zellzahl in 6-Well-Platten mit vier Coverslips pro Well ausgesetzt. Hierzu wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und für wenige Minuten mit 4 ml einer Trypsinlösung inkubiert. Durch vorsichtiges Beklopfen des Flaschenbodens und leichtem Schwenken der Zellkulturflasche kam es in Kombination mit der Trypsinlösung zu einem Ablösen des Zellrasens von der Kunststoffoberfläche, dieses konnte lichtmikroskopisch kontrolliert werden. Um das Trypsin zu inhibieren, wurden dann 6 ml des serumhaltigen Mediums zugegeben. Nun konnte Zellsuspension zur Bestückung neuer Zellkulturflaschen entnommen oder die Zellzahl bestimmt werden.

## 3.5 DNA-Transfektion in HEK293- und HIR-11-Zellen

**a) Material**

- Eppendorf Tubes
- Pipetten mit Pipettenspitzen
- DMEM mit GlutaMAX-I (mit 1000 mg/L Glukose, serumfrei) (Gibco)
- Plasmid-DNA
  - ➔ Kontrollvektor pECFP-N1 0,97 µg/µl (Clontech)
  - ➔ Kontrollvektor pEGFP-N 1,7 µg/µl
  - ➔ pLRP1-EGFP 1,1 µg/µl (freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. Laatsch, UKE Hamburg)
  - ➔ pRAP 0,86 µg/µl (freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Willnow, Berlin)
- FuGENE 6 Transfektionsreagenz (Roche)

**b) Methode**

Die Transfektion von Plasmid-DNA wurde 24 Stunden nach Aussetzen der Zellen in 6-Well-Platten durchgeführt. Pro Well wurden 100 µl DMEM-Lösung in ein Eppendorf Tube vorgelegt, 0,5 µg *Enhanced Cyan Fluorescent Protein*- (ECFP-) bzw. *Enhanced Green Fluorescent Protein*- (EGFP-) Plasmid und in ein weiteres Tube 1 µg LRP1-EGFP-Plasmid hinzugefügt. Die DNA wurde im Verhältnis 1:3 mit dem Transfektionsreagenz FuGENE 6

entsprechend dem Protokoll des Herstellers versetzt. Nach gutem Mischen der Lösung und 20 minütiger Inkubation konnten nun je 100 µl auf die Wells verteilt werden. Leichtes Schwenken sollte eine gleichmäßige Verteilung der Plasmid-DNA im Well bewirken.

## 3.6 Proteinbestimmung nach SDS-Lowry

**a) Material**

- Probe: 10 µl Zelllysat, gelöst in 0,1 N NaOH
- Albumin Standardreihe (Pierce): 1) 0,0625 mg/ml
  2) 0,125 mg/ml
  3) 0,250 mg/ml
  4) 0,500 mg/ml
  5) 1,000 mg/ml
  6) 2,000 mg/ml
  in 0,1 N NaOH
- NaOH 0,1 N (Merck)
- Lösung A:
  - ➔ 2% $Na_2CO_3$
  - ➔ 0,02% Natriumkaliumtartrat
  - ➔ 0,1 N NaOH ad 100 ml
- Lösung B:
  - ➔ 0,5% $CuSO_4$
  - ➔ 5% Sodiumdodecylsulfat (SDS)
  - ➔ in Aqua dest.
- Lösung C: Lösung A+B im Verhältnis 49:1
- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck) 1:1 mit Aqua dest.
- Testtubes
- Microtiterplatte 96-Well (Nunc)
- Elisareader

**b) Methode**

Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf der Bildung von blaugefärbten Komplexen zwischen Kupfertartrat und der Peptidbindung sowie zwischen Folin-Reagenz und Tyrosyl-Tryptophanylresten, die bis zu 2 Stunden stabil bleiben und photometrisch bei 750 nm quantifiziert werden können.

Um den Proteingehalt der Testlösung zu ermitteln, werden die Absorptionswerte einer Standardproteinreihe bekannter Konzentration bei 750 nm herangezogen.
Leerwert, Standardreihe und die zu messenden Proben wurden in Doppelmessungen bestimmt. In die Testtubes wurden zunächst 40 µl NaOH pipettiert, anschließend 10 µl Standardprotein bzw. Zelllysat hinzugefügt. Die Ansätze wurden dann jeweils mit 500 µl Lösung C durch Vortexen gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 µl eines Gemisches aus Folin und destiliertem Wasser im Verhältnis 1:1 jeweils zu Leerwert, Proteinstandardreihe und zu messender Probe hinzugegeben, gevortext und 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.
Die entstehenden Blaufärbungen ermöglichen die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentrationen bei 750 nm. Bei dieser Wellenlänge des eingesetzten Lichtes sind die gemessenen Extinktionswerte der Proteinkonzentration proportional.
Mit Hilfe der Standardkurve konnten so die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt werden.

## 3.7 Herstellung von Fluoreszenz-markierten Liganden

### 3.7.1 Präparation von TRL und trypsinierten TRL

**Isolierung von TRL**

**a) Material**

- Plasma von ApoCII-defizienten Patienten
- PBS (Gibco)
- 60% Sucrose-Lösung (Sigma)
- Protease-Inhibitor-Lösung
    - ➔ 1 mM Pepstatin (Calbiochem)
    - ➔ 10 mM Chymostatin (Calbiochem)
    - ➔ 10 mM Leupeptin (Calbiochem)
    - ➔ 10 mM Antipain (Calbiochem)
- Na-Azid (Sigma)

**b) Methode**

Die triglyzeridreichen Lipoproteine (TRL) - im Darm synthetisierte CM und in der Leber gebildete VLDL - wurden aus dem Plasma von Patienten mit Hypertriglyzeridämie Typ I isoliert. Der erheblichen Akkumulation von TRL bei diesen Patienten liegt das kongenitale

Fehlen des ApoC-II mit einhergehender Verminderung der LPL-Aktivität zugrunde. Das Plasma wurde für 60 Minuten bei 4°C in einem Swing-out-Rotor (SW 41, Beckman) bei 38.000 rpm ultrazentrifugiert. Die geringe Dichte der TRL führte nach der Zentrifugation zu einer Akkumulation am oberen Rand des Zentrifugationsröhrchens. Nach Resuspension dieser obersten Schicht in 3 ml PBS wurde die Lösung mit Sucrose beschwert, unter PBS geschichtet und drei weitere Male ultrazentrifugiert. Diese Reinigungsschritte sind wichtig, um vorhandenes Albumin zu entfernen. Vor der Aufbewahrung bei 4°C wurden die so gereinigten TRL mit Protease-Inhibitoren und Na-Azid versetzt.
Zur Präparation von TRL-Remnants (TRLR) wurden die TRL mit boviner LPL hydrolysiert (Heeren et al., 2002). Dann wurden sie mit PBS auf 6 mg/ml TG eingestellt und mit dem gleichen Volumen FCS versetzt. FCS ist als ApoC-II- und Albumin-Donor für die Hydrolyse notwendig. Zu dieser Lösung wurde 1 µg/ml bovine LPL hinzupipettiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die TRLR wurden durch Zentrifugation, wie oben beschrieben, reisoliert.

**Trypsinieren von TRL**

**a) Material**

- Trypsin
- TRL
- KBr-Lösung mit 1,21 g/l

**b) Methode**

Um endogenes ApoE zu entfernen wurden die isolierten TRL trypsiniert.
Zu 4 ml Trypsin wurde 1 mg TRL ad 2 ml PBS hinzugefügt, es folgte eine Inkubation für 2 Stunden bei 37°C. Anschließend wurden 6 ml KBr-Lösung mit 1,21 g/l hinzugefügt, unter PBS geschichtet und 45 Minuten bei 38.000 rpm in Beckman Zentrifuge mit SW 40 Swing-out-Rotor ultrazentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und erneutem Versetzen mit PBS und KBr-Lösung folgte eine weitere Ultrazentrifugation für 45 Minuten. Abschließend wurden die trypsinierten TRL abgenommen und mit PBS ad 6,5 ml aufgefüllt. Sie konnten nun zur Assoziation mit markierten ApoEx verwendet werden.

### 3.7.2 Markierung von rekombinanten ApoEx und Assoziation an TRL

**a) Material**

- rekombinante Apolipoproteine E2, E3 und E4 (freundlich zur Verfügung gestellt von Thomas Grewal und Kerry-Anne Rye, Sydney)

- RAP
- trypsinierte TRL
- PBS
- PD-10 Säule "Sephadex™ G-25 M" (Amersham Biosciences)
- Monofunktionaler Fluoreszenzfarbstoff Cyanin5 (Cy5) (Amersham Biosciences)
- 1 M $NaHCO_3$
- 1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)/HCL, pH 7,4
- L7-55 Ultrazentrifuge mit Swing-out-Rotor (SW 40) (Beckman)
- 60% Sucrose
- Unterschichtungskanüle

**b) Methode**

1. 200 µg rApoEx wurden kurz anzentrifugiert, die Volumina von ApoE2, ApoE3 und ApoE4 einander mit PBS angeglichen.
   a) Da rApoEx in TBS gelöst vorlag, wurde die PD-10 Säule zum Äquilibrieren 3x mit PBS gefüllt.
   b) Daraufhin wurde die rApoEx-Lösung auf die Säule gegeben
   c) und mit PBS ad 2,9 ml aufgefüllt.
   d) Das rApoEx befand sich nun im unteren Teil der Säule und konnte anschließend eluiert werden, dazu wurde PBS in einem Volumen aus b) plus 100 µl auf die Säule gegeben.
2. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde in 150 µl PBS aufgenommen und gleichmäßig auf die rApoEx-Lösungen verteilt.
3. Um den Farbstoff zu aktivieren, wurde nun 10% des Volumens der rApoEx-Lösung an 1 M $NaHCO_3$ zugegeben.
4. Anschließend wurde eine halbe Stunde dunkel bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Zum Stoppen der Reaktion wurde 10% des Volumens der rApoEx-Lösung an 1 M TRIS/HCL, pH 7,4 zugegeben.
6. Um die mit dem Farbstoff markierten rApoEx nun an trypsinierte TRL zu assoziieren, wurde die rApoEx-Lösung mit etwa 2 mg Triglyzeride enthaltenden trypsinierten TRL gemischt,
7. es folgte eine 2 stündige Inkubation des Ansatzes bei 37°C im Dunkeln.
8. Für die anschließende Ultrazentrifugation in einem Swing-out-40-Rotor wurde zunächst
   a) je 1 ml 60% Sucrose zu den Ansätzen gegeben und gut vermischt.

b) Die Zentrifugationsröhrchen wurden jeweils mit 7 ml PBS gefüllt, mit den Liganden unterschichtet (Abb. 3a) und dann vorsichtig, vollständig mit PBS aufgefüllt.

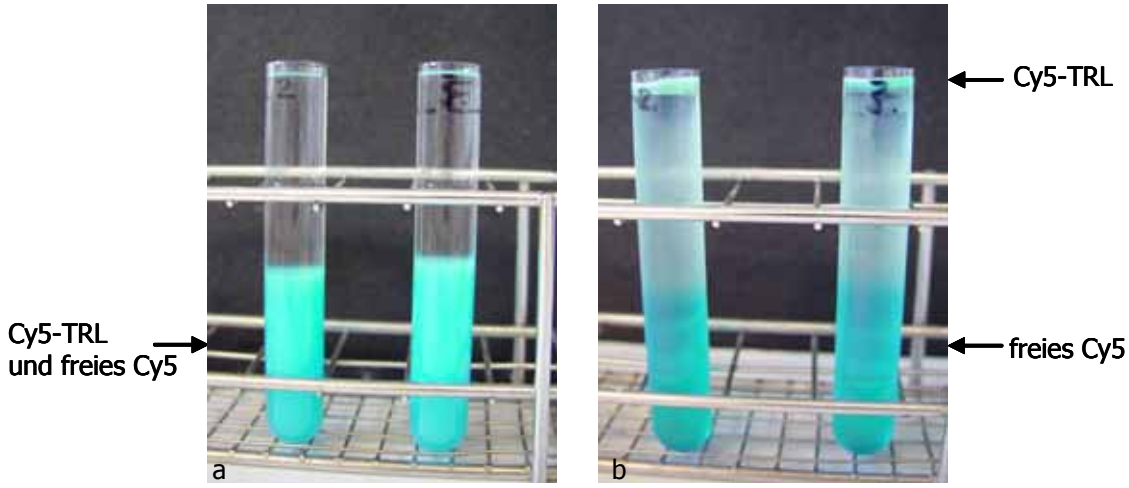


**Abb. 3a und 3b: Markierung von rekombinanten ApoEx und Assoziation an TRL.** Zunächst sieht man den freien Farbstoff und das bereits an die Liganden gekoppelte Cy5 gemeinsam vorliegen (Abb. 3a). Durch Zentrifugation ließen sich die leichteren, mit Cy5-ApoEx gekoppelten TRL, vom freien Fluoreszenzfarbstoff trennen (Abb. 3b).

c) Es folgte die Zentrifugation für 1 Stunde bei 38.000 rpm, hierbei wurden die leichteren, mit markierten ApoEx gekoppelten TRL, vom freien Farbstoff getrennt (Abb. 3b).

d) Die Cy5-ApoEx-TRL konnten nun mit gebogener Kanüle abgenommen werden.

9. Es folgte abschließend die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der SDS-PAGE und anschließender Detektion von Cy5 mit Quantifizierung der Banden (siehe 4.1; Abb. 4a und 4c).

Die Markierung von RAP mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 war mit den oben genannten Arbeitsschritten 1-5 identisch. Es folgte die Trennung des freien Farbstoffes von Cy5-RAP über eine PD-10 Säule.

## 3.8 Aufnahme-Experimente

**a) Material**

- FAO-Zellen (freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Seitz, UKE Hamburg) auf Coverslips
- Humane Embryonale Nierenzellen HEK293 auf Coverslips
    - ➔ Kontrollvektor pECFP-N1 (0,97 µg/µl)
    - ➔ Kontrollvektor pEGFP-N1 (1,7 µg/µl)
    - ➔ LRP1-Vektor pLRP-EGFP (1,1 µg/µl)
- Nährmedien
    - ➔ DMEM mit GlutaMAX-I (Gibco)
    - ➔ DMEM mit 2,5% Fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin
    - ➔ DMEM mit 2% Bovinem Serum-Albumin (BSA Fraktion V von Sigma)
- Aufnahmelösung:
    - ➔ DMEM (Gibco) mit 2% BSA (Sigma)
    - ➔ Cy5-gelabelte ApoEx assoziiert mit TRL oder Cy5-RAP (je nach Versuchsansatz)
    - ➔ 100 nM Insulin (je nach Versuchsansatz)
- Waschpuffer
    - ➔ PBS (Gibco, Invitrogen)
    - ➔ PBS mit Heparin (Liquemin$^{R}$, 100 U/ml) (Roche)
- Liganden
    - ➔ Cy5-RAP
    - ➔ Cy5-ApoE2-TRL
    - ➔ Cy5-ApoE3-TRL
    - ➔ Cy5-ApoE4-TRL
- Puffer
    - ➔ Zelllysispuffer (50 mM TRIS, 80 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 1% Triton X-100) mit 0,5% SDS in 0,25 M TRIS pH 8,0 und Protease-Inhibitoren im Verhältnis 1:100 bis 1:1000
    - ➔ 2% SDS in 0,25 M TRIS pH 8,0
    - ➔ Reduzierter Mix (2 Teile 10% SDS in 0,25 M TRIS pH 8,0 + 1 Teil Bromphenolblau in 99% Glycerin + 1 Teil Mercaptoethanol (Serva))
- Rainbow Marker RPN800 (Amersham Biosciences)
- BSA (2 mg/ml) (Pierce)

- 4-12% Bis-TRIS-Gradientengel NuPAGE, 1.0 mm x 10-Well mit MES SDS Running Buffer und zugehöriger „xCell Sure Lock" Elektrophoresekammer (alles von Invitrogen)
- 7,5%ige Neville-Gele, mit einer Dicke von 1,5 mm, 10-Well; Mini Protean 3-System (BioRad)

  ➔ Trenngel bestehend aus
  - 4,5 ml Aqua dest.
  - 1:4 Volumen Untergelpuffer (1,7 M TRIS pH 9,18)
  - 1:5 Volumen 40%iges Acrylamid/Bis (Bio-Rad)
  - 1:200 Volumen 10% Ammonium Persulfat, APS (Serva)
  - 1:800 Volumen Temed (Serva)

  ➔ Sammelgel bestehend aus
  - 3,4 ml Aqua dest.
  - 1:4 Volumen Obergelpuffer (0,2 M TRIS pH 6,14, eingestellt mit $H_2SO_4$)
  - 1:13 Volumen 40%iges Acrylamid/Bis (BioRad)
  - 1:200 Volumen 10% APS
  - 1:1000 Volumen Temed

  mit zugehörigem Ober- und Unterpuffer

**b) Methode**

In den durchgeführten Aufnahme-Experimenten wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markierte ApoEx bzw. RAP an TRL gekoppelt (siehe 3.7.2) eingesetzt, um Aufschluss über ApoE-Isoform-spezifische Unterschiede in der Aufnahme in LRP1-überexprimierende Zellen, in Abhängigkeit von Insulin, zu erlangen.

Es wurden HEK293-Zellen in einer Dichte von ca. 200.000 Zellen pro Well in 6-Well-Platten, die pro Well vier Coverslips enthielten, ausgesetzt und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% $CO_2$ belassen. Nach Erreichen einer Semikonfluenz des Zellrasens wurden die Zellen wie unter 3.5 beschrieben transfiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden dann die Aufnahme-Experimente durchgeführt. FAO-Zellen wurden in einer Dichte von ca. 400.000 Zellen pro Well ausgesetzt. Das Aufnahme-Experiment konnte hierbei bereits nach 48 Stunden durchgeführt werden. Die Coverslips mit den über Nacht in serumfreiem Medium gehungerten Zellen wurden mit einer Pinzette kurz auf Filterpapier abgetupft und in eine Schachtel mit Parafilm verbracht. Hier wurden die Zellen pro Coverslip mit 75 µl einer Aufnahmelösung überschichtet und für 20 bzw. 60 Minuten (je nach Versuchsansatz) bei 37°C mit dieser inkubiert. Anschließend wurden die

Coverslips in PBS und heparinisiertem PBS gewaschen, um an der Oberfläche der Zellen gebundene Liganden zu entfernen. Die Zellen wurden dann, abhängig vom Versuchsansatz, pro Coverslip in etwa 40 µl Zelllysispuffer bzw. 2% SDS lysiert und anschließend mittels einer Pipette unter Resuspension abgenommen. Die Proben wurden daraufhin 10 Minuten in der Laborzentrifuge „1-15K" von Sigma bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen bzw. die in 2% SDS gelösten Zellen mit Ultraschall zum Scheren der genomischen DNA behandelt (pro Tube 10 Sekunden bei einer Amplitude von 20%), damit die Proteinproben gleichmäßig aufgetragen werden konnten. Es folgte eine Proteinbestimmung nach SDS-Lowry (siehe 3.6), damit gleiche Proteinmengen in die Taschen des SDS-PAGE-Gels pipettiert werden konnten. Es wurde aus jeder Probe 10 µg Protein mit Zelllysispuffer bzw. 2% SDS auf 60 µl aufgefüllt und mit 30 µl reduziertem Mix gemischt. Dieser enthielt neben SDS eine Glycerin-Lösung zum Beschweren der Probe und Bromphenolblau zur Sichtbarmachung der Lauffront.

### 3.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach 10 minütiger Inkubation bei 40°C, anschließender Abkühlung und kurzer Zentrifugation, wurden die Proben einer SDS-PAGE mit 4-12%igen Gradientengelen (Invitrogen) unterzogen. Dabei wurden pro Well 25 µl einer Probe pipettiert und eine Spannung von 200 V angelegt. Der Gellauf wurde bis zum Erreichen der gewünschten Auftrennung durchgeführt. Die Proteine trennen sich ihrer Größe nach auf, wobei die Porengröße des Gels von oben nach unten abnimmt. Der sich in einer Linie auftrennende Marker gibt durch unterschiedliche Farben die Größen der jeweiligen Banden an. Sollten größere Zellproteine aufgetrennt werden, wurden 7,5%ige Neville-Gele benutzt. Hierbei wurden 40 µl Probe pro Well pipettiert, der Gellauf wurde bei ca. 30 mA bis zum Erreichen der gewünschten Auftrennung durchgeführt.

### 3.8.2 In Gel Fluoreszenzdetektion und Quantifizierung

Anschließend wurde die Fluoreszenz im Gel mittels eines Fluoreszenzscanners (Typhoon 9410) gescannt und quantifiziert. Dabei wurde der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (670 BP 30 Cy5) bei einer Wellenlänge von 633 nm (Red), Cy2 (520 BP 40 Cy2, ECL+, Blue FAM) bei 488 nm (Blue2) und Cy3 (580 BP 30 Cy3, TAMRA, Alexa Fluor 546) bei 532 nm (Green) detektiert. Mit dem Programm Typhoon Scanner Control v5.0 konnten die Banden

schließlich quantifiziert und zum Vergleich der aufgenommen ApoEx- bzw. RAP-Mengen in den Proben mit unterschiedlichen Inkubationsansätzen herangezogen werden.

**Coomassie-Färbung**

**a) Material**

- 0,1% CBB (Coomassie Brilliant Blue) R-250
- 45% Ethanol
- 10% Eisessig

Für die anschließende Entfärbung:

- 25% Ethanol
- 65% $H_2O$
- 10% Eisessig

**b) Methode**

Wurde das Gel im weiteren Verlauf keinem Western Blot unterzogen, wurde zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinauftragung eine Coomassie-Färbung durchgeführt, bei der die Proteine die blaue Farbe der Coomassie-Lösung annahmen.
Dazu wurde das Gel ca. 20 Minuten in einer Coomassie-Lösung unter leichtem Schütteln belassen und anschließend über Nacht bei 4°C soweit entfärbt, dass Proteinbanden gut sichtbar dargestellt werden konnten.

## 3.9 Pulse-Chase-Experimente

**a) Material**

- Pulse-Lösung:
  - ➔ DMEM mit GlutaMAX-I (Gibco) mit 2% BSA (Sigma)
  - ➔ Cy5-gelabelte ApoEx assoziiert mit TRL (je nach Versuchsansatz)
  - ➔ 100 nM Insulin (je nach Versuchsansatz)
- Chase-Lösung:
  - ➔ DMEM mit GlutaMAX-I (Gibco)
  - ➔ $HDL_3$ (ApoE-frei) (je nach Versuchsansatz)

**b) Methode**

Bei den Pulse-Chase-Inkubationen folgte auf das oben beschriebene Aufnahme-Experiment nach dem Waschvorgang eine 30 minütige Efflux-Phase, in der die Coverslips

mit 50 µl Chase-Lösung bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Überstände mittels einer Pipette abgenommen und ebenso wie die Zelllysate mit reduziertem Mix gemischt. Die weiteren Schritte sind mit denen unter 3.8, 3.8.1 und 3.8.2 beschriebenen identisch.

## 3.10 Western Blot

**Blotten**

**a) Material**

- Blotting-Puffer
  - ➔ 150 mM Glycin
  - ➔ 20 mM TRIS
  - ➔ 1 l Methanol
  - ➔ Aqua dest. ad 5 l
- Membran: Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm (PROTRAN von Schleicher und Schuell)
- Gel-Blotting-Papier (Schleicher und Schuell)
- Schwämme
- Roller
- „Trans-Blot" Cell-Apparatur (BioRad)
- Blotting - Power Supply „2301 Macrodrive 1 Power Supply" (LKB Bromma)

**b) Methode**

Nach vorherigem Aufnahme-Experiment (siehe 3.7) und SDS-PAGE (siehe 3.7.1) folgte der Proteintransfer in Blotting-Puffer auf eine Nitrocellulose-Membran. Dabei war besonders auf das ständige Feuchthalten der Membran und das luftblasenfreie Auflegen des Gels auf diese zu achten. In einer Trans-Blot Cell-Apparatur wurde bei 4°C unter konstanter Stromstärke vier Stunden bei 400 mA bzw. über Nacht bei 200 mA geblottet.

**Ponceau-Färbung**

**a) Material**

Ponceau-Färbelösung 0,2% in 3% TCA (Serva)

Waschpuffer A

**b) Methode**

Zur Kontrolle der Blot-Effizienz wurde die Membran für 10 Minuten mit Ponceau-Lösung unter leichtem Schütteln gefärbt. Überschüssige Ponceau-Lösung wurde mit Aqua dest. Abgewaschen, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Nach Trocknen, Markierung der Markerbanden und Dokumentation, wurde die Membran mit Waschpuffer A wieder entfärbt.

**Immundetektion**

**a) Material**

- Waschpuffer A
  - ➔ 154 mM NaCl
  - ➔ 20 mM TRIS
  - ➔ 0,1% Tween 20 (BioRad)
  - ➔ ad 5 l Aqua dest.
  - ➔ pH 7,4
- Waschpuffer B
  - ➔ 154 mM NaCl
  - ➔ 20 mM TRIS
  - ➔ 0,1% Tween 20
  - ➔ 0,25% Nadoc
  - ➔ 0,1% SDS
  - ➔ ad 5 l Aqua dest.
  - ➔ pH 7,4
- PBS
- Blocklösung
  - ➔ 10% Milchpulver in Waschpuffer A
- ECL Entwicklungsreagenz (Amersham Biosciences)
- 1. Antikörper 1: in Waschpuffer A mit 5% BSA
  - ➔ anti-LRP1 vom Schaf (Heeren et al., 2001)
  - ➔ anti-ApoE (Dako)
  - ➔ Maus-Mix (aLRP-5A6 Maus monoklonal anti 85 kDa-LRP-Fragment, aLRP-8G1 Maus monoklonal anti 515 kDa-Fragment; Progen)
  - ➔ anti-LDLR vom Huhn (Progen)
- 2. Antikörper 1:5000 frisch in Blocklösung angesetzt:
  - ➔ Peroxidase-gekoppeltes Esel anti-Schaf IgG (Dashpo)

➔ Peroxidase-gekoppeltes Ziege anti-Kaninchen IgG (Garpo)

➔ Peroxidase-gekoppeltes Ziege anti-Maus IgG (Gampo)

➔ Peroxidase-gekoppeltes Ziege anti-Huhn IgG (Dianova, Hamburg)

**b) Methode**

Die Immundetektion erfolgte angelehnt an Beisiegel et al. (Beisiegel et al., 1982). Zunächst wurden die noch freien Bindungsstellen der Membran durch einstündige Inkubation mit 10% Milchpulver enthaltendem Waschpuffer A blockiert.

Anschließend wurde die Blocklösung mittels Waschpuffer A unter leichtem Schütteln abgewaschen und die Membran über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper, in Waschpuffer A mit 5% BSA, inkubiert. Vor Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde zweimal 10 Minuten mit Waschpuffer B und einmal 5 Minuten mit Waschpuffer A gewaschen. Es folgte die 90 minütige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörper 1:5000 verdünnt in Blocklösung. Nach erneuter Waschserie, die der zwischen den beiden Antikörperinkubationen entsprach, verblieb die Membran bis zur Weiterverarbeitung in PBS.

Die Membran wurde nun leicht mit Gel-Blotting-Papier abgetupft und für eine Minute mit ECL-Lösung inkubiert, diese wurde dann mittels Blotting-Papier wieder abgenommen. Die entstehende Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes detektiert. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach Bedarf unterschiedlich lang belichtet. Nach Entwicklung waren die Banden als dunkle Bereiche zu erkennen.

### 3.10.1 Multiplex-Western

**a) Material**

- Inkubationsmedium (1x KRP; 20 mM Hepes; 0,5% BSA; Aqua dest. ad 100 ml; pH 7,5)
- RIPA-Puffer (20 mM TRIS-HCL, pH 7,4; 5 mM EDTA; 50 mM NaCl; 10 mM Na-Pyrophosphat; 50 mM NaF; 1% Nonidet P40; Aqua dest.; für 10 ml RIPA-Puffer: 1 Tablette Mini Protease Inhibitor und 50 µl 200 mM $Na_3VO_4$ in $H_2O$, pH 10,2; 10% SDS)
- Blocklösung aus TBS (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7,6) und Tween 20 (0,1%) mit 5% Milchpulver
- Waschlösungen
  - ➔ TBS
  - ➔ TBS/Tween 20 (0,1%)

- PathScan Multiplex Western Cocktail I (Cell Signaling Technology)
    - ➔ 1. Antikörper 1:200 in TBS/Tween 20 (0,1%) mit 5% BSA
    - ➔ 2. Antikörper Garpo 1:5000 in Blocklösung

**b) Methode**

In dem zugehörigen Aufnahme-Experiment wurde KRP-Inkubationsmedium für die Inkubationsansätze verwendet, gewaschen wurde lediglich mit PBS. Die Zellen wurden mittels RIPA-Puffer von den Coverslips abgenommen. Die übrigen Arbeitsschritte, nachfolgende SDS-PAGE sowie das Blotten für 4 Stunden bei 400 mA, entsprachen den unter 3.8, 3.8.1 und 3.10 beschriebenen. Die Antikörperinkubationen und Detektionen wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

## 3.11 Indirekte Fluoreszenz

**a) Material**

- Coverslips mit FAO-, HEK293- oder HIR-11-Zellen
- Aufnahmelösung:
    - ➔ DMEM mit GlutaMAX-I (Gibco) mit 2% BSA (Sigma)
    - ➔ Cy5-gelabelte ApoEx assoziiert mit TRL (je nach Versuchsansatz)
    - ➔ 100 nM Insulin (je nach Versuchsansatz)
- Waschlösungen:
    - ➔ PBS mit 100 U/ml Heparin (Liquemin$^{R}$ von Roche)
    - ➔ PBS (Gibco)
- Fixationslösung: 4% Paraformaldehyd (PFA) (Sigma) in PBS
- 4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indol „DAPI" (Sigma)
- 0,1% 1,2 Phenylendiamin (PPD) (Merck) in Mowiol (Calbiochem)
- Nagellack
- Objektträger (Engelbrecht)

**b) Methode**

Nach 60 minütiger Inkubation mit der Aufnahmelösung (Durchführung siehe 3.8) wurden die mit Zellen beschichteten Coverslips in 24-Well-Platten verbracht, einmal mit PBS-Heparin und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Es folgte die Fixierung für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer 4% PFA-PBS-Lösung mit 150 µl pro Coverslip. Nach drei mal zwei Minuten Waschen in PBS wurden die Zellen zur DNA-Färbung mit 5 µM DAPI

in PBS für 5 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach anschließendem einmaligen Waschen in PBS konnten die Coverslips nun, mit der die Zellen enthaltenden Seite nach unten, auf einen Objektträger fixiert werden. Wichtig war hierbei das luftblasenfreie Auflegen der Coverslips auf einen – dem Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes dienenden – Tropfen 0,1% PPD in Mowiol. Abschließend wurden die Coverslips zum luftdichten Abschluss mit Nagellack umrandet. Im Fluoreszenz- bzw. Konfokalen Laser Scanning Mikroskop konnten die Zellen nun angesehen werden.

## 3.12 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Laser Scanning Mikroskop LSM 510 Meta von Zeiss mit Ölimmersionsobjektiven. Die Aufnahme der Fluoreszenzen erfolgte, nach Einkopplung der zugehörigen Laserlinie (siehe Tab.1), über einen der klassischen PMT-Detektoren mit einem vorgeschalteten Farbfilter.

| **Fluorophor** | **Anregung** | **Detektionsfenster** |
|---|---|---|
| DAPI | 364 nm | (435-485) nm |
| ECFP | 458 nm | (475-525) nm |
| EGFP, Alexa488 | 488 nm | (505-550) nm |
| Cy3 | 543 nm | (560-615) nm |
| Cy5 | 633 nm | >650 nm |

Tab.1: Einstellungen zur Detektion verschiedener Fluorophore mit dem LSM 510 META

# 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte der Einfluß von LRP1 auf die zelluläre Aufnahme und das Recycling der ApoE-Isoformen sowie die Abhängigkeit dieser Vorgänge von Insulin untersucht werden. Da HDL im extrazellulären Medium das ApoE-Recycling vermittelt, sollte auch hier eine mögliche Abhängigkeit von LRP1 und Insulin untersucht werden. In den Versuchen wurden insulinsensitive FAO-Zellen und mittels Transfektion hergestellte LRP1-überexprimierende HEK293-Zellen verwendet. Es wurden zunächst Liganden mit einer Fluoreszenzmarkierung hergestellt, die in darauf folgenden Aufnahme- und Recycling-Experimenten eingesetzt werden sollten. Mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion im Gel konnten abschließend Analysen erstellt und quantitative Aussagen gemacht werden. Die in den Abbildungen angegebenen Molekulargewichte wurden mit Hilfe eines bei jedem Gel mitlaufenden, reduziert aufgetragenen Molekulargewichtsmarkers bestimmt.

## 4.1 Präparation und Charakterisierung Fluoreszenz-markierter Lipoproteine

Zur Untersuchung der ApoE-vermittelten Aufnahme von Lipoproteinen wurden TRL und deren Remnants genutzt. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen ApoE-Isoformen (ApoE2/ApoE3/ApoE4) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert und im Anschluß an TRL assoziiert. Die genaue Herstellung dieser Liganden ist unter 3.7 im Teil „Material und Methoden" beschrieben. Zur Kontrolle der erfolgreichen Markierung und zur anschließenden Konzentrationsbestimmung wurden die Liganden einer SDS-PAGE unterzogen, mit Hilfe des Fluoreszenzscanners wurde die Cy5-Fluoreszenz im Gel detektiert und die Banden quantifiziert (Abb. 4a).

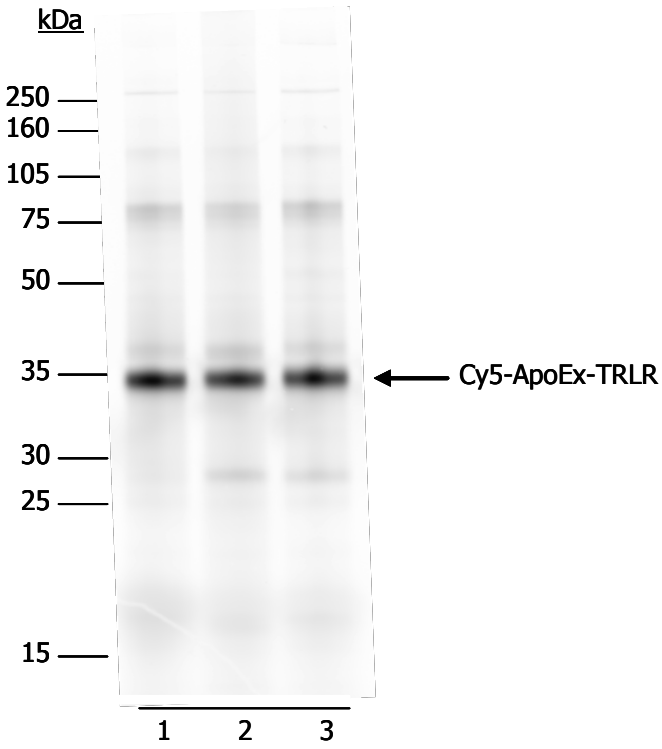


**Abb. 4a: Ligandengel Cy5-ApoEx-TRLR.** Nach Herstellung der Liganden (siehe 3.7) erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung. Dafür wurden gleiche Volumina von Cy5-ApoE2-TRLR (1), Cy5-ApoE3-TRLR (2) und Cy5-ApoE4-TRLR (3) aufgetragen. Die Abbildung zeigt die mit dem Fluoreszenzscanner sichtbar gemachte Fluoreszenzmarkierung der an TRLR gekoppelten ApoE-Isoformen bei einer Größe von 34 kDa.

Die Quantifizierung der in der Abbildung gezeigten ApoE-Banden erlaubte ein genaues Errechnen der Konzentrationen und daraus resultierendes Einsetzen gleicher Mengen in den Versuchen. Um die ApoE-Isoformen zu detektieren, wurde teilweise das an die TRL assoziierte ApoE des Spenders entfernt. Dazu wurden die TRL vor Assoziation mit Cy5-ApoE zunächst trypsiniert und reisoliert. Das erfolgreiche Entfernen von endogenem ApoE zeigt die folgende Abbildung (Abb. 4b).

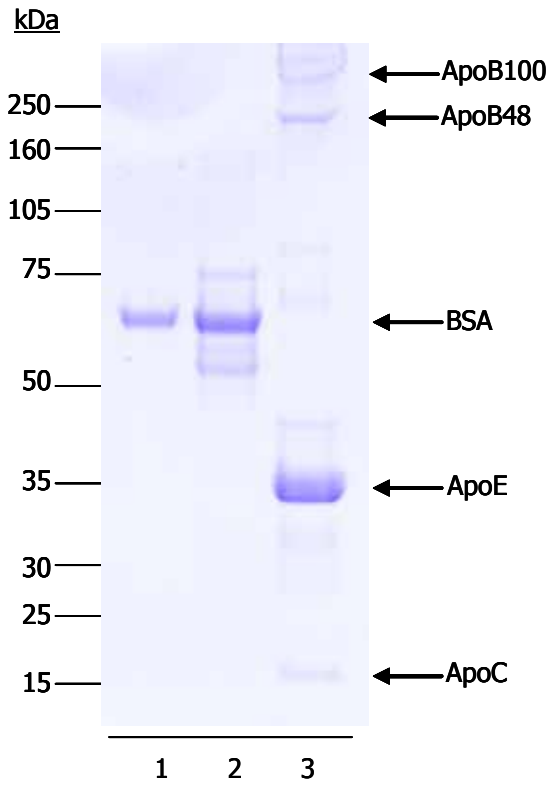


**Abb. 4b: Coomassie-Gel mit TRL vor und nach Trypsinierung.** Dargestellt ist ein Coomassie gefärbtes Gel. Aufgetrennt wurden BSA (1), trypsinierte TRL (2) und native TRLR (3).

Es ist deutlich zu sehen, dass die TRL nach Trypsinierung kein ApoB und ApoE mehr enthalten. Durch Zentrifugation wurde das Trypsin entfent. Im Anschluß konnten die mit Cy5 markierten ApoE-Isoformen mit TRL assoziiert und für die Aufnahmeexperimente genutzt werden. Abbildung 4c zeigt, dass Cy5-ApoE auch nach Trypsinierung der TRL noch immer funktionsfähig und an TRL zu koppeln war. Die kein endogenes ApoE mehr enthaltenen Liganden konnten nun in unseren Versuchen zum Einsatz kommen.

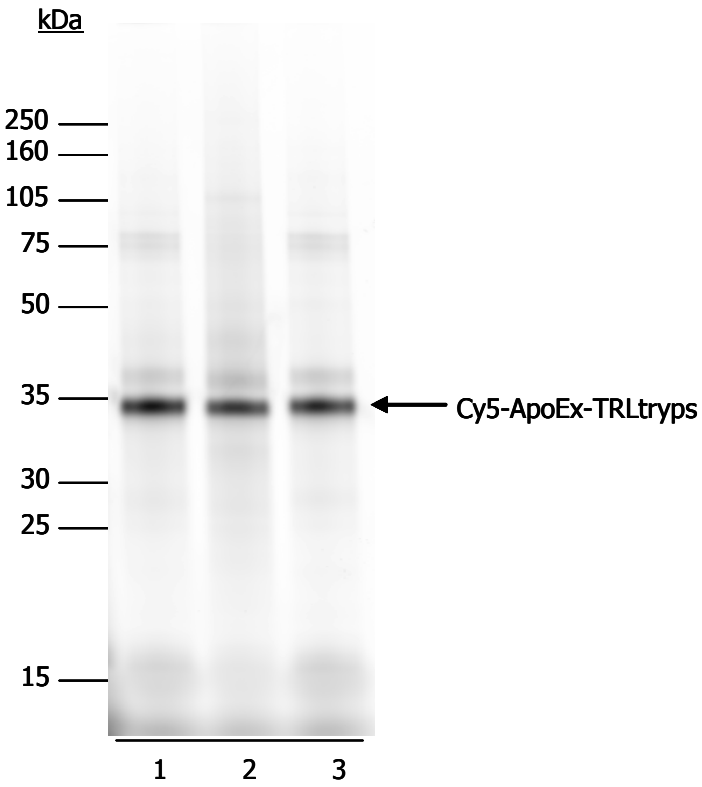


**Abb. 4c: Ligandengel Cy5-ApoEx-TRLtryps.** Nach Trypsinierung der TRL folgte die unter 3.7.2 beschriebene Markierung der ApoE-Isoformen und ihre Kopplung an TRLtryps. Nach SDS-PAGE mit gleichen Volumina und Detektion von Cy5 erkennt man bei einer Größe von 34 kDa die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markierten ApoE2-TRLtryps (1), ApoE3-TRLtryps (2) und ApoE4-TRLtryps (3).

Es konnte gezeigt werden, dass alle Liganden gleichmäßig markiert vorlagen und somit unter gleichen Voraussetzungen in den Versuchen eingesetzt und quantitativ verglichen werden konnten.

## 4.2 LRP1-EGFP-Expression in HEK293-Zellen

Um die Wechselwirkung von ApoE mit LRP1 untersuchen und LRP1-spezifische Effekte darstellen zu können, wurden die Zellen mit einem LRP1-EGFP-Plasmid transfiziert (Laatsch et al., 2004). Die verwendeten HEK293-Zellen schienen geeignet, da sie sich gut transfizieren lassen (Thomas und Smart, 2005) und ihrerseits, im Vergleich zu Leberzellen, nur eine geringe endogene LRP1-Aktivität aufweisen. In Abbildung 5 sind zunächst schematisch die verschiedenen, nach Transfektion mit LRP1-EGFP-Plasmid zu erwartenden, Moleküle dargestellt. Aufgrund des EGFP-*Tags* konnte das in dieser Arbeit

verwendete LRP1-EGFP mit Hilfe des Fluoreszenzscanners bei 488 nm detektiert und somit sichtbar gemacht werden.

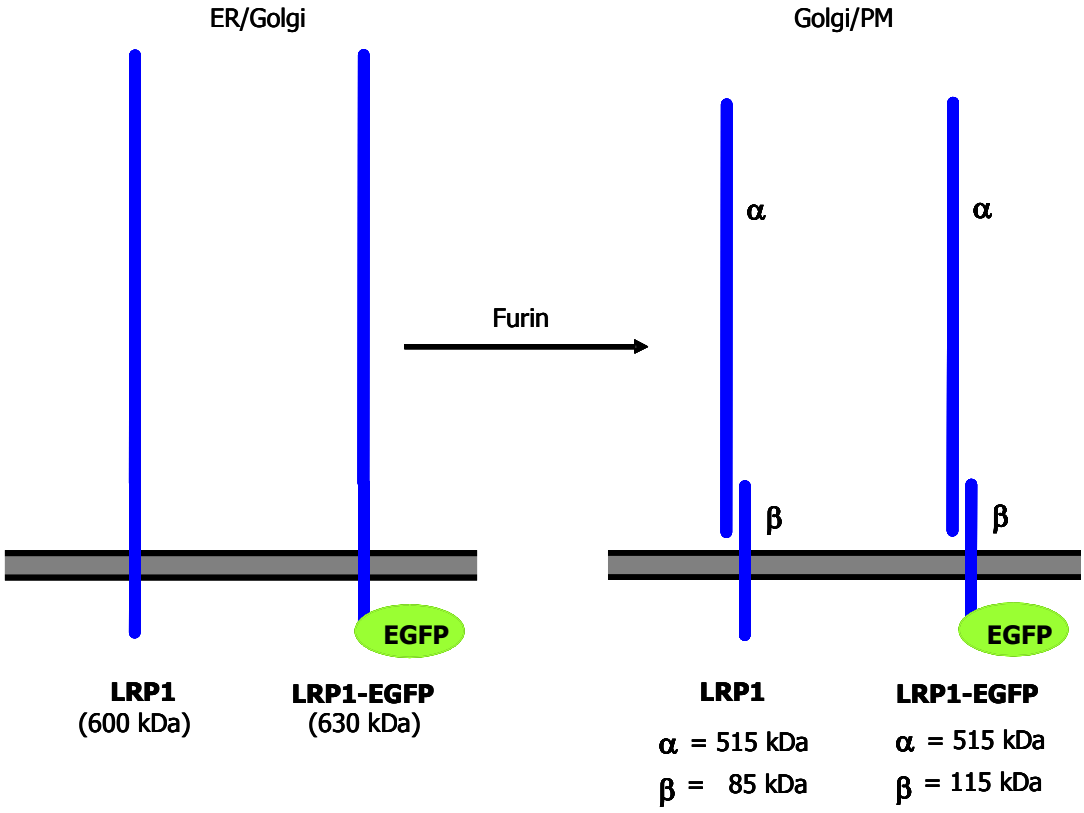


**Abb. 5: LRP1-Wildtyp und LRP1-EGFP-Fusionsprotein.** In dieser Abbildung sind schematisch der LRP1-Wildtyp und das mit EGFP gelabelte LRP1 vor und nach Prozessierung durch die Protease Furin dargestellt. Zunächst erkennt man das im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat vorliegende LRP1 bzw. LRP1-EGFP mit einer Größe von 600 bzw. 630 kDa. Nach Prozessierung findet man im Golgi-Apparat und in der Plasmamembran (PM) eine α- und eine kleinere β-Untereinheit. Letztere, transmembranös gelegen, weist EGFP am C-terminalen Ende auf.

Entsprechend dem Schema in der Abbildung würden nach Transfektion mit dem Plasmid für LRP1-EGFP zu den zwei Untereinheiten der endogenen Synthese zwei zusätzliche Fragmente mit leicht veränderter Größe zu erwarten sein.

Um zunächst die optimalen Expressionslevel der nativen prozessierten Form von LRP1 zu erreichen, wurde zunächst untersucht, ob die Co-Transfektion mit dem Lipoprotein-Rezeptor-Chaperon RAP die Prozessierung von LRP1 beeinflusst. Zur Auftrennung größerer Proteine wurde im folgenden Versuch (Abb. 6) ein TRIS–Acetat-Gel verwendet.

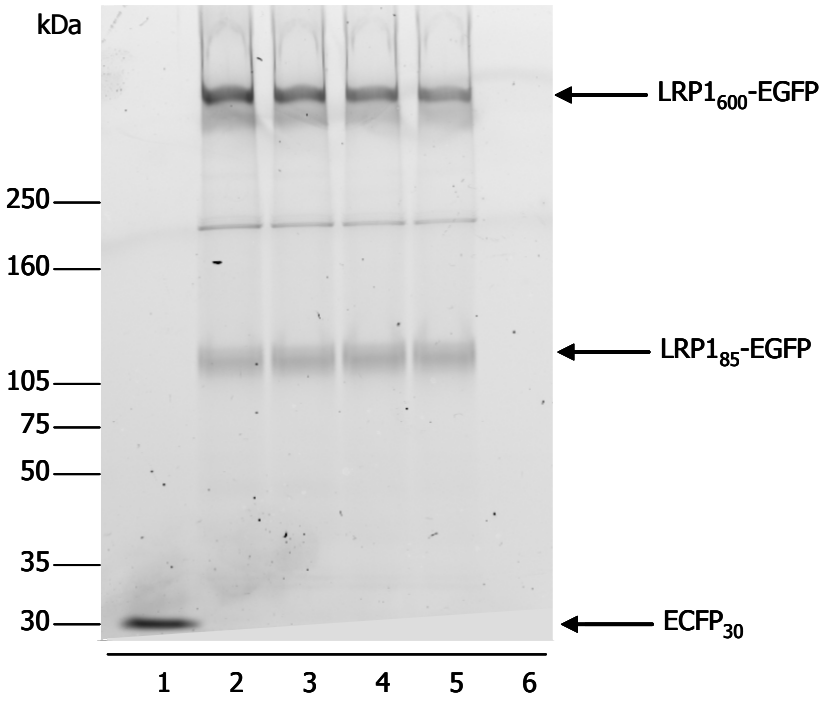


**Abb. 6: Co-Transfektion von HEK293-Zellen mit LRP1-EGFP und RAP.** Die Zellen wurden nach Erreichen einer Subkonfluenz mit unterschiedlichen Transfektionsansätzen in 6-Well-Platten transfiziert. 1 µg ECFP (1), 1 µg LRP1-EGFP (2), 1 µg LRP1-EGFP + 0,1 µg RAP (3), 1 µg LRP1-EGFP + 0,5 µg RAP (4), 1 µg LRP1-EGFP + 1 µg RAP (5), 1 µg RAP (6). Jeweils 10 µg Protein wurden auf ein TRIS-Acetat-Gel aufgetragen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung konnte mittels Fluoreszenzscanner ECFP/EGFP (Cy2) detektiert und die gezeigte Abbildung erstellt werden.

Die Probe 1 zeigt die Kontroll-Transfektion mit ECFP bei 30 kDa. 2-5 weisen eine gleichmäßige Transfektion mit LRP1-EGFP auf, es sind die nicht prozessierte Form ($LRP1_{600}$-EGFP) und das β-Fragment nach Prozessierung ($LRP1_{85}$-EGFP) zu erkennen. Die Banden mit einer Größe von etwa 200 kDa in den Proben 2-5 stellen möglicherweise Abbauprodukte von LRP1-EGFP mit einem Anteil des C-terminalen Fragmentes dar. Die Co-Transfektion mit RAP führte zu keiner veränderten intrazellulären LRP1-Prozessierung.

In Abbildung 7a wurde zunächst das Zellprotein von HEK293-Zellen bzw. von pLRP1-EGFP transfizierten HEK293-Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluß wurde die Fluoreszenz von LRP1-EGFP mittels Fluoreszenzscanner detektiert.

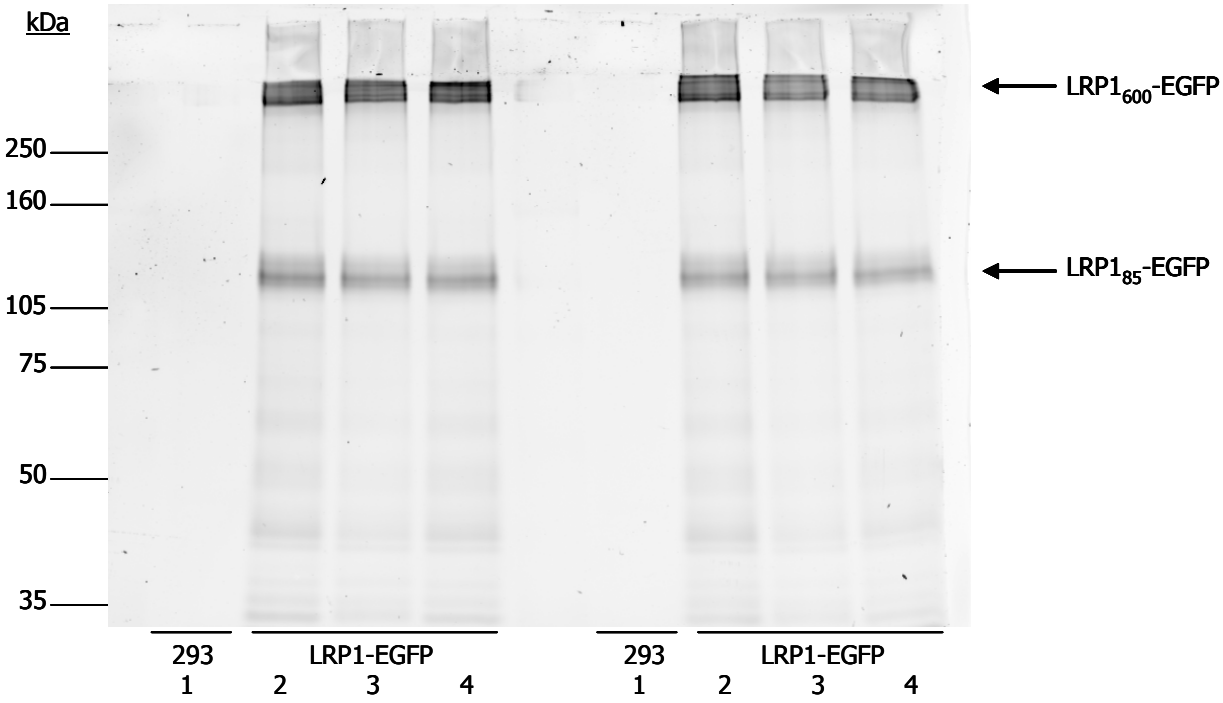


**Abb. 7a: LRP1-EGFP-Detektion in Gel.** Es wurden Transfektionen mit unterschiedlichen Verhältnissen von LRP1-EGFP-Plasmid-DNA zum Transfektionsreagenz Fugene 6 getestet. HEK293-Zellen wurden in 6-Well-Platten im Verhältnis 1:3 (2) (1 µg Plasmid-DNA, 3 µl Fugene 6 pro Well), 1:6 (3) und 2:6 (4) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert, eine Proteinbestimmung durchgeführt und jeweils 50 µg Protein, gemischt mit reduziertem Puffer, auf ein 7,5%iges Neville-Gel aufgetragen. Mit Hilfe des Fluoreszenzscanners konnte EGFP detektiert und die erfolgreiche Transfektion dargestellt werden. In der Kontrollprobe, HEK293-Zellen ohne Transfektion, ist in der EGFP-Detektion kein Signal erkennbar (1). Die transfizierten Zellen weisen bei 630 kDa und 115 kDa ein Signal auf.

Aufgrund des ca. 30 kDa großen EGFP-*Tags* wird das Molekulargewicht von der 85 kDa β-Untereinheit des LRP1 auf 115 kDa erhöht. Da der EGFP-*Tag* an dem C-Terminus des Proteins kloniert wurde, deutet die Fluoreszenz bei 600 kDa daraufhin, dass auch nicht prozessiertes LRP1 in der Zelle vorliegt.

Da sich bei den getesteten Verhältnissen zwischen Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz keine Unterschiede zeigten, wurden in den folgenden Versuchen stets Transfektionen im Verhältnis 1:3 durchgeführt.

Die Expression der Rezeptor-Fragmente konnte durch Western Blotting des Zellproteins und anschließender Detektion der Rezeptorproteine mit spezifischen Antikörpern verifiziert werden. Das in Abb. 7a gezeigte Gel wurde einer Immundetektion mit einem, spezifisch gegen die β-Untereinheit von LRP1 gerichteten, Antikörper unterzogen (Abb. 7b). Ein Mix aus monoklonalen Antikörpern der Maus wurde zur Erkennung sowohl der β- als auch der α-Untereinheit eingesetzt (Abb. 7c).

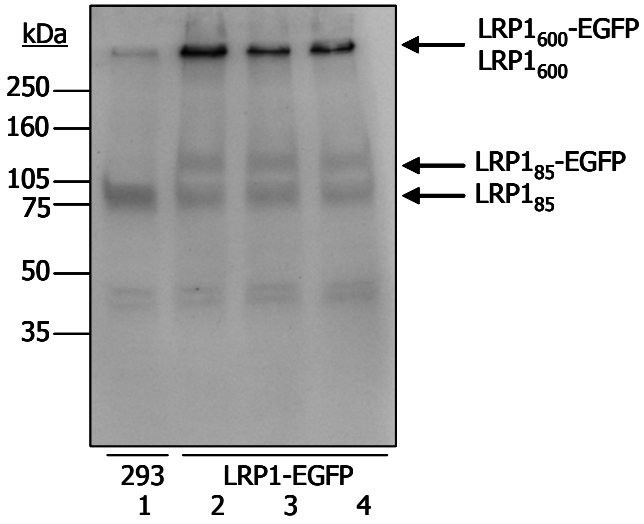


**Abb. 7b: Western Blot mit Antikörper gegen die β-Untereinheit von LRP1.** Diese Abbildung zeigt das in Abb. 7a dargestellte Gel nach über-Nacht-Inkubation mit einem ersten Antikörper aus dem Schaf, der gegen die 85 kDa große β-Untereinheit von LRP1 gerichtet ist. Anschließende Inkubation mit einem zweiten Antikörper, Peroxidase-gekoppelten Esel anti-Schaf IgG, erlaubt mittels ECL-Detektion das Sichtbarmachen der Untereinheit. Die Kontrollprobe (1) weist endogenes LRP1 sowohl in prozessierter (85 kDa) als auch in unprozessierter (600 kDa) Form auf. Die Transfektionsansätze 1:3 (2), 1:6 (3) und 2:6 (4) zeigen sowohl endogenes als auch mit EGFP fusioniertes LRP1. Es sind Banden bei 85 und 115 kDa, bei 600 und 630 kDa zu erkennen. Eine Trennung der großen Fragmente bei erwarteten 600 und 630 kDa ist aufgrund der gewählten Trenngröße nicht möglich.

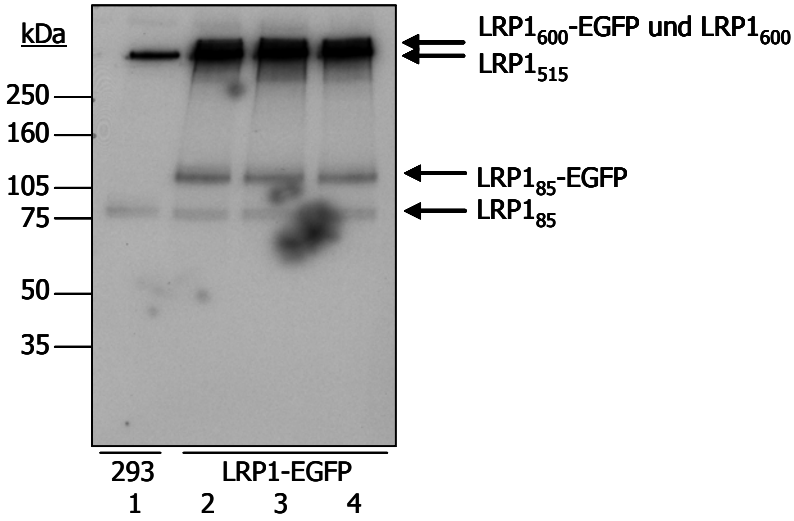


**Abb. 7c: Western Blot mit Antikörper gegen die α- und β-Untereinheit von LRP1 – Monomix Maus.** Diese Abbildung zeigt das in Abb. 7a dargestellte Gel nach über-Nacht-Inkubation mit einem Mix aus monoklonalen Antikörpern von der Maus, gerichtet gegen das 85 kDa- und 515 kDa-Fragment von LRP1. Anschließende Inkubation mit einem zweiten Antikörper, Peroxidase-gekoppelten Ziege anti-Maus IgG, erlaubt mittels ECL-Detektion das Sichtbarmachen der Fragmente. Die Kontrollprobe (1) weist endogenes LRP1 sowohl in prozessierter (85 kDa und 515 kDa) als auch in unprozessierter (600 kDa) Form auf. Die Transfektionsansätze 1:3 (2), 1:6 (3) und 2:6 (4) zeigen sowohl endogenes als auch mit EGFP fusioniertes LRP1. Es sind Banden bei 85 kDa und 115 kDa, ebenso verstärkte Banden bei 515 bzw. 600 und 630 kDa zu erkennen.

Der Nachweis der 515 und 85 kDa-Fragmente im Western Blot mit monoklonalem Maus–Mix-Antikörper läßt davon ausgehen, dass die prozessierten Formen von LRP1 nach Transfektion in den Zellen vorhanden sind. Wenn das überwiegende Vorliegen der unprozessierten Form mit einer verminderten LRP1-vermittelten Endozytoserate einhergeht (Willnow et al., 1996), konnten wir mit dieser Darstellung sicherstellen, dass in den von uns transfizierten Zellen die prozessierten Formen vorlagen und damit die nötigen Bedingungen für die darauf folgenden Aufnahme-Experimente geschaffen wurden.

Um das Vorhandensein des LDL-Rezeptors in unseren Zellen nachzuweisen und dessen mögliche Einflußnahme auf die ApoE-Aufnahme erklären zu können, wurde in einer weiteren Immundetektion ein Antikörper vom Huhn, gerichtet gegen den LDLR, eingesetzt (Abb. 7d).

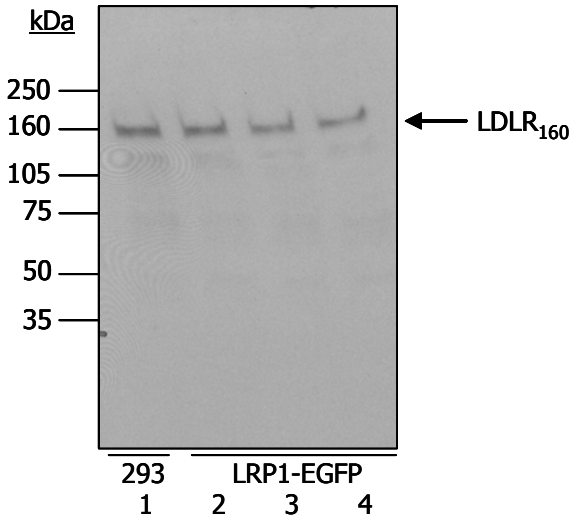


**Abb. 7d: Western Blot mit Antikörper gegen den LDLR.** Diese Abbildung zeigt ein wie in Abb. 7a dargestelltes Gel nach über-Nacht-Inkubation mit einem ersten Antikörper vom Huhn, gerichtet gegen den 160 kDa großen LDL-Rezeptor. Anschließende Inkubation mit einem zweiten Antikörper, anti-Huhn IgG, erlaubt mittels ECL-Detektion das Sichtbarmachen der LDLR-Banden. Sowohl die Kontrollprobe (1) als auch die Proben mit den Transfektionsansätzen 1:3 (2), 1:6 (3) und 2:6 (4) weisen den LDL-Rezeptor auf.

Die Expressionshöhe des LDLR ändert sich nach Transfektion nur unwesentlich. Tendenziell wird die LDLR-Expression nach erhöhter LRP1-Expression, wie erwartet, eher geringfügig reduziert (Rohlmann et al., 1998).

Die Abbildung 8 zeigt HEK293-Zellen nach ECFP- und LRP1-EGFP-Transfektion in der konfokalen Mikroskopie. Die Darstellung der Fluoreszenzen von ECFP und EGFP dient der Überprüfung des Transfektionserfolges.

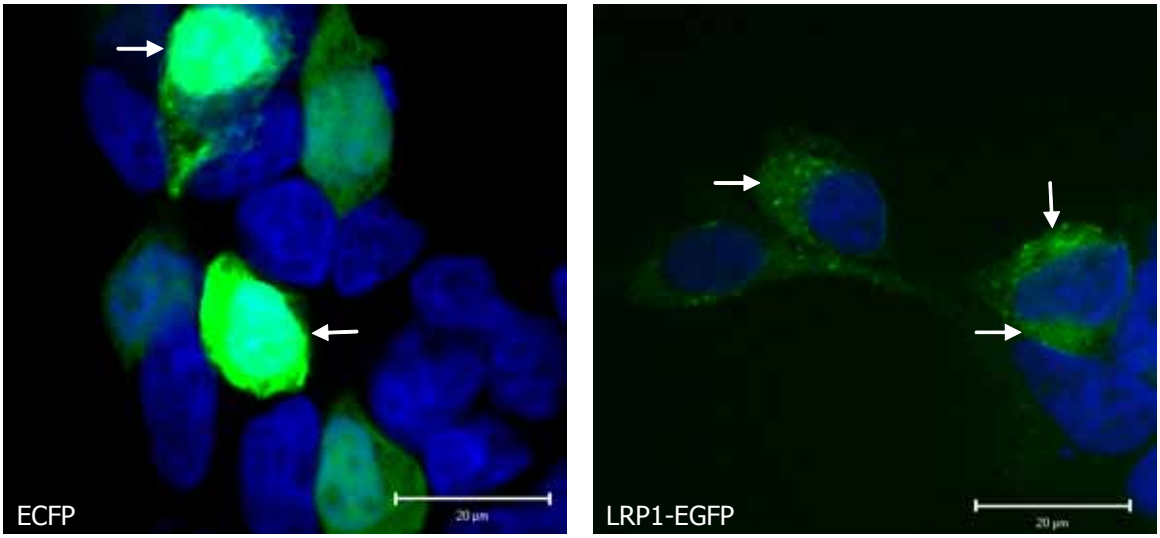


**Abb. 8: ECFP- und LRP1-EGFP-Transfektion in HEK293-Zellen.** HEK293-Zellen wurden in 6-Well-Platten auf Coverslips ausgesetzt und am Folgetag mit ECFP- bzw. LRP1-EGFP-Plasmid-DNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen und anschließend 30 Minuten mit PFA/PBS fixiert. Es folgten weitere Waschschritte und die Blau-Färbung der Zellkerne mit DAPI. Die Coverslips wurden nun in 0,1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Die Fluoreszenz von ECFP und EGFP kann im konfokalen Mikroskop bei entsprechender Wellenlänge erkannt und dargestellt werden. Die mit Pfeilen beispielhaft markierten Zellen weisen eine Überexpression von ECFP bzw. LRP1-EGFP auf. LRP1-EGFP ist vesikulär angeordnet im Zytoplasma zu erkennen.

Die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte mit ECFP bzw. LRP1-EGFP. Die mit Pfeilen markierten Zellen zeigen den Transfektionserfolg. Es ist deutlich zu sehen, dass die Fluoreszenz von ECFP im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu wird das Fusionsprotein LRP1-EGFP, wie erwartet, in perinukleär lokalisierten endosomalen Kompartimenten detektiert.

Viele immortalisierte Zelllinien wiesen keine Sensitivität gegenüber dem postprandialen Hormon Insulin auf. Da der Einfluß von Insulin in dieser Arbeit untersucht werden sollte, wurde zunächst die Insulin-Sensitivität der verwendeten Zelllinien mittels Multiplex-Western überprüft. Hierzu wurde ein Kit eingesetzt, mit dem eine gleichzeitige Detektion der Aktivitätszustände von Phospho-Akt, Phospho-p44/42 MAP-Kinase, Phospho-p90RSK und Phospho-S6 Ribosomal Protein möglich ist. Akt spielt bei der Aufrechterhaltung des

Gleichgewichts zwischen Leben und Apoptose einer Zelle eine wesentliche Rolle. Diese Proteinkinase wird unter anderem von Insulin aktiviert (Kumar et al., 2007). MAP-Kinasen, sowohl p42 als auch p44, spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung, sie werden von einer Vielfalt extrazellulärer Signale wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen, aber auch Neurotransmittern und Hormonen aktiviert (Longuet et al., 2005). Ein weiteres Target nach p44/42 MAP-Kinase ist p90RSK. Die Phosphorylierung des S6 Ribosomal Protein korreliert mit Erhöhung der Translation.
In Abbildung 9a ist ein typischer Versuch zur Untersuchung der Insulin-Sensitivität in den verwendeten Rattenhepatomzellen (FAO) gezeigt, die in Medien mit niedriger bzw. hoher Glukosekonzentration kultiviert wurden. Zusätzlich wurde untersucht, ob ApoE die Insulin-Sensitivität in den Zellen beeinflusst.

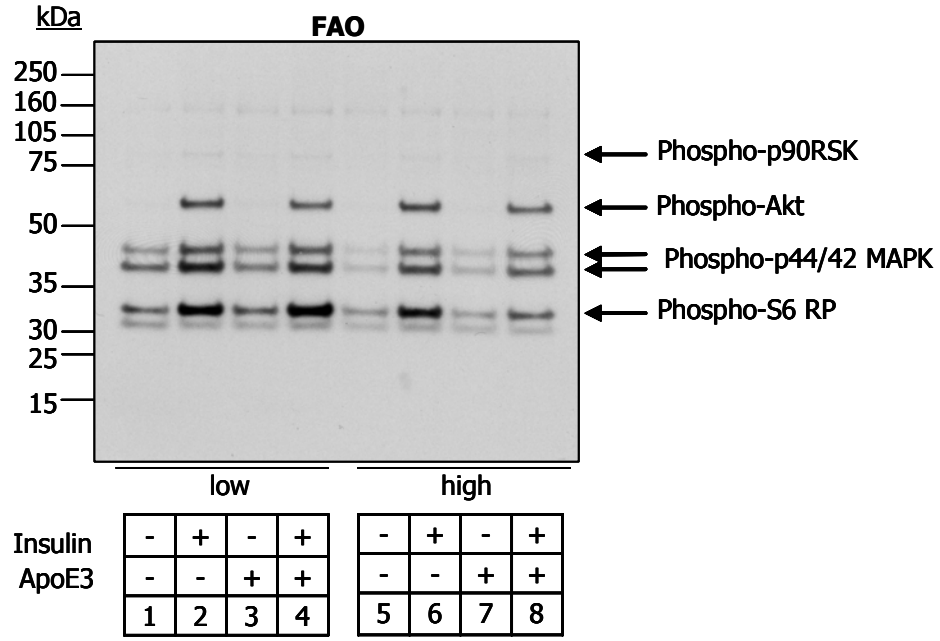


**Abb. 9a: Multiplex-Western mit insulinsensitiven FAO-Zellen.** Die Abbildung zeigt die Insulin-Sensitivität von FAO-Zellen, die in Medium mit 1000 mg/l Glukose (low) bzw. in Medium mit 4500 mg/l Glukose (high) gewachsen sind. Nach 15 minütiger Inkubation mit Ansätzen ohne Zusätze (1, 5), mit 100 nM Insulin enthaltenden Ansätzen (2, 6), mit 10 µg/ml ApoE3 enthaltenden Ansätzen (3, 7) und mit Ansätzen sowohl Insulin als auch ApoE3 enthaltend (4, 8), wurden die auf Coverslips gewachsenen Zellen mittels RIPA-Puffer abgenommen. In nachfolgender SDS-PAGE wurden jeweils 10 µg Protein aufgetragen. Zur Immundetektion wurde das *PathScan Multiplex Western Cocktail Detection Kit* verwendet. Dieses läßt folgende Banden erkennen: Phospho-p90RSK bei 90 kDa, Phospho-Akt bei 60 kDa, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (MAPK) bei 44 und 42 kDa und Phospho-S6 Ribosomal Protein (S6 RP) bei 32 kDa.

Sowohl unter niedrigen als auch unter hohen Glukose-Bedingungen ist durch Insulin eine vermehrte Aktivierung von Phospho-Akt, Phospho p44/42 MAP-Kinase und Phospho-S6

Ribosomal Protein zu erkennen. ApoE3 stimuliert die Phosphorylierung nicht (3, 7) und beeinflusst auch nicht die insulininduzierte Phosphorylierung. P90RSK ist weder basal noch durch Zusatz von Insulin oder ApoE3 aktivierbar.

Da FAO nur schlecht zu transfizieren sind, wurden viele Experimente in HEK293-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist in Abbildung 9b die Insulin-Sensitivität von HEK293-Zellen mit Überexpression von LRP1-EGFP und EGFP-Kontroll-Transfektion.

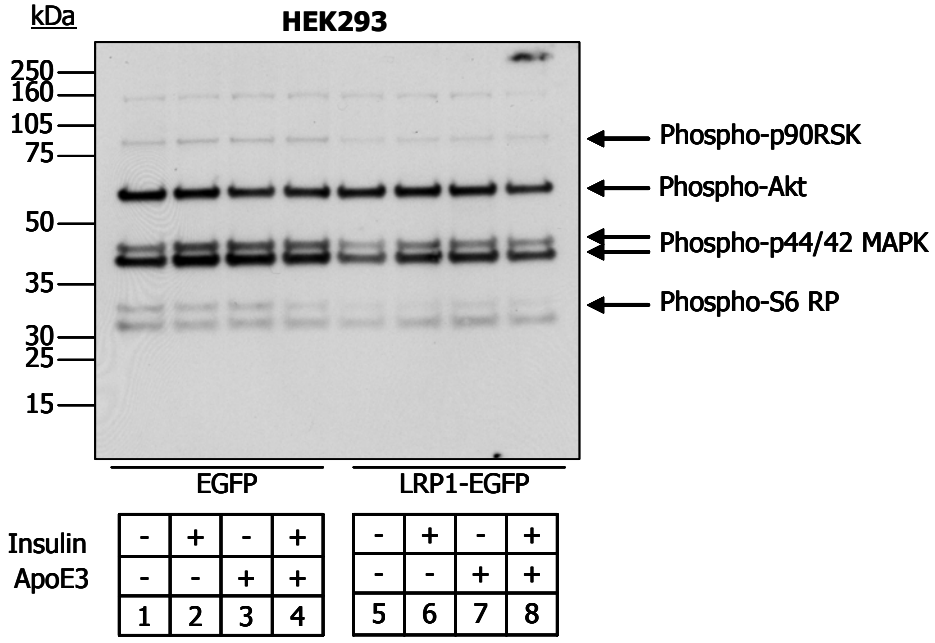


**Abb. 9b: Multiplex-Western mit HEK293-Zellen.** Die Abbildung zeigt die Insulin-Sensitivität von HEK293-Zellen. Nach 15 minütiger Inkubation mit Ansätzen ohne Zusätze (1, 5), mit 100 nM Insulin enthaltenden Ansätzen (2, 6), mit 10 µg/ml ApoE3 enthaltenden Ansätzen (3, 7) und mit Ansätzen sowohl Insulin als auch ApoE3 enthaltend (4, 8), wurden die auf Coverslips gewachsenen Zellen mittels RIPA-Puffer abgenommen. In nachfolgender SDS-PAGE wurden jeweils 10 µg Protein aufgetragen. Zur Immundetektion wurde das *PathScan Multiplex Western Cocktail Detection Kit* verwendet. Dieses läßt folgende Banden erkennen: Phospho-p90RSK bei 90 kDa, Phospho-Akt bei 60 kDa, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (MAPK) bei 44 und 42 kDa und Phospho-S6 Ribosomal Protein (S6 RP) bei 32 kDa.

In Abbildung 9b ist deutlich zu erkennen, dass die Phosphorylierung von Akt und aller anderen untersuchten Signalproteine bereits basal aktiviert ist. Weder durch Insulin noch durch ApoE3 wird die Phosphorylierung in diesen Zellen beeinflusst. Die Transfektion mit LRP1-EGFP scheint leicht inhibierend auf die Phosphorylierung von Phospho-p44/42 MAP-Kinase zu wirken.

Um ein besseres insulinsensitives Transfektionsmodell zur Verfügung zu haben, wurden ebenfalls die Insulin-Rezeptor-überexprimierenden HIR-11-Zellen untersucht (Abb. 9c).

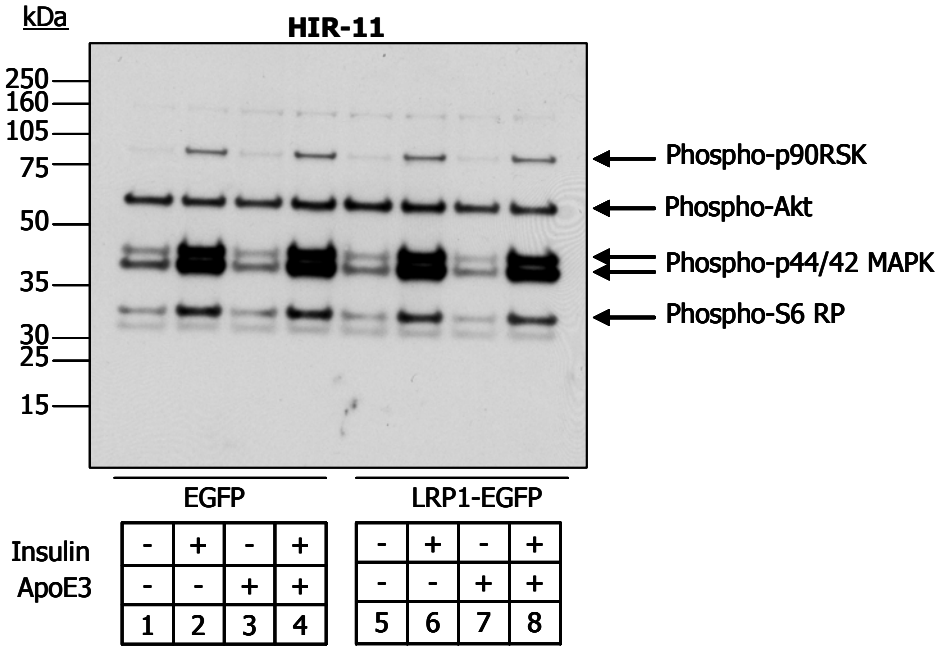


**Abb. 9c: Multiplex-Western mit Insulin-Rezeptor-überexprimierenden HEK293-Zellen – HIR-11-Zellen.** Die Abbildung zeigt die Insulin-Sensitivität von HIR-11-Zellen. Nach 15 minütiger Inkubation mit Ansätzen ohne Zusätze (1, 5), mit 100 nM Insulin enthaltenden Ansätzen (2, 6), mit 10 µg/ml ApoE3 enthaltenden Ansätzen (3, 7) und mit Ansätzen sowohl Insulin als auch ApoE3 enthaltend (4, 8), wurden die auf Coverslips gewachsenen Zellen mittels RIPA-Puffer abgenommen. In nachfolgender SDS-PAGE wurden jeweils 10 µg Protein aufgetragen. Zur Immundetektion wurde das *PathScan Multiplex Western Cocktail Detection Kit* verwendet. Dieses läßt folgende Banden erkennen: Phospho-p90RSK bei 90 kDa, Phospho-Akt bei 60 kDa, Phospho-p44/42 MAP-Kinase (MAPK) bei 44 und 42 kDa und Phospho-S6 Ribosomal Protein (S6 RP) bei 32 kDa.

In dieser Zelllinie wird durch Zusatz von Insulin die Phosphorylierung von 90RSK, den MAP-Kinasen und S6 Ribosomal Protein deutlich stimuliert (2, 4, 6, 8). Phospho-Akt liegt in den HIR-11-Zellen bereits basal im aktivierten Zustand vor. ApoE3 hat keinen nennenswerten Einfluß auf die Phosphorylierung. Ein Unterschied der Insulin-Sensitivität zwischen EGFP-Kontroll- und LRP1-EGFP-Transfektion ist nicht zu erkennen.

In der nächsten Abbildung ist die zelluläre Lokalisation von LRP1-EGFP in den HIR-11-Zellen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie, vor (Abb. 10a) und nach (Abb. 10b) Insulin-Stimulus dargestellt.

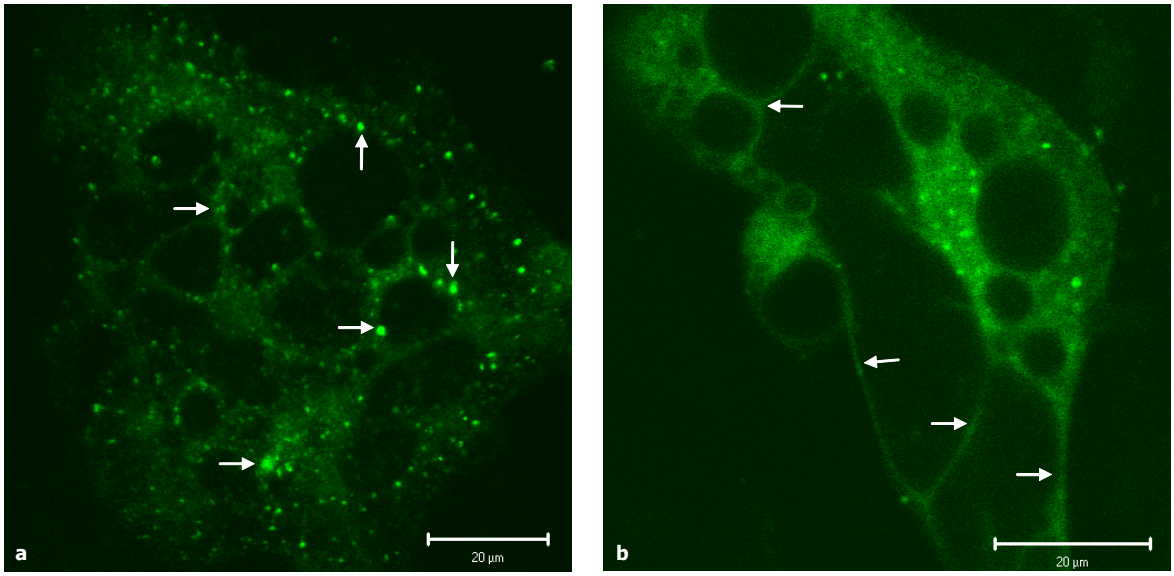


**Abb. 10a und 10b: LRP1-EGFP-überexprimierende HIR-11-Zellen vor (a) und nach (b) 30 minütiger Insulin-Inkubation.** Die in 6-Well-Platten auf Coverslips ausgesetzten HIR-11-Zellen wurden am Folgetag mit LRP1-EGFP transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen 30 Minuten mit einem 2% BSA enthaltenden serumfreien Medium ohne weitere Zusätze (a) bzw. mit Zusatz von 100 nM Insulin inkubiert. Dem Waschen mit PBS folgte die 30 minütige Fixierung mit PFA/PBS. Die Coverslips wurden nun, nach weiteren Waschvorgängen, in 0,1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Die Fluoreszenz von EGFP konnte dann im konfokalen Mikroskop bei entsprechender Wellenlänge erkannt und dargestellt werden. Die mit Pfeilen beispielhaft markierten Strukturen stellen zytoplasmatische, LRP1-EGFP enthaltende Vesikel (a) bzw. das an die Plasmamembran translozierte LRP1-EGFP dar.

Unter basalen Bedingungen ist LRP1-EGFP primär in endosomalen Kompartimenten lokalisiert. Die 30 minütige Inkubation mit Insulin bewirkte in den LRP1-EGFP-überexprimierenden HIR-11-Zellen eine Translokation von LRP1 an die Plasmamembran.

Die in dieser Arbeit meist benutzten HEK293-Zellen sind insgesamt wenig und nur unter bestimmten Bedingungen insulinsensitiv. Zu Beginn der Arbeit stand keine geeignetere Zelllinie zur Verfügung, so dass auf diese zurückgegriffen wurde. Die weitaus insulinsensitiveren HIR-11-Zellen konnten erst gegen Ende der Arbeit eingesetzt werden.

## 4.3 Insulin-abhängige Aufnahme von LRP1-Liganden

Um genauere Aussagen über die LRP1- und Insulin-abhängige Aufnahme der ApoE-Isoformen machen zu können, wurde eine Reihe von Aufnahme-Experimenten durchgeführt. Die zunächst gezeigten Abbildungen stellen die Aufnahme in FAO-Zellen

dar. Hiermit sollte die basale Aufnahme von ApoE und ihre Insulin-Abhängigkeit untersucht werden. Cy5 markiertes RAP wurde als Ligand eingesetzt, da es ein für LRP1 spezifischer Ligand ist und damit das Vorhandensein von funktionsfähigem LRP1 belegt werden kann.

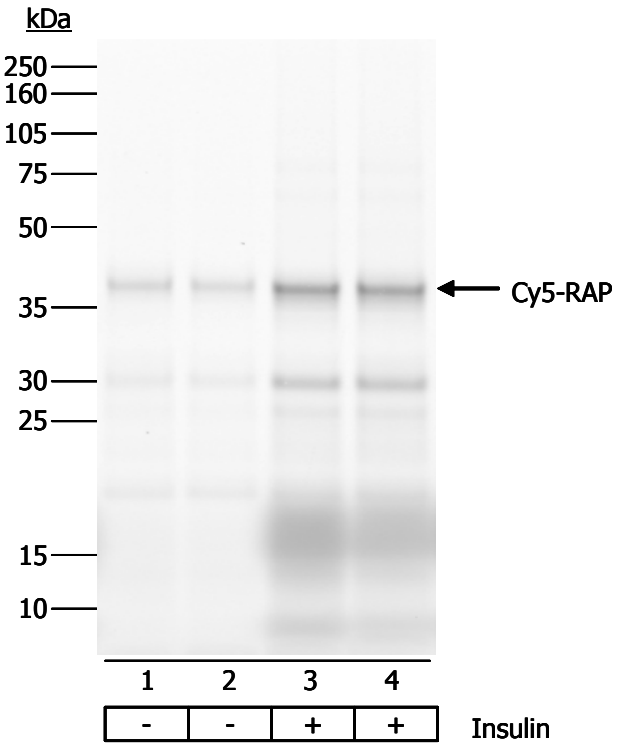


**Abb. 11a: Cy5-RAP-Aufnahme in FAO-Zellen.** Die Abbildung zeigt die RAP-Aufnahme in FAO-Zellen nach 60 minütiger Inkubation mit 5µg/ml Cy5-RAP ohne (1, 2) und mit (3, 4) Zusatz von 100 nM Insulin. Die Fluoreszenzdetektion zeigt aufgenommenes RAP bei 39 kDa.

Eine basale Aufnahme von RAP ist vorhanden (1, 2), sie kann durch Insulin stark gesteigert werden (3, 4). Dies unterstützt, da für RAP eine LRP1-Spezifität beschrieben wurde, die Aussage der in Abb. 10b gezeigten Translokation von LRP1 durch Insulin. Zur Quantifizierung der in Abb. 11a beispielhaft dargestellten RAP-Banden wurden zehn unabhängige Experimente ausgewertet (Abb. 11b).

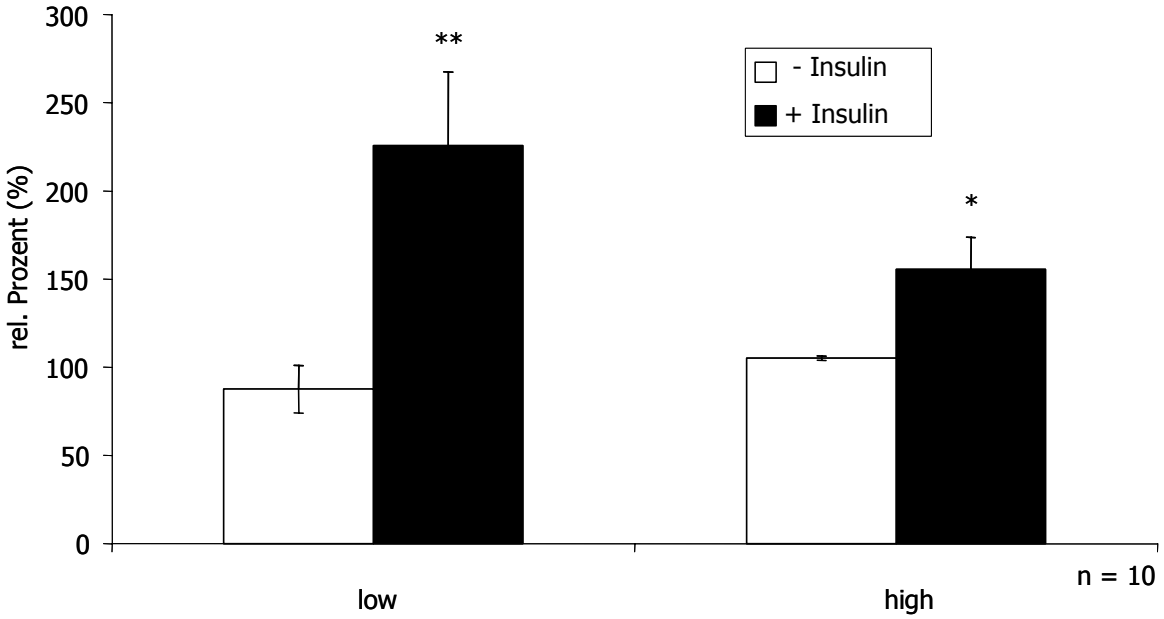


**Abb. 11b: Quantifizierung der RAP-Aufnahme in FAO-Zellen.** Dargestellt ist die RAP-Aufnahme in FAO-Zellen, die in low- bzw. high-Glukose-Nährmedium kultiviert wurden, nach 60 minütiger Inkubation mit 5 µg/ml Cy5-RAP ohne (weiß) und mit (schwarz) Zusatz von 100 nM Insulin. Nach Abnahme der Zellen in Zelllysispuffer, SDS-PAGE und Detektion von Cy5 konnten die u.a. in Abb. 11a gezeigten Banden mit Hilfe des Programms Typhoon Scanner Control v5.0 quantifiziert werden. Die Ordinate zeigt die RAP-Aufnahme in relativer Prozentangabe.
*Signifikanter Unterschied der gemessenen Werte zur Kontrolle, $p<0,05$. **Signifikanter Unterschied der gemessenen Werte zur Kontrolle, $p<0,01$.

Durch Zugabe von Insulin zum Inkubationsmedium sind in FAO-Zellen unter niedrigen Glukose-, weniger stark ausgeprägt auch unter hohen Glukose-Bedingungen, signifikante Steigerungen der RAP-Aufnahme zu beobachten.

Im Folgenden soll die Aufnahme von ApoE über LRP1 in FAO-Zellen untersucht werden. Verglichen wird hierbei die Aufnahme der Isoformen ApoE2 und ApoE3. Während ApoE3 sowohl an den LDLR als auch an LRP1 bindet, kann ApoE2 in der Leber ausschließlich über LRP1 internalisiert werden. Die Untersuchung der beiden Isoformen erlaubt somit den relativen Anteil von LDLR und LRP1 an der Aufnahme der Lipoproteine zu ermitteln (Weisgraber, 1990; Bohnet et al., 1996).

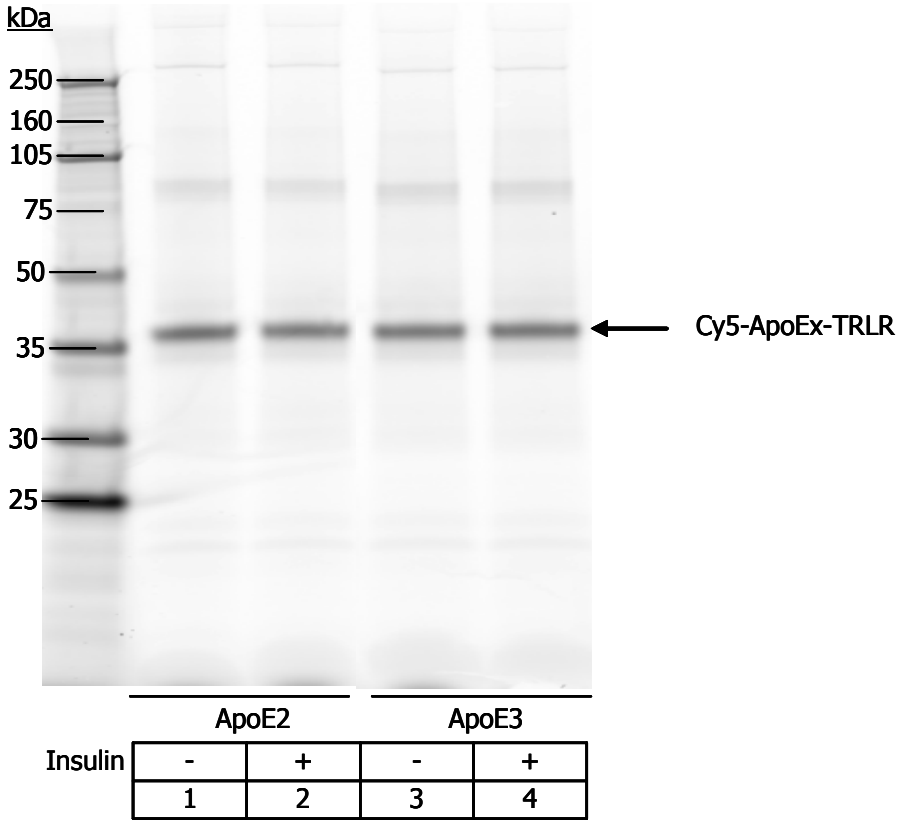


**Abb. 12a: Cy5-ApoEx-TRLR-Aufnahme in FAO-Zellen.** Die Abbildung zeigt die Aufnahme von Cy5-ApoE2-TRLR (1, 2) und Cy5-ApoE3-TRLR (3, 4) in insulinsensitive FAO-Zellen in Abhängigkeit von Insulin. Nach 60 minütiger Inkubation mit 10 µg/ml Cy5-ApoEx-TRLR, ohne (1, 3) und mit (2, 4) Zusatz von 100 nM Insulin folgte eine SDS-PAGE mit einem 4-12%igem Gradientengel und anschließender Detektion von Cy5.

Der zu erwartende Unterschied zwischen ApoE2- und ApoE3-Aufnahme (Schneider et al., 1981; Mahley und Rall, 2000) wurde in diesem Zellmodell nicht detektiert. Auch die Zugabe von Insulin führte zu keiner veränderten Aufnahme. Ein möglicher Grund könnte das bereits endogen vorhandene ApoE der verwendeten TRL sein. Um sicher zu gehen, dass kein endogenes ApoE die Aufnahme und anschließende Analyse derselben stört, wurden die Experimente noch einmal mit trypsinierten TRL-Liganden wiederholt. Mit diesem Ansatz wurde somit ausschließlich die Cy5-ApoE2- bzw. Cy5-ApoE3-vermittelte Aufnahme untersucht.

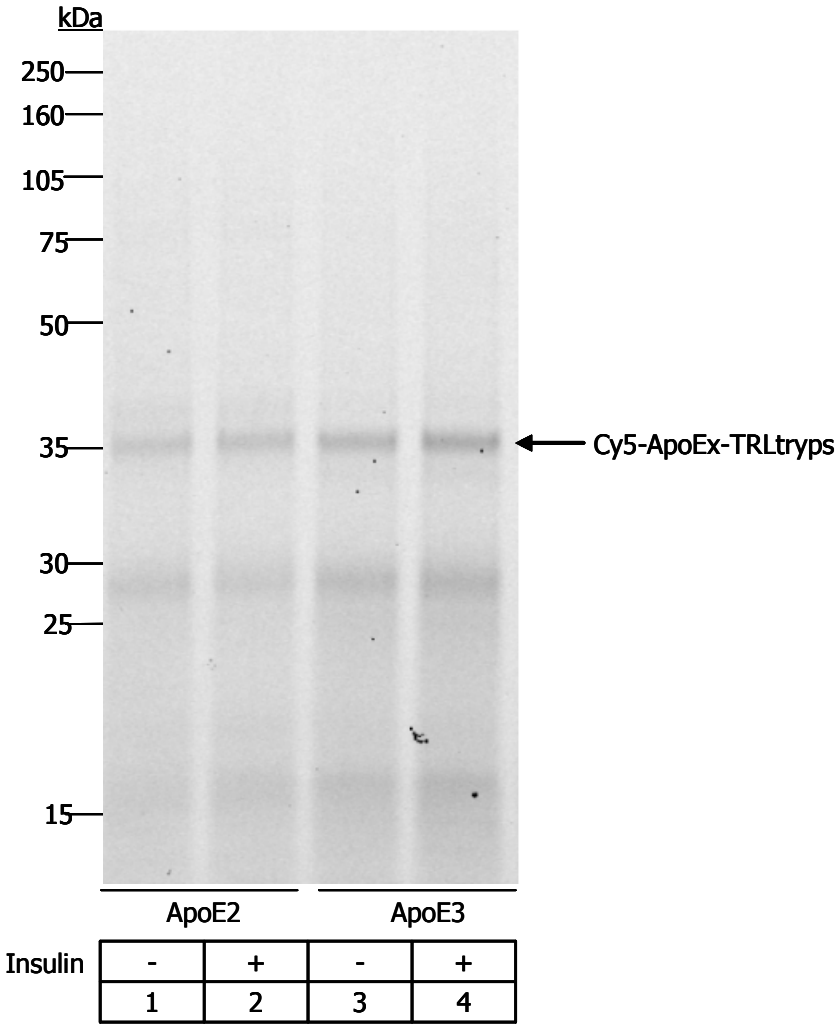


**Abb. 12b: Cy5-ApoEx-TRLtryps-Aufnahme in FAO-Zellen.** In dieser Abbildung wird die ApoE-Aufnahme in insulinsensitive FAO-Zellen gezeigt. Nach 60 minütiger Inkubation mit 5 µg/ml Cy5-ApoE2-TRLtryps bzw. Cy5-ApoE3-TRLtryps, ohne (1, 3) und mit (2, 4) Zusatz von 100 nM Insulin folgte eine SDS-PAGE mit einem 4-12%igem Gradientengel und anschließender, hier dargestellter, Detektion von Cy5.

Die Quantifizierung der Banden aus Abb. 12b ergibt bei Insulin-Zugabe eine Steigerung der ApoE2-Aufnahme um 37%. Die ApoE3-Aufnahme wird mit Zusatz von Insulin, im Vergleich zur Aufnahme ohne Insulin, um über 50% gesteigert. Die basale Aufnahme von ApoE3 ist annähernd doppelt so groß wie die basale Aufnahme von ApoE2. Durch Zugabe von Insulin erreicht die ApoE3-Aufnahme etwa das Dreifache der basalen ApoE2-Aufnahme. Bei Zugabe von Insulin zu beiden Isoform-Ansätzen wird ApoE3 noch immer doppelt so gut aufgenommen wie ApoE2.

Die in FAO-Zellen durchgeführten Versuche zur RAP- und ApoE-Aufnahme wurden in LRP1-EGFP-überexprimierenden HEK293-Zellen wiederholt. Zunächst wird wieder RAP als

Ligand eingesetzt, da es durch seine LRP1-Spezifität eine Kontrolle der LRP1-EGFP-Transfektion und -Funktionalität darstellt und erst dann ein Vergleich der Aufnahme in Kontrollzellen und LRP1-überexprimierenden Zellen erstellt werden kann (Abb. 13).

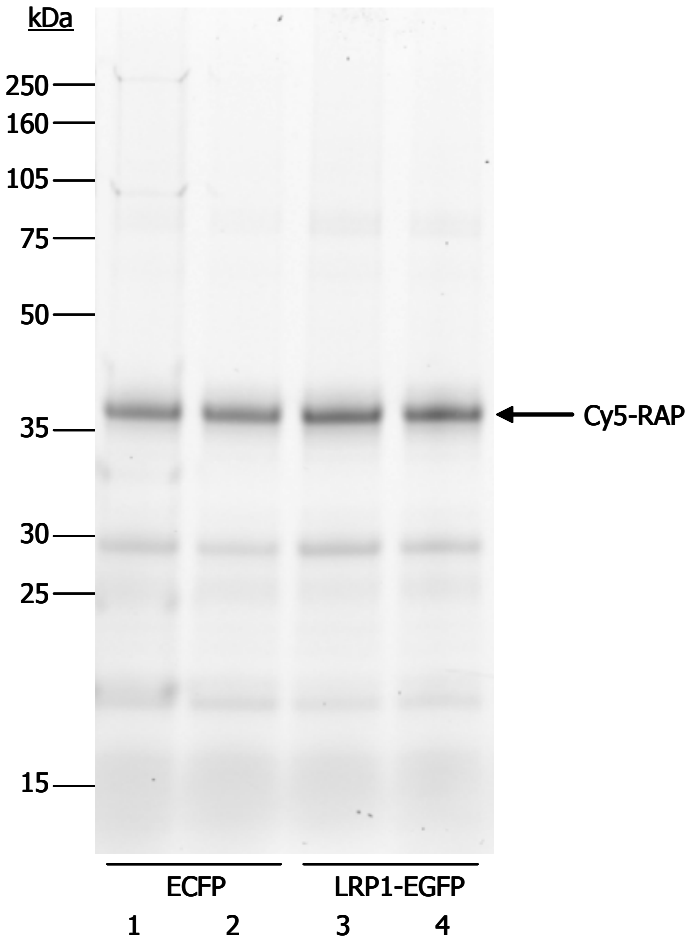


**Abb. 13: Cy5-RAP-Aufnahme in HEK293-Zellen.** Die Abbildung zeigt die Aufnahme von 5 µg/ml Cy5-RAP in mit ECFP- und LRP1-EGFP-Plasmid-DNA transfizierten HEK293-Zellen nach 20 minütiger Inkubation.

Zu erkennen ist eine gesteigerte RAP-Aufnahme der LRP1-überexprimierenden Zellen. Die Quantifizierung ergibt eine Steigerung um 38%. Die hier nicht dargestellte Aufnahme bei Insulin-Zugabe veränderte das Ergebnis nicht. Letzteres ist vermutlich durch die geringe Insulin-Sensitivität der HEK293-Zellen zu erklären (Abb. 9b).

Im Anschluß wurde die ApoE2- und ApoE3-Aufnahme, in Abhängigkeit von LRP1-EGFP-Expression und Insulin, in transfizierten HEK293-Zellen untersucht (Abb. 14a).

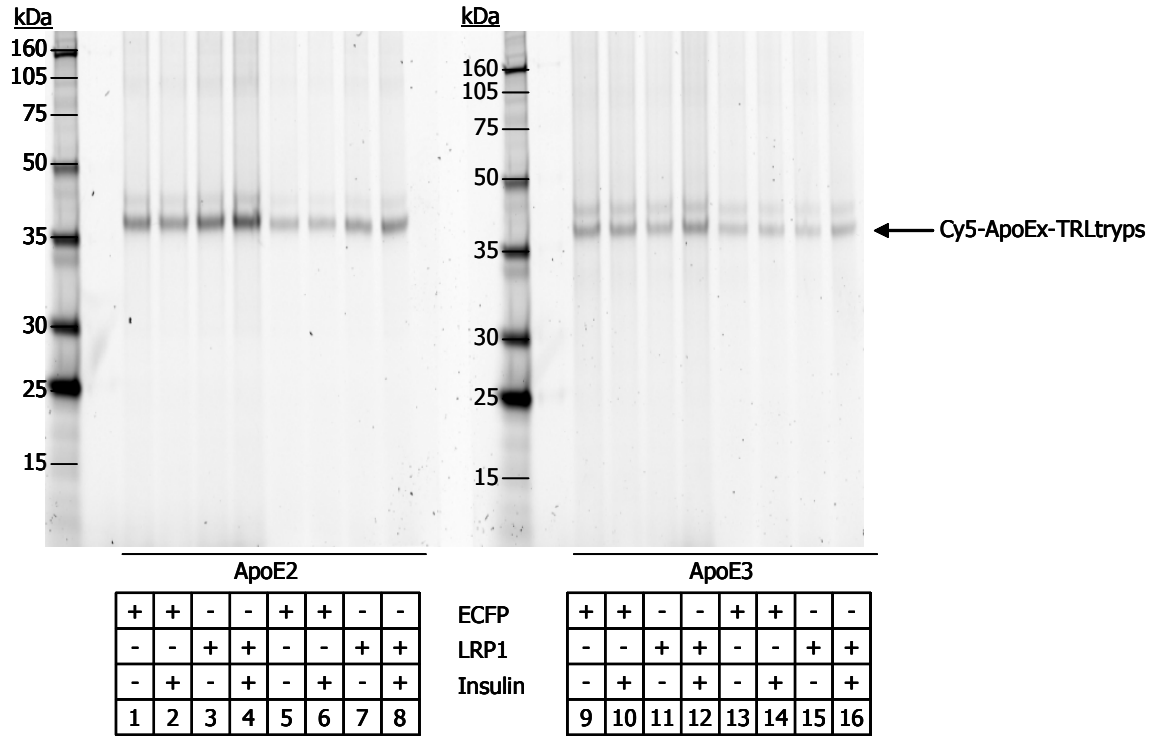


**Abb. 14a: Cy5-ApoEx-TRLtryps-Aufnahme in HEK293-Zellen.** Dargestellt ist die ApoE2- und ApoE3-Aufnahme in mit ECFP- oder LRP1-EGFP-Plasmid-DNA transfizierten HEK293-Zellen nach 60 minütiger Inkubation mit Cy5-ApoE2-TRLtryps, Cy5-ApoE3-TRLtryps und je nach Ansatz mit Zusatz von 100 nM Insulin in 6-Well-Platten. Anschließend wurden die Zellen mit 2% SDS Puffer abgenommen, sonifiziert und jeweils 10 µg Protein auf ein 4-12%iges Gradientengel aufgetragen. Bei 1-4 und 9-12 wurde ein Volumen von 25 µl, bei 5-8 und 13-16 ein Volumen von 10 µl aufgetragen.

ApoE2 wird durch LRP1-Überexpression deutlich gesteigert aufgenommen (3, 4; 7, 8). Bei diesen Zellen ist eine zusätzliche Aufnahmesteigerung durch Insulin-Zugabe zu erkennen. Die Quantifizierung ergibt durch LRP1 eine Erhöhung der Aufnahme um 42% im Vergleich zur Kontrolle (1, 5). Eine weitere Steigerung um 42% ergibt sich durch Zugabe von Insulin (4, 8). Bei ApoE3-Inkubation läßt sich durch LRP1-Überexpression keine Steigerung der Aufnahme erkennen (11, 15), sie ist sogar verglichen mit der Kontrolle (9, 13) um etwa 37% verringert. Durch Insulin-Zugabe kann die ApoE3-Aufnahme in LRP1-überexprimierenden Zellen jedoch um 80% gesteigert werden (12, 16).

Die Aufnahmen von ApoE2 und ApoE3 können hier quantitativ nicht verglichen werden, da ihre ApoE-Detektionen unabhängig voneinander durchgeführt und unterschiedliche Einstellungen des Scanners zur Erstellung der Abbildungen vorgenommen worden sind.

Zur Verifizierung der in Abb. 14a dargestellten Ergebnisse wurden unter gleichen Bedingungen weitere Versuche durchgeführt.

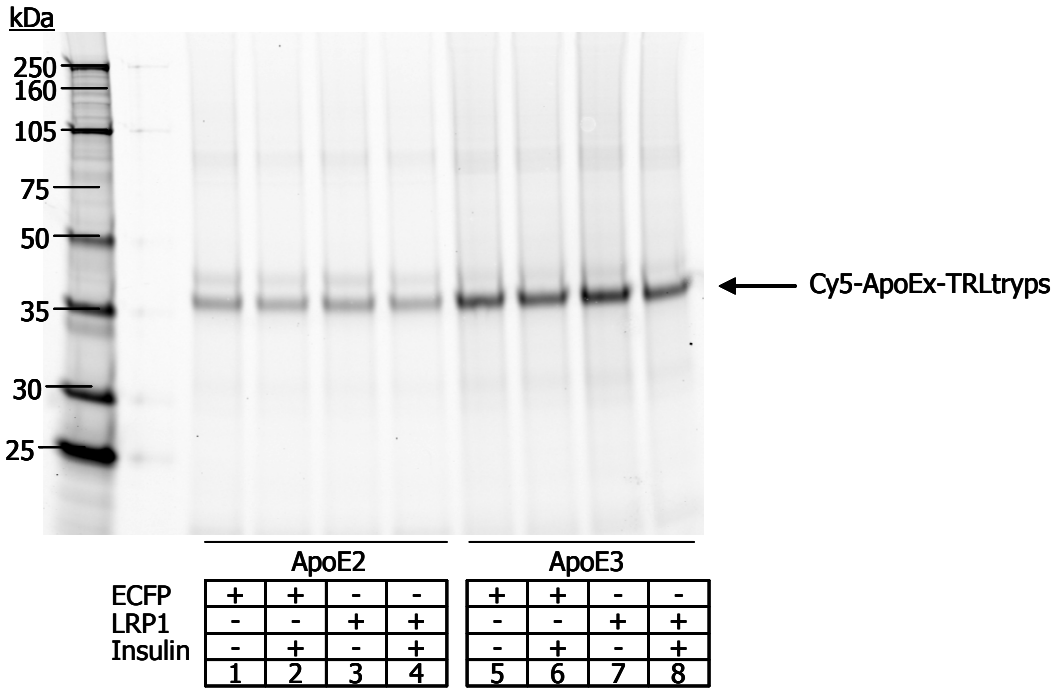


**Abb. 14b: Wiederholung der Cy5-ApoEx-TRLtryps-Aufnahme in HEK293-Zellen.** Die Abbildung zeigt die Aufnahme von ApoE2 und ApoE3 in mit ECFP- oder LRP1-EGFP-Plasmid-DNA transfizierten HEK293-Zellen nach 60 minütiger Inkubation mit Cy5-ApoE2-TRLtryps, Cy5-ApoE3-TRLtryps und je nach Ansatz mit Zusatz von 100 nM Insulin in 6-Well-Platten. Es folgte eine SDS-PAGE mit 25 µl pro Well und eine sich daran anschließende Detektion von Cy5.

Das in Abb. 14a dargestellte Ergebnis konnte in wiederholten Experimenten nicht erneut gezeigt werden. Aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit ist daher keine abschließende Aussage über die insulinvermittelte Aufnahme von ApoE über LRP1 möglich.

Die von den 34 kDa des ApoE leicht abweichende Größe von Cy5-ApoEx-TRL in dieser und vorherigen Abbildungen liegt an der unterschiedlichen Labeleffizienz der Liganden.

## 4.4 LRP1-abhängiges ApoE-Recycling

HDL im extrazellulären Medium vermittelt ApoE-Recycling (Heeren et al., 1999; von Eckardstein et al., 2001; Heeren et al., 2003). Das HDL-induzierte Recycling der ApoE-Isoformen wurde in dieser Arbeit in Abhängigkeit von Insulin und LRP1 untersucht.

Zunächst wurde dieser Versuch in FAO-Zellen und nur mit der „Normalform" ApoE3 durchgeführt (Abb. 15).

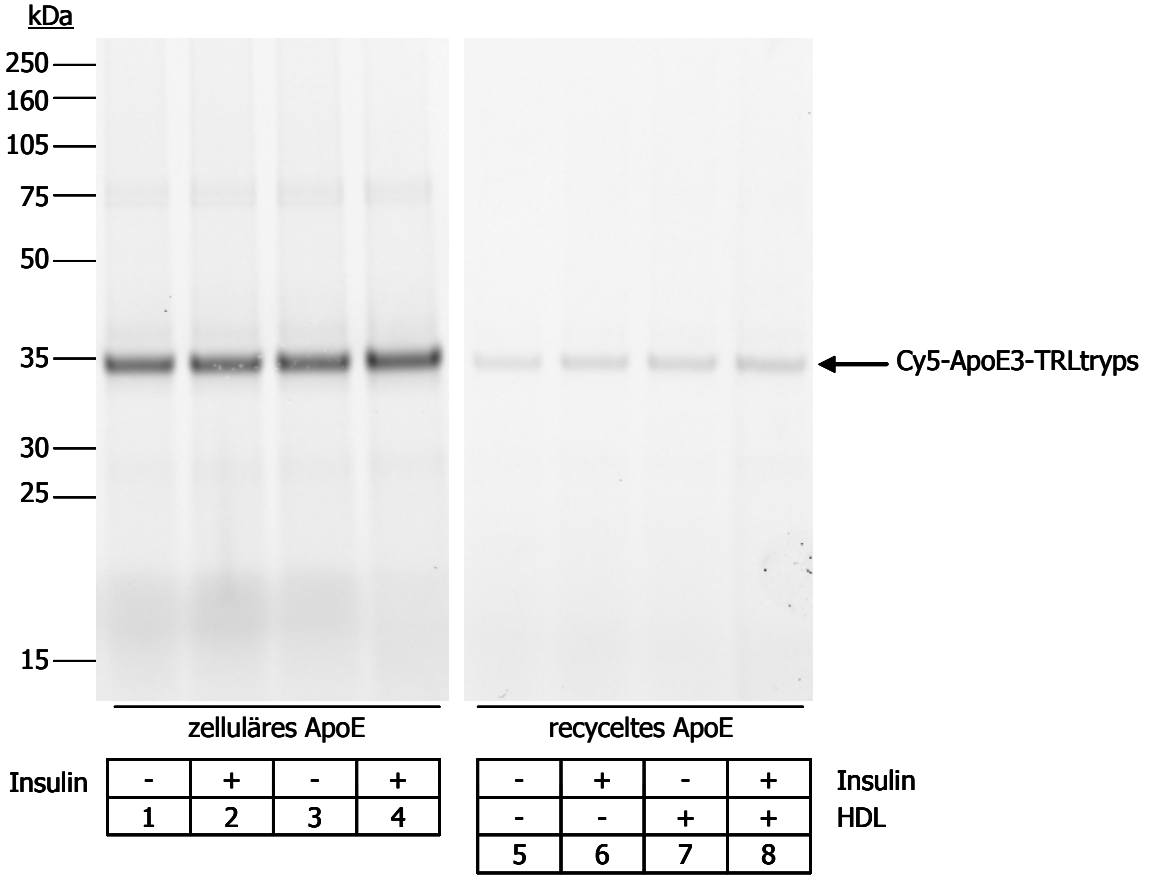


**Abb. 15: Cy5-ApoE3-TRLtryps-Aufnahme und -Recycling in Abhängigkeit von HDL und Insulin – FAO-Zellen.** Dargestellt ist das ApoE3-Recycling aus insulinsensitiven FAO-Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit 10 µg/ml Cy5-ApoE3-TRLtryps und je nach Ansatz mit oder ohne Zusatz von 100 nM Insulin. Auf mehrere Waschschritte mit PBS, zum Entfernen nicht in die Zelle aufgenommener Liganden, folgte die 30 minütige Inkubation mit dem wahlweise 100 nM Insulin und/oder 20 µg/ml ApoE-freie HDL enthaltenden Chase-Medium. Die im Überstand enthaltene ApoE3-Menge, als Ausdruck des ApoE3-Recyclings, wurde nach SDS-PAGE mit Hilfe des Fluoreszenzscanners quantifiziert (5-8). Die Zellen wurden lysiert und das intrazelluläre ApoE3 ebenfalls nach SDS-PAGE mittels Detektion von Cy5 sichtbar gemacht (1-4).

Betrachtet man die ApoE3-Aufnahme der Zellproben (1-4), lassen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen Kontrolle und Insulin-abhängiger Aufnahme erkennen. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die ApoE3-Aufnahme nach dem Recycling-Prozess gemessen wurde und damit nicht mehr die volle Konzentration der aufgenommenen Liganden in den Zellproben vorhanden war. Die Quantifizierung der Chase-Proben zeigt jedoch folgendes: Im Vergleich zur Kontrolle (5) führt die Zugabe von Insulin zu einer Steigerung des ApoE3-Recyclings um etwa 44%, die alleinige Zugabe von HDL führt zu 57% mehr Recycling. Bei gleichzeitiger Zugabe von Insulin und HDL zum Chase-Medium steigert sich das Recycling um mehr als 100%. Sowohl HDL als auch Insulin erhöhen die Recycling-Rate von ApoE3 wesentlich.

Die hier nicht aufgeführten ApoE-Aufnahme-Ergebnisse, der unter gleichen Bedingungen durchgeführten Experimente in LRP1-überexprimierenden HEK293-Zellen, stellten sich nicht anders als die in Abb. 15 gezeigten dar. Weder Insulin noch LRP1-EGFP-Expression hat die Aufnahme in diese Zellen, nach Durchführung der Pulse-Chase-Experimente, beeinflusst. Das Recycling wies jedoch LRP1-abhängige Unterschiede auf. Die Abbildung 16a zeigt das ApoE-Recycling in LRP1-überexprimierenden HEK293-Zellen. Das Recycling wurde von allen drei Isoformen untersucht, da es Hinweise gibt, dass ein Isoform-spezifisches Recycling vorliegen könnte (Heeren et al., 2004).

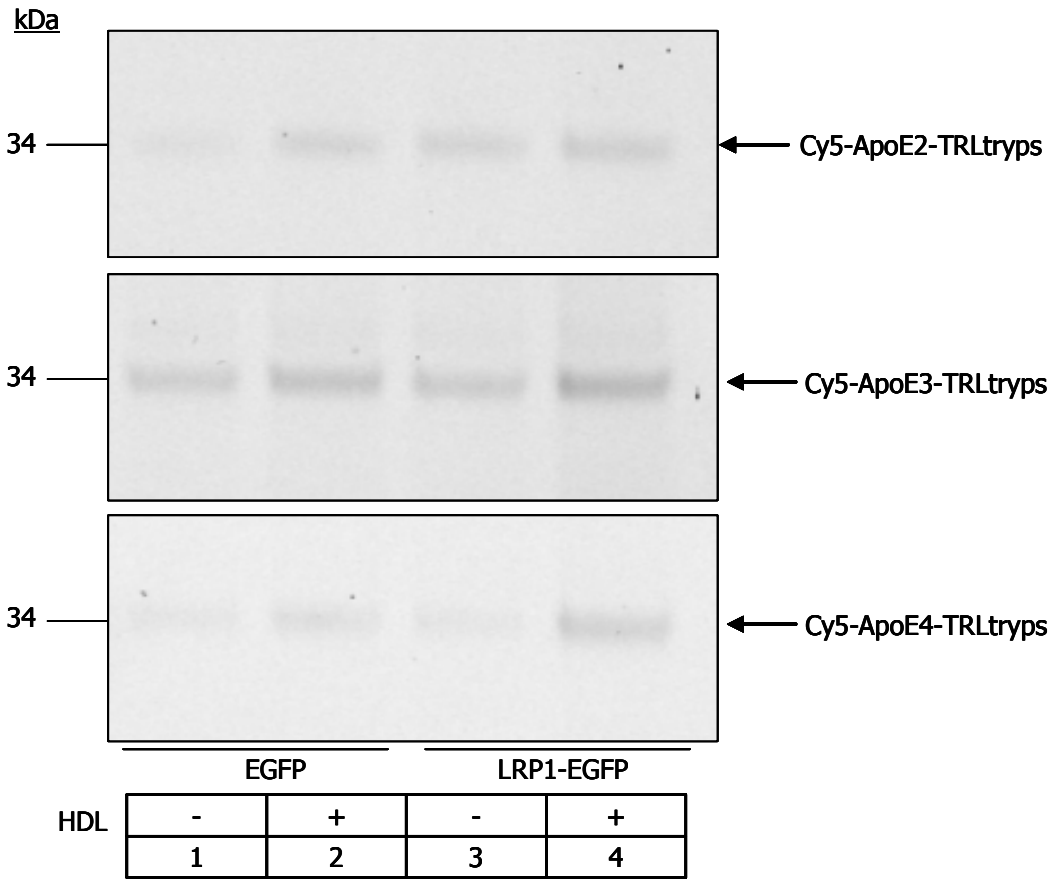


**Abb. 16a: Recycling der ApoE-Isoformen in Abhängigkeit von HDL – HEK293-Zellen.** Dargestellt ist das HDL-abhängige Recycling der ApoE-Isoformen von HEK293-Zellen, die mit ECFP- bzw. LRP1-EGFP-Plasmid-DNA transfiziert wurden. Nach 30 minütiger Inkubation mit 10 µg/ml Cy5-ApoE2-TRLtryps, Cy5-ApoE3-TRLtryps oder Cy5-ApoE4-TRLtryps und mehreren Waschschritten mit PBS, zum Entfernen nicht in die Zelle aufgenommener Liganden, folgte die 30 minütige Inkubation ohne (1, 3) oder mit (2, 4) 20 µg/ml HDL. Die im Überstand enthaltene ApoE-Menge, als Ausdruck des ApoE-Recyclings, konnte nach SDS-PAGE mit Hilfe des Fluoreszenzscanners quantifiziert werden.

Das folgende Diagramm in Abb. 16b stellt die Analyse des in Abb. 16a gezeigten ApoE-Recyclings dar. Für die Quantifizierung des ApoE2- und ApoE4-Recyclings wurden Werte

aus drei Experimenten herangezogen, ApoE3-Recycling wurde in fünf Experimenten durchgeführt, da die Standardabweichung hierbei vergleichsweise hoch war.

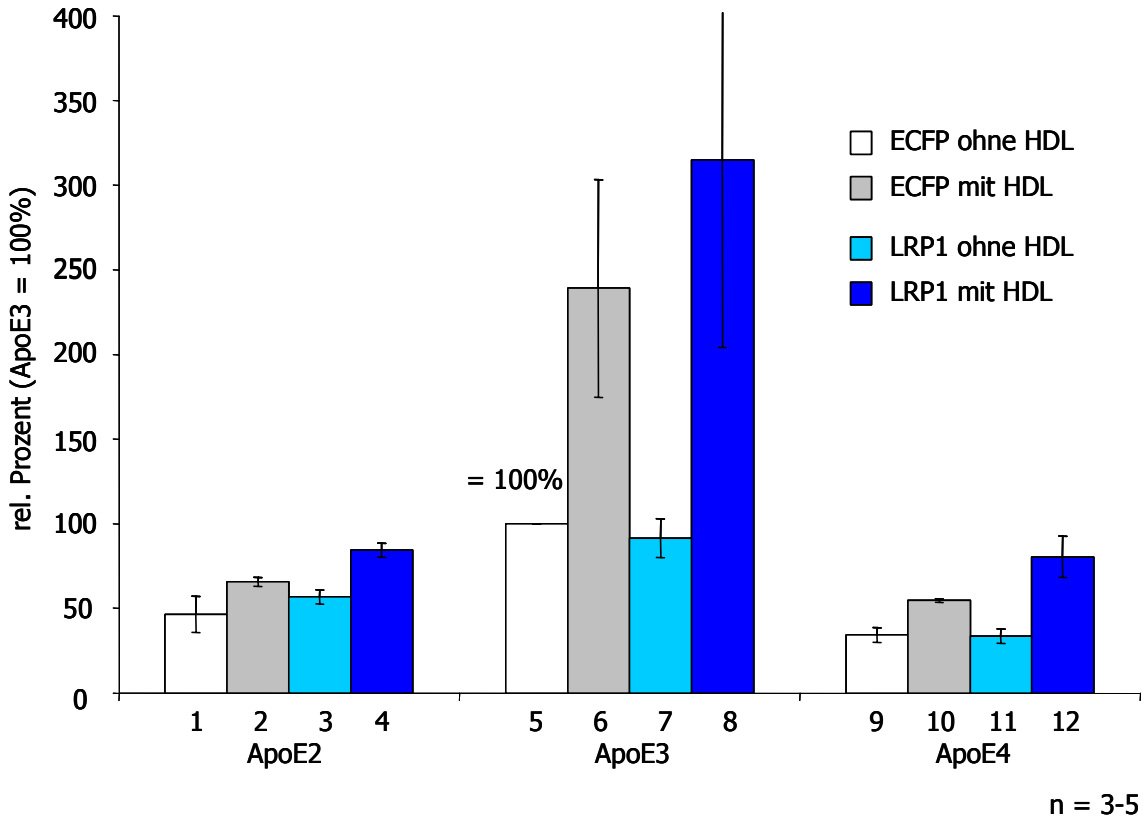


**Abb. 16b: Quantifizierung des Recyclings der ApoE-Isoformen in Abhängigkeit von HDL – HEK293-Zellen.** Dargestellt ist die Quantifizierung der in Abb. 16a gezeigten und beschriebenen Experimente. Die Ordinate zeigt die relativen Prozentangaben, wahlweise wurde das basale ApoE3-Recycling (5) mit 100% gleichgesetzt, so können auch die relativen Verhältnisse zwischen den ApoE-Isoformen betrachtet werden.

Das basale Recycling von ApoE2 bei LRP1-Überexpression (3) liegt nur leicht über dem basalen ApoE2-Recycling der Kontrolle (1), ist aber fast ebenso hoch wie das HDL-induzierte Recycling der Kontrollzellen. HDL-Zusatz im Chase-Medium bewirkt eine Zunahme des Recyclings in mit ECFP transfizierten und eine noch stärkere in LRP1-überexprimierenden Zellen. LRP1 scheint ohne HDL keinen Einfluß auf das ApoE3-Recycling zu haben (5, 7). HDL bewirkt in den Kontrollzellen eine Steigerung des Recyclings um mehr als das Doppelte (5, 6). Unter den Bedingungen der LRP1-Überexpression vermittelt HDL sogar eine Recyclingsteigerung um etwa das Dreifache (7, 8) und zeigt auch eine im Vergleich zum HDL-induzierten Recycling der Kontrollzellen weit

höhere Recycling-Rate (6, 8). Basal wird das ApoE4-Recycling durch LRP1 nicht beeinflusst (9, 11), dieses läßt sich jedoch durch HDL um mehr als 100% steigern (11, 12). Vergleicht man das Recycling der Isoformen untereinander, erkennt man, dass ApoE3 weit aus mehr recycelt wird als ApoE2 und ApoE4. Bereits basal wird es stärker recycelt als ApoE2 und ApoE4 in LRP1-überexprimierenden Zellen mit HDL-Induktion.

Zusammenfassend konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass LRP1-Expression direkt das HDL-induzierte Recycling beeinflusst.

# 5 Diskussion

## 5.1 Bedeutung von LRP1 für die Aufnahme postprandialer Lipoproteine

Die zelluläre Aufnahme postprandialer Lipoproteine in die Leber erfolgt, nach LPL-abhängiger Lipolyse und HDL-vermittelter ApoE-Anreicherung, über die membranständigen Lipoprotein-Rezeptoren LDLR und LDLR-related Protein 1 (LRP1) (Beisiegel, 1995; Rohlmann et al., 1998).

Um die Funktion von LRP1 bei unterschiedlichen zellulären Prozessen besser untersuchen und darstellen zu können, setzten wir in unseren Versuchen das von A. Laatsch zur Verfügung gestellte fluoreszierende Fusionsprotein LRP1-EGFP (Abb. 5) ein (Laatsch et al., 2004). Mittels Transfektion konnten wir LRP1-EGFP in HEK293-Zellen überexprimieren. Der Transfektionserfolg wird im Western Blot (Abb. 7b und 7c) sowie in der konfokalen Mikroskopie (Abb. 8) gezeigt. Es konnte damit das Vorliegen der prozessierten Formen von LRP1 nachgewiesen werden. Auf diese Weise konnten wir die Voraussetzung für unsere Aufnahme-Experimente in LRP1-überexprimierenden Zellen schaffen, denn Willnow et al. beschrieben eine verminderte LRP1-vermittelte Endozytoserate bei vorwiegendem Vorliegen der unprozessierten Form (Willnow et al., 1996). Ko et al. hingegen zeigten bei Untersuchungen des Hühner-Homologs, dass auch nicht durch die Protease Furin prozessiertes LRP1 endozytotisch aktiv ist (Ko et al., 1998).

Wir setzten RAP, ein Chaperon für LRP1 (Willnow et al., 1995), zum Nachweis der Funktionalität von LRP1 in unseren Versuchen ein. Erwartungsgemäß führte die Überexpression von LRP1-EGFP in HEK293-Zellen zu einer erheblichen Erhöhung der zellulären RAP-Aufnahme (Abb. 13).

In Abb. 10a wird die LRP1-EGFP-Überexpression in HIR-11-Zellen gezeigt. LRP1-EGFP ist in perinukleären Vesikeln angeordnet. Nach Insulin-Inkubation konnten wir eine Ansammlung des fluoreszierenden LRP1-EGFP an der Plasmamembran beobachten (Abb. 10b). Dies ist vereinbar mit der von Corvera et al. beschriebenen Umverteilung von LRP1 an die Zelloberfläche unter Insulin-Stimulation (Corvera et al., 1989). Es gab zudem weitere Studien, die für LRP1, ebenso wie für den TfR und GLUT-4, eine verstärkte Oberflächenpräsentation unter Insulin-Stimulation zeigten (Ko et al., 2001). Über die Translokation von LRP1 hinaus konnte von Zhang et al. dargestellt werden, dass Insulin dieses auch in spezielle Membranbereiche leiten kann. Es kommt zu einer Anreicherung von LRP1 in sogenannten Caveolae (Zhang et al., 2004). In Adipozyten finden sich in

diesen Caveolae noch viele weitere Signalrezeptoren, darunter auch der Insulin-Rezeptor (Cohen et al., 2003) und der translozierte Glukosetransporter GLUT-4 (Scherer et al., 1994; Cohen et al., 2003). Parallelen des intrazelluären Verhaltens von LRP1 und GLUT-4 unter Insulin-Stimulation sind klar erkennbar, und es ist anzunehmen, dass LRP1 im Lipidstoffwechsel eine ähnlich wichtige Rolle spielt wie GLUT-4 im Glukosestoffwechsel (Shepherd und Kahn, 1999; Bryant et al., 2002).

In Adipozyten konnte, bei Zusatz von Insulin, eine vermehrte TRL-Aufnahme über LRP1 gezeigt werden (Descamps et al., 1993). Fettgewebe spielt jedoch quantitativ für die Clearance postprandialer TRL nur eine untergeordnete Rolle. Hepatische FAO-Zellen aus der Ratte verfügen über eine gute Insulin-Sensitivität (Abb. 9a). Anhand dieser Zellen konnten wir zeigen, dass die Aufnahme des LRP1-spezifischen Liganden RAP durch Insulin gesteigert werden konnte (Abb. 11a). Bei der Aufnahme der ApoE-Isoformen konnte unter gleichen Versuchsbedingungen erwartungsgemäß eine quantitativ bessere Aufnahme von ApoE3, im Vergleich zu ApoE2, beobachtet werden (Abb. 12b). Allerdings war die ApoE2-Aufnahme durch Insulin-Inkubation noch steigerbar. Wenn wir von einer LRP1-Kompensation der reduzierten ApoE2-Aufnahme über den LDLR ausgehen (siehe unten), könnten die soeben genannten Ergebnisse für eine Insulin-abhängige Translokation von LRP1 in Leberzellen sprechen. Abschließend wäre es jedoch notwendig zu untersuchen, ob die LRP1-vermittelte TRL-Aufnahme auch in humanen Leberzellen durch Insulin reguliert wird. Eine hierfür geeignete Zelllinie war uns allerdings nicht bekannt. Die in dieser Arbeit größtenteils verwendete Zelllinie HEK293 hat den großen Vorteil, dass sie, im Gegensatz zu FAO-Zellen, gut für eine DNA-Transfektion genutzt werden kann (Thomas und Smart, 2005). So konnten wir in diesen Zellen mittels Transfektion eine LRP1-EGFP-Überexpression herbeiführen und auf diese Weise unsere LRP1-bezogenen Aufnahme-Experimente durchführen. Nachteilig ist jedoch, dass HEK293-Zellen die für uns wichtige Insulin-Sensitivität nicht aufweisen (Abb. 9b). So war die RAP-Aufnahme in diese Zellen nicht durch Insulin zu steigern (Abb. 13). Da zu Beginn der Arbeit jedoch keine geeignetere Zelllinie zur Verfügung stand, wurde auf diese zurückgegriffen. Die weitaus insulinsensitiveren HIR-11-Zellen (Abb. 9c) konnten erst gegen Ende der Arbeit eingesetzt werden. Möglicherweise hätten wir bei Durchführung der Experimente mit HIR-11-Zellen aussagekräftigere Ergebnisse bezüglich der Insulin-Abhängigkeit erhalten.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der LDLR als auch LRP1 wesentlich an der Clearance von TRL beteiligt sind (Willnow et al., 1994; Rohlmann et al., 1998). Neben der mit TRL assoziierten LPL (Beisiegel et al., 1991; Heeren et al., 2002), spielt die HDL-

vermittelte ApoE-Anreicherung der TRL eine bedeutende Rolle in der effektiven Clearance der TRL in der Leber. ApoE bindet sowohl an den LDLR als auch an LRP1 und vermittelt auf diese Weise die zelluläre Aufnahme (Beisiegel et al., 1989).

Über die Bindung an den LDLR werden die ApoE-Isoformen mit unterschiedlicher Effizienz in die Zelle aufgenommen. ApoE3 und ApoE4 binden mit ähnlich starker Affinität an den LDLR (Weisgraber, 1990; Bohnet et al., 1996; Heeren et al., 2004), wohingegen die Bindungsaffinität von ApoE2 vermindert ist (Schneider et al., 1981; Mamotte et al., 1999). Letzteres führt zu einer Akkumulation von TRL im Plasma und trägt auf diese Weise zur Assoziation des ApoE2-Allels mit der familiären Hyperlipoproteinämie Typ III bei (Mahley, 1988). Zudem kommt es durch erhöhte Cholesterin-Plasmaspiegel zum erhöhten Risiko der Atheroskleroseentwicklung. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nur etwa 5% der Individuen mit einem ApoE2/E2-Genotyp eine Hyperlipoproteinämie entwickeln (Mahley et al., 1999). Die Kompensation der reduzierten LDLR-vermittelten ApoE2-TRL-Internalisierung verläuft vermutlich über die hohe Expression von LRP1 in der Leber. Ruiz et al. beschrieben eine vergleichbare Bindungsaffinität von ApoE2 und ApoE3 gegenüber LRP1 (Ruiz et al., 2005). Wir führten Aufnahme-Experimente der ApoE-Isoformen in LRP1-EGFP-überexprimierenden HEK293-Zellen durch. Das in Abb. 14a dargestellte Ergebnis wäre mit der Aussage von Ruiz et al. zu vereinen. Wir konnten zeigen, dass die LRP1-EGFP-Überexpression zu einer deutlichen Steigerung der ApoE2-Aufnahme führt, dies würde für die Kompensation der reduzierten LDLR-vermittelten ApoE2-TRL-Internalisierung durch LRP1 sprechen. In wiederholten Experimenten erhielten wir jedoch keine eindeutigen Ergebnisse, so dass aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit keine abschließende Aussage getroffen werden kann. Im Fall von ApoE3 konnte LRP1 keine Aufnahmesteigerung bewirken. Dies könnte mit der möglichen Einflußnahme des LDLR auf die ApoE3-Aufnahme begründet werden. Abb. 7d weist den LDLR in unseren LRP1-EGFP-transfizierten HEK293-Zellen nach. Die Aufnahme von ApoE3 ist bereits durch den LDLR hocheffizient und vermutlich schon maximal (Mahley und Rall, 2000).
Da der ApoE-Gehalt der eingesetzten ApoEx-TRL vergleichbar war (Abb. 4a), sind die Unterschiede der Isoform-Aufnahme nicht auf eine unterschiedliche Beladung der TRL zurückzuführen. Mitwirken von endogenem ApoE, als mögliche Fehlerquelle in unseren Versuchen, konnten wir durch Trypsinierung der Liganden verhindern (Abb. 4b und 4c).

Durch Insulin konnte die RAP-Aufnahme in FAO-Zellen signifikant gesteigert werden (Abb. 11a und 11b). Wir konnten zeigen, dass es zwar sowohl bei Zellen, die in Glukose-armer, als auch bei solchen, die in Glukose-reicher Nährlösung gewachsen sind, unter Insulin-

Zufuhr zu einer signifikanten Erhöhung der RAP-Aufnahme kam. Die kohlenhydratreich ernährten Zellen zeigten jedoch eine im Vergleich geringere Aufnahmesteigerung. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die quantitative Aufnahme über LRP1 bei Zusatz von Insulin ernährungsabhängig ist. Möglicherweise könnte dieses Ergebnis ansatzweise eine diabetische Stoffwechsellage mit Insulin-Resistenz bei hochkalorischer Ernährung widerspiegeln, was zu einer verminderten Translokation LRP1-haltiger Vesikel an die Plasmamemban führt und auf diese Weise die Aufnahme über diesen Rezeptor reduziert.

In Abb. 14a ist zu erkennen, dass Insulin sowohl die Aufnahme von ApoE2- als auch von ApoE3-haltigen TRL deutlich steigert. Bemerkenswert ist, dass die Aufnahmesteigerung durch Insulin am prägnantesten in LRP1-EGFP-überexprimierenden Zellen ist, dies würde wieder für die insulininduzierte Translokation von LRP1 sprechen. Dieser Mechanismus trägt vermutlich dazu bei, dass die deutlich gesteigerte Aufnahme der postprandial in großer Anzahl vorhandenen, atherogenen TRL gewährleistet wird. Hinzu kommt, dass Insulin die LPL-Sekretion stimuliert (Spooner et al., 1979). Es kommt durch die enzymatische Aktivität der LPL zu einer schnelleren Umsetzung der TRL zu deren Remnants. Des Weiteren führt die Ligandenfunktion, der mit TRL assoziierten LPL, zu einer verstärkten LRP1-vermittelten TRL-Internalisierung (Beisiegel et al., 1991; Heeren et al., 2002; Verges et al., 2004).

Neben der bereits erwähnten vermehrten TRL-Aufnahme über LRP1 bei Zusatz von Insulin (Descamps et al., 1993), konnte in einer Studie mit insulinresistenten Ratten eine Assoziation von verzögerter TRL-Clearance mit der reduzierten hepatischen Expression von LDLR und LRP1 dargestellt werden (Field und Gibbons, 2000). Weiterhin wurde das Verhältnis von Plasma-Insulin-Spiegel zu TRL-Konzentration im Blut im Rahmen des Diabetes mellitus Typ II untersucht. Bei insulinresistenten Patienten konnte eine verzögerte TRL-Clearance beschrieben werden (Ai et al., 2001), in dieser Patientengruppe könnte dies ein zusätzlicher Risikofaktor für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung sein. Das Auftreten einer Hyperlipoproteinämie Typ III bei ApoE2-Allel-Individuen (Mahley et al., 1999) nimmt nach Manifestation eines Diabetes mellitus Typ II signifikant zu (Eto et al., 1989). Dabei, vermutlich auf die ausbleibende LRP1-Translokation zurückzuführen, akkumulieren die hoch atherogenen Partikel im Plasma. Um definitive Aussagen zu dem ursächlichen Mechanismus machen zu können, müsste jedoch die ausbleibende Translokation unter den Bedingungen eines Diabetes mellitus Typ II noch experimentell bestätigt werden.

## 5.2 Bedeutung von LRP1 für das ApoE-Recycling

Nach dem intravaskulären ApoE-Transfer von HDL zu TRL (Imaizumi et al., 1978; van't Hooft und Havel, 1981) und deren Internalisierung über den LDLR und LRP1 werden die Bestandteile der TRL, anders als bei den LDL (Brown und Goldstein, 1986), auf verschiedene Zellkompartimente verteilt (Heeren und Beisiegel, 2001). Während der Lipidanteil und ApoB lysosomal degradiert werden, gelangen ApoE, ApoC und LPL in Recycling-Endosomen wieder an die Plasmamembran, wo sie resezerniert werden können (Heeren et al., 1999; Rensen et al., 2000). Das ApoE-Recycling wird durch HDL induziert (Farkas et al., 2003; Heeren et al., 2003) und führt in der postprandialen Phase zu der ständigen Bereitstellung von ApoE, eine schnelle und effiziente TRL-Clearance wird hierdurch gewährleistet. Zudem ist ApoE-Recycling mit Cholesterinefflux assoziiert (Heeren et al., 2003) und trägt somit zur Aufrechterhaltung der zellulären Cholesterinhomöostase bei.

Es wurde eine Beteiligung der Lipoprotein-Rezeptoren LDLR und LRP1 an dem Prozess des ApoE-Recyclings beschrieben (Fazio et al., 1999; Rensen et al., 2000; Heeren et al., 2001; Heeren et al., 2003). Im Rahmen der Aufnahme der ApoE-Isoformen scheinen die beiden Rezeptoren wesentlich voneinander abzuweichen. So unterscheidet sich die effiziente Aufnahme der drei Isoformen über den LDLR stark (Bohnet et al., 1996), wohingegen die Bindungsaffinitäten der Isoformen an LRP1 vermutlich vergleichbar sind (Ruiz et al., 2005). Inwieweit jedoch die beiden Rezeptoren am Recycling beteiligt sind oder ob es doch, wie Farkas et al. es beschrieben, nahezu unabhängig von den Lipoprotein-Rezeptoren verläuft, ist wohl aufgrund der Beteiligung mehrerer, darauf Einfluß nehmender Wege, noch nicht im Detail geklärt (Farkas et al., 2004). Wir untersuchten zum einen, ob es Unterschiede im Recycling der einzelnen Isoformen gibt und zum anderen, ob und inwieweit LRP1 dieses Recycling möglicherweise beeinflusst.
Mit dem in Abb. 16a dargestellten Ergebnis und dessen Quantifizierung (Abb. 16b) konnten wir das durch HDL vermehrte ApoE-Recycling bestätigen. HDL-Zusatz zum Chase-Medium führte bei allen Isoformen bereits in den Kontrollzellen zu einer Erhöhung des ApoE-Recyclings. Bei den LRP1-EGFP-überexprimierenden Zellen kam es unter gleichen Versuchsbedingungen noch einmal zu einer deutlichen Zunahme. Darüber hinaus ließen sich in unseren Versuchen die quantitativen Unterschiede im Recycling der drei Isoformen darstellen. Die ausbleibende Steigerung des ApoE3-Recyclings in LRP1-EGFP-überexprimierenden Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, wäre möglicherweise damit zu erklären, dass ApoE3 bereits durch den LDLR maximal aufgenommen wird und auch ein

wirkungsvolles Recycling auf diese Weise ablaufen kann. Im Gegensatz zu ApoE4 bindet ApoE3 bevorzugt an HDL (Weisgraber, 1990; Dong et al., 1994; Saito et al., 2003). Möglicherweise assoziieren internalisierte ApoE3 vergleichsweise schneller mit internalisierten ApoA-I und Cholesterin, um dann ApoE-haltige HDL-Partikel zu bilden. Dies würde zu einer weitaus höheren Recyclingrate von ApoE3 führen und das in Abb. 16b gezeigte Ergebnis, bei Zusatz von HDL zum Chase-Medium, erklären. Bei etwa gleicher Effizienz der zellulären ApoE3- und ApoE4-Aufnahme (Bohnet et al., 1996) wurde beschrieben, dass ApoE4 in der Zelle akkumuliert (Heeren et al., 2004) und das Recycling dieser Isoform aus diesem Grunde stark reduziert ist. Dies wäre mit dem in unserer Analyse (Abb. 16b) dargestellten, weit unter dem des ApoE3- liegenden, basalen ApoE4-Recycling zu vereinen. Letzteres ist des Weiteren nicht allein durch LRP1-Überexpression steigerbar. Der, durch das reduzierte Recycling, in der postprandialen Phase fehlende ApoE-Nachschub im Plasma, ist eine Erklärung für die trotz effizienter ApoE4-Aufnahme verzögerte Aufnahme ApoE4-haltiger TRL (Bergeron und Havel, 1996). Das verminderte ApoE4-Recycling geht weiterhin mit einer intrazellulären Cholesterinakkumulation einher (Heeren et al., 2004), wodurch es zu einer zunehmenden Schaumzellbildung kommt. Auf diese Weise trägt das beeinträchtigte ApoE4-Recycling zu dem erhöhten Risiko der Atherosklerose entwicklung bei (Gregg et al., 1986; Davignon et al., 1988; Weisgraber, 1990; Dallongeville et al., 1992; Heeren et al., 2004).

ApoE2 bindet mit wesentlich geringerer Affinität an den LDLR als es für ApoE3 und ApoE4 beschrieben wurde (Schneider et al., 1981; Mahley et al., 1999). Sollte das auch für die Bindung an LRP1 zutreffen, könnte das, im Vergleich zum basalen ApoE3-Recycling, verminderte Recycling von ApoE2, (Abb. 16a und 16b) mit der geringen zellulären Konzentration an ApoE2 nach ApoE2-TRL-Aufnahme erklärt werden. Dagegen spricht jedoch die Studie von Ruiz et al.. Darin wird beschrieben, dass die Isoformen gleichermaßen an LRP1 binden (Ruiz et al., 2005). Auch wir vermuteten eine Kompensation der reduzierten LDLR-vermittelten ApoE2-TRL-Aufnahme durch LRP1 (Abb. 14a). Danach müsste ApoE2 in LRP1-überexprimierten Zellen ebenso gut recycelt werden wie ApoE3. In unseren Recycling-Experimenten konnten wir dies jedoch nicht zeigen. Zwar ist eine leichte Erhöhung des ApoE2-Recyclings durch LRP1-Überexpression zu erkennen, die Höhe des ApoE3-Recyclings wird aber bei weitem nicht erreicht (Abb. 16b).

Wir konnten zeigen, dass LRP1-Überexpression das ApoE-Recycling, besonders in Verbindung mit HDL im Chase-Medium, steigernd beeinflusst. Inwieweit sich die Stimulation mit Insulin auf den Einfluß von LRP1 auf das ApoE-Recycling auswirkt, ist im Detail nicht bekannt, und auch wir haben dazu direkt keine Versuche durchgeführt. In insulinsensitiven FAO-Zellen konnten wir allerdings zeigen, dass Insulin das ApoE3-

Recycling erhöht (Abb. 15). Anzunehmen wäre auch hier der Mechanismus über die insulininduzierte Translokation von LRP1 aus endosomalen Vesikeln an die Plasmamembran.

# 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von LRP1 für den intrazellulären Stoffwechsel der ApoE-Isoformen sowie die Wechselwirkung des postprandialen Hormones Insulin mit LRP1 untersucht. Zur genaueren Analyse der LRP1-Wirkung setzten wir ein fluoreszierendes Fusionsprotein aus LRP1 und EGFP ein, das in HEK293-Zellen überexprimiert wurde. Fluoreszenz-markierte ApoE wurden an TRL-Remnants gekoppelt, um nach zellulären Aufnahme- bzw. Pulse-Chase-Experimenten quantitative Aussagen über die ApoE-Aufnahme sowie über das Recycling der ApoE-Isoformen machen zu können.

In der konfokalen Mikroskopie konnten wir unter Stimulation mit Insulin eine Verlagerung von LRP1 aus intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran darstellen. Weitere Hinweise auf eine Insulin-abhängige Translokation ergaben sich aus Aufnahme-Experimenten. Mit Hilfe von RAP konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von TRLR unter Insulin-Stimulation zu steigern ist. In Leberzellen wird die RAP-Aufnahme ausschließlich durch LRP1 vermittelt, d.h. Insulin stimuliert die endozytotische Funktion von LRP1. Unter gleichen Bedingungen konnte die Aufnahme ApoE-haltiger TRLR in hepatischen Zellen gesteigert werden. In Experimenten mit LRP1-EGFP-überexprimierenden Zellen zeigte sich eine vermehrte Aufnahme von ApoE, insbesondere der Isoform ApoE2. Die nach Insulin-Stimulation erhöhte Oberflächenpräsentation von LRP1 führte, wie erwartet, noch einmal zu einer Steigerung der Internalisierung. LRP1 kompensiert durch die Stimulation mit Insulin die fehlende Bindung der Isoform ApoE2 an den LDLR und gewährleistet eine weitgehend normale Aufnahmerate.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das LRP1-abhängige Recycling untersucht. Nach einer starken postprandialen Lipidbelastung ist eine hohe ApoE-Verfügbarkeit im Plasma notwendig. Dies wird durch ein schnelles Recycling des ApoE-Anteils der aufgenommenen TRLR/ApoE gewährleistet. Durch intravaskulären ApoE-Transfer, von HDL auf neu entstandene TRLR, kann ApoE unmittelbar die erneute TRLR-Internalisierung vermitteln. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, insbesondere bei zusätzlicher HDL-Induktion, LRP1-Expression zu einer Steigerung des ApoE-Recyclings führt. Die LRP1-Wirkung ist auch hier am deutlichsten bei ApoE2 zu erkennen.

LRP1 spielt also eine bedeutende Rolle bei der Aufnahme postprandial in großen Mengen vorhandener hoch atherogener TRLR. Zum einen direkt durch die Bindung von ApoE, zum anderen indirekt über das LRP1-vermittelte ApoE-Recycling, das für die intravaskuläre Bereitstellung von ApoE, für weitere TRLR-Aufnahmezyklen, verantwortlich ist.

# 7 Literaturverzeichnis

Ai, M., Tanaka, A., Ogita, K., Sekinc, M., Numano, F., Numano, F. und Reaven, G. M. (2001). "Relationship between plasma insulin concentration and plasma remnant lipoprotein response to an oral fat load in patients with type 2 diabetes" J Am Coll Cardiol **38**(6): 1628-32.

Anderson, R. G., Brown, M. S. und Goldstein, J. L. (1977). "Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts" Cell **10**(3): 351-64.

Austin, M. A. (1991). "Plasma triglyceride and coronary heart disease" Arterioscler Thromb **11**(1): 2-14.

Bacskai, B. J., Xia, M. Q., Strickland, D. K., Rebeck, G. W. und Hyman, B. T. (2000). "The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors" Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21): 11551-6.

Beisiegel, U. (1995). "Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism" Curr Opin Lipidol **6**(3): 117-22.

Beisiegel, U. und Heeren, J. (1997). "Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors" Proc Nutr Soc **56**(2): 731-7.

Beisiegel, U., Schneider, W. J., Brown, M. S. und Goldstein, J. L. (1982). "Immunoblot analysis of low density lipoprotein receptors in fibroblasts from subjects with familial hypercholesterolemia" J Biol Chem **257**(21): 13150-6.

Beisiegel, U., Weber, W. und Bengtsson-Olivecrona, G. (1991). "Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein" Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8342-6.

Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. und Stanley, K. K. (1989). "The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein" Nature **341**(6238): 162-4.

Bergeron, N. und Havel, R. J. (1996). "Prolonged postprandial responses of lipids and apolipoproteins in triglyceride-rich lipoproteins of individuals expressing an apolipoprotein epsilon 4 allele" J Clin Invest **97**(1): 65-72.

Bohnet, K., Pillot, T., Visvikis, S., Sabolovic, N. und Siest, G. (1996). "Apolipoprotein (apo) E genotype and apoE concentration determine binding of normal very low density lipoproteins to HepG2 cell surface receptors" J Lipid Res **37**(6): 1316-24.

Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W. P., Anderson, R. G. und Herz, J. (2003). "LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis" Science **300**(5617): 329-32.

Bradley, W. A. und Gianturco, S. H. (1986). "ApoE is necessary and sufficient for the binding of large triglyceride-rich lipoproteins to the LDL receptor; apoB is unnecessary" J Lipid Res **27**(1): 40-8.

Brown, M. S. und Goldstein, J. L. (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis" Science **232**(4746): 34-47.

Bryant, N. J., Govers, R. und James, D. E. (2002). "Regulated transport of the glucose transporter GLUT4" Nat Rev Mol Cell Biol **3**(4): 267-77.

Bu, G. (1998). "Receptor-associated protein: a specialized chaperone and antagonist for members of the LDL receptor gene family" Curr Opin Lipidol **9**(2): 149-55.

Bu, G. (2001). "The roles of receptor-associated protein (RAP) as a molecular chaperone for members of the LDL receptor family" Int Rev Cytol **209**: 79-116.

Bu, G. und Schwartz, A. L. (1998). "RAP, a novel type of ER chaperone" Trends Cell Biol **8**(7): 272-6.

Chen, W., Silver, D. L., Smith, J. D. und Tall, A. R. (2000). "Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1- mediated cholesterol efflux in macrophages" J Biol Chem **275**(40): 30794-800.

Chen, W., Sun, Y., Welch, C., Gorelik, A., Leventhal, A. R., Tabas, I. und Tall, A. R. (2001). "Preferential ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux from late endosomes/lysosomes" J Biol Chem **276**(47): 43564-9.

Chen, W. J., Goldstein, J. L. und Brown, M. S. (1990). "NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor" J Biol Chem **265**(6): 3116-23.

Chou, C. Y., Lin, Y. L., Huang, Y. C., Sheu, S. Y., Lin, T. H., Tsay, H. J., Chang, G. G. und Shiao, M. S. (2005). "Structural variation in human apolipoprotein E3 and E4: secondary structure, tertiary structure, and size distribution" Biophys J **88**(1): 455-66.

Cohen, A. W., Combs, T. P., Scherer, P. E. und Lisanti, M. P. (2003). "Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes" Am J Physiol Endocrinol Metab **285**(6): E1151-60.

Corvera, S., Graver, D. F. und Smith, R. M. (1989). "Insulin increases the cell surface concentration of alpha 2-macroglobulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. Altered transit of the receptor among intracellular endocytic compartments" J Biol Chem **264**(17): 10133-8.

Curtiss, L. K. und Boisvert, W. A. (2000). "Apolipoprotein E and atherosclerosis" Curr Opin Lipidol **11**(3): 243-51.

Dallongeville, J., Lussier-Cacan, S. und Davignon, J. (1992). "Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis" J Lipid Res **33**(4): 447-54.

Dautry-Varsat, A. (1986). "Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor" Biochimie **68**(3): 375-81.

Davignon, J., Gregg, R. E. und Sing, C. F. (1988). "Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis" Arteriosclerosis **8**(1): 1-21.

Descamps, O., Bilheimer, D. und Herz, J. (1993). "Insulin stimulates receptor-mediated uptake of apoE-enriched lipoproteins and activated alpha 2-macroglobulin in adipocytes" J Biol Chem **268**(2): 974-81.

Dong, L. M., Wilson, C., Wardell, M. R., Simmons, T., Mahley, R. W., Weisgraber, K. H. und Agard, D. A. (1994). "Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms" J Biol Chem **269**(35): 22358-65.

Eto, M., Watanabe, K., Sato, T. und Makino, I. (1989). "Apolipoprotein-E2 and hyperlipoproteinemia in noninsulin-dependent diabetes mellitus" J Clin Endocrinol Metab **69**(6): 1207-12.

Farkas, M. H., Swift, L. L., Hasty, A. H., Linton, M. F. und Fazio, S. (2003). "The recycling of apolipoprotein E in primary cultures of mouse hepatocytes. Evidence for a physiologic connection to high density lipoprotein metabolism" J Biol Chem **278**(11): 9412-7.

Farkas, M. H., Weisgraber, K. H., Shepherd, V. L., Linton, M. F., Fazio, S. und Swift, L. L. (2004). "The recycling of apolipoprotein E and its amino-terminal 22 kDa fragment: evidence for multiple redundant pathways" J Lipid Res **45**(8): 1546-54.

Fazio, S., Linton, M. F., Hasty, A. H. und Swift, L. L. (1999). "Recycling of apolipoprotein E in mouse liver" J Biol Chem **274**(12): 8247-53.

Field, P. A. und Gibbons, G. F. (2000). "Decreased hepatic expression of the low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL receptor-related protein in aging rats is associated with delayed clearance of chylomicrons from the circulation" Metabolism **49**(4): 492-8.

Gandy, S. (2005). "The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease" J Clin Invest **115**(5): 1121-9.

Garcia, C. K., Wilund, K., Arca, M., Zuliani, G., Fellin, R., Maioli, M., Calandra, S., Bertolini, S., Cossu, F., Grishin, N., Barnes, R., Cohen, J. C. und Hobbs, H. H. (2001). "Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein" Science **292**(5520): 1394-8.

Geuze, H. J., Slot, J. W., Strous, G. J., Lodish, H. F. und Schwartz, A. L. (1983). "Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis" Cell **32**(1): 277-87.

Gotto, A. M., Jr. (1998). "Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease" Am J Cardiol **82**(9A): 22Q-25Q.

Gotto, A. M., Jr., Pownall, H. J. und Havel, R. J. (1986). "Introduction to the plasma lipoproteins" Methods Enzymol **128**: 3-41.

Greenow, K., Pearce, N. J. und Ramji, D. P. (2005). "The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis" J Mol Med **83**(5): 329-42.

Gregg, R. E., Zech, L. A., Schaefer, E. J., Stark, D., Wilson, D. und Brewer, H. B., Jr. (1986). "Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans" J Clin Invest **78**(3): 815-21.

Hasty, A. H., Plummer, M. R., Weisgraber, K. H., Linton, M. F., Fazio, S. und Swift, L. L. (2005). "The recycling of apolipoprotein E in macrophages: influence of HDL and apolipoprotein A-I" J Lipid Res **46**(7): 1433-9.

Hatters, D. M., Peters-Libeu, C. A. und Weisgraber, K. H. (2006). "Apolipoprotein E structure: insights into function" Trends Biochem Sci **31**(8): 445-54.

Havel, R. J. und Kane, J. P. (2001). Introduction: Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, Eds. McGraw-Hill Book Co.

He, G., Gupta, S., Yi, M., Michaely, P., Hobbs, H. H. und Cohen, J. C. (2002). "ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2" J Biol Chem **277**(46): 44044-9.

Heeren, J. und Beisiegel, U. (2001). "Intracellular metabolism of triglyceride-rich lipoproteins" Curr Opin Lipidol **12**(3): 255-60.

Heeren, J., Beisiegel, U. und Grewal, T. (2006). "Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(3): 442-8.

Heeren, J., Grewal, T., Jackle, S. und Beisiegel, U. (2001). "Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo" J Biol Chem **276**(45): 42333-8.

Heeren, J., Grewal, T., Laatsch, A., Becker, N., Rinninger, F., Rye, K. A. und Beisiegel, U. (2004). "Impaired recycling of apolipoprotein E4 is associated with intracellular cholesterol accumulation" J Biol Chem **279**(53): 55483-92.

Heeren, J., Grewal, T., Laatsch, A., Rottke, D., Rinninger, F., Enrich, C. und Beisiegel, U. (2003). "Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization" J Biol Chem **278**(16): 14370-8.

Heeren, J., Niemeier, A., Merkel, M. und Beisiegel, U. (2002). "Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo" J Mol Med **80**(9): 576-84.

Heeren, J., Weber, W. und Beisiegel, U. (1999). "Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation" J Cell Sci **112 (Pt 3)**: 349-59.

Heller-Harrison, R. A., Morin, M., Guilherme, A. und Czech, M. P. (1996). "Insulin-mediated targeting of phosphatidylinositol 3-kinase to GLUT4-containing vesicles" J Biol Chem **271**(17): 10200-4.

Herz, J. und Bock, H. H. (2002). "Lipoprotein receptors in the nervous system" Annu Rev Biochem **71**: 405-34.

Herz, J., Goldstein, J. L., Strickland, D. K., Ho, Y. K. und Brown, M. S. (1991). "39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor" J Biol Chem **266**(31): 21232-8.

Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H. und Stanley, K. K. (1988). "Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor" Embo J **7**(13): 4119-27.

Herz, J., Kowal, R. C., Goldstein, J. L. und Brown, M. S. (1990). "Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment" Embo J **9**(6): 1769-76.

Herz, J. und Strickland, D. K. (2001). "LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor" J Clin Invest **108**(6): 779-84.

Hiesberger, T., Huttler, S., Rohlmann, A., Schneider, W., Sandhoff, K. und Herz, J. (1998). "Cellular uptake of saposin (SAP) precursor and lysosomal delivery by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)" Embo J **17**(16): 4617-25.

Huang, Y., von Eckardstein, A., Wu, S. und Assmann, G. (1995). "Effects of the apolipoprotein E polymorphism on uptake and transfer of cell-derived cholesterol in plasma" J Clin Invest **96**(6): 2693-701.

Hussain, M. M., Kancha, R. K., Zhou, Z., Luchoomun, J., Zu, H. und Bakillah, A. (1996). "Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors" Biochim Biophys Acta **1300**(3): 151-70.

Imaizumi, K., Fainaru, M. und Havel, R. J. (1978). "Composition of proteins of mesenteric lymph chylomicrons in the rat and alterations produced upon exposure of chylomicrons to blood serum and serum proteins" J Lipid Res **19**(6): 712-22.

Imaizumi, K., Havel, R. J., Fainaru, M. und Vigne, J. L. (1978). "Origin and transport of the A-I and arginine-rich apolipoproteins in mesenteric lymph of rats" J Lipid Res **19**(8): 1038-46.

Kane, J. P. (1996). Structure and Function of the Plasma Lipoproteins and Their Receptors. Atherosclerosis and Coronary Disease. Fuster, V., Ross R., and Topol, E.J. Philadelphia. Lippincott-Raven Publishers**:** 89-103.

Karpe, F. (1999). "Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis" J Intern Med **246**(4): 341-55.

Kim, D. H., Iijima, H., Goto, K., Sakai, J., Ishii, H., Kim, H. J., Suzuki, H., Kondo, H., Saeki, S. und Yamamoto, T. (1996). "Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain" J Biol Chem **271**(14): 8373-80.

Knouff, C., Hinsdale, M. E., Mezdour, H., Altenburg, M. K., Watanabe, M., Quarfordt, S. H., Sullivan, P. M. und Maeda, N. (1999). "Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice" J Clin Invest **103**(11): 1579-86.

Ko, K. W., Avramoglu, R. K., McLeod, R. S., Vukmirica, J. und Yao, Z. (2001). "The insulin-stimulated cell surface presentation of low density lipoprotein receptor-related protein in 3T3-L1 adipocytes is sensitive to phosphatidylinositide 3-kinase inhibition" Biochemistry **40**(3): 752-9.

Ko, K. W., McLeod, R. S., Avramoglu, R. K., Nimpf, J., FitzGerald, D. J., Vukmirica, J. und Yao, Z. (1998). "Mutation at the processing site of chicken low density lipoprotein receptor-related protein impairs efficient endoplasmic reticulum exit, but proteolytic cleavage is not essential for its endocytic functions" J Biol Chem **273**(43): 27779-85.

Kounnas, M. Z., Morris, R. E., Thompson, M. R., FitzGerald, D. J., Strickland, D. K. und Saelinger, C. B. (1992). "The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A" J Biol Chem **267**(18): 12420-3.

Kowal, R. C., Herz, J., Goldstein, J. L., Esser, V. und Brown, M. S. (1989). "Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins" Proc Natl Acad Sci U S A **86**(15): 5810-4.

Krieger, M. (2001). "Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems" J Clin Invest **108**(6): 793-7.

Krieger, M. und Herz, J. (1994). "Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)" Annu Rev Biochem **63**: 601-37.

Kumar, N., Afeyan, R., Sheppard, S., Harms, B. und Lauffenburger, D. A. (2007). "Quantitative analysis of Akt phosphorylation and activity in response to EGF and insulin treatment" Biochem Biophys Res Commun **354**(1): 14-20.

Laatsch, A., Ragozin, S., Grewal, T., Beisiegel, U. und Joerg, H. (2004). "Differential RNA interference: replacement of endogenous with recombinant low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)" Eur J Cell Biol **83**(3): 113-20.

Lamarche, B., Tchernof, A., Moorjani, S., Cantin, B., Dagenais, G. R., Lupien, P. J. und Despres, J. P. (1997). "Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study" Circulation **95**(1): 69-75.

Lazic, A., Dolmer, K., Strickland, D. K. und Gettins, P. G. (2006). "Dissection of RAP-LRP interactions: binding of RAP and RAP fragments to complement-like repeats 7 and 8 from ligand binding cluster II of LRP" Arch Biochem Biophys **450**(2): 167-75.

Li, Y., Lu, W., Marzolo, M. P. und Bu, G. (2001). "Differential functions of members of the low density lipoprotein receptor family suggested by their distinct endocytosis rates" J Biol Chem **276**(21): 18000-6.

Li, Y., Marzolo, M. P., van Kerkhof, P., Strous, G. J. und Bu, G. (2000). "The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein" J Biol Chem **275**(22): 17187-94.

Longuet, C., Broca, C., Costes, S., Hani, E. H., Bataille, D. und Dalle, S. (2005). "Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans" Endocrinology **146**(2): 643-54.

Lund, H., Takahashi, K., Hamilton, R. L. und Havel, R. J. (1989). "Lipoprotein binding and endosomal itinerary of the low density lipoprotein receptor-related protein in rat liver" Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9318-22.

Mahley, R. W. (1988). "Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology" Science **240**(4852): 622-30.

Mahley, R. W., Huang, Y. und Rall, S. C., Jr. (1999). "Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes" J Lipid Res **40**(11): 1933-49.

Mahley, R. W. und Ji, Z. S. (1999). "Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E" J Lipid Res **40**(1): 1-16.

Mahley, R. W. und Rall, S. C., Jr. (2000). "Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein" Annu Rev Genomics Hum Genet **1**: 507-37.

Malloy, S. I., Altenburg, M. K., Knouff, C., Lanningham-Foster, L., Parks, J. S. und Maeda, N. (2004). "Harmful effects of increased LDLR expression in mice with human APOE*4 but not APOE*3" Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(1): 91-7.

Mamdouh, Z., Deckelbaum, R. J. und Maxfield, F. R. (2000). "Lipid-free apolipoprotein E is internalized via cell surface proteoglycans to the late endosomes but escapes degradation through a non transferrin recycling compartment" Circulation **102(Suppl)**: 44957.

Mamotte, C. D., Sturm, M., Foo, J. I., van Bockxmeer, F. M. und Taylor, R. R. (1999). "Comparison of the LDL-receptor binding of VLDL and LDL from apoE4 and apoE3 homozygotes" Am J Physiol **276**(3 Pt 1): E553-7.

Mann, W. A., Meyer, N., Berg, D., Greten, H. und Beisiegel, U. (1999). "Lipoprotein lipase compensates for the defective function of apo E variants in vitro by interacting with proteoglycans and lipoprotein receptors" Atherosclerosis **145**(1): 61-9.

Merkel, M., Eckel, R. H. und Goldberg, I. J. (2002). "Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation" J Lipid Res **43**(12): 1997-2006.

Michaely, P., Li, W. P., Anderson, R. G., Cohen, J. C. und Hobbs, H. H. (2004). "The modular adaptor protein ARH is required for low density lipoprotein (LDL) binding and internalization but not for LDL receptor clustering in coated pits" J Biol Chem **279**(32): 34023-31.

Michikawa, M., Fan, Q. W., Isobe, I. und Yanagisawa, K. (2000). "Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture" J Neurochem **74**(3): 1008-16.

Moestrup, S. K., Gliemann, J. und Pallesen, G. (1992). "Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues" Cell Tissue Res **269**(3): 375-82.

Mukherjee, S., Ghosh, R. N. und Maxfield, F. R. (1997). "Endocytosis" Physiol Rev **77**(3): 759-803.

Nassar, T., Haj-Yehia, A., Akkawi, S., Kuo, A., Bdeir, K., Mazar, A., Cines, D. B. und Higazi, A. A. (2002). "Binding of urokinase to low density lipoprotein-related receptor (LRP) regulates vascular smooth muscle cell contraction" J Biol Chem **277**(43): 40499-504.

Neels, J. G., van Den Berg, B. M., Lookene, A., Olivecrona, G., Pannekoek, H. und van Zonneveld, A. J. (1999). "The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties" J Biol Chem **274**(44): 31305-11.

Nelson, N. (1992). "Structure and function of V-ATPases in endocytic and secretory organelles" J Exp Biol **172**: 149-53.

Newton, C. S., Loukinova, E., Mikhailenko, I., Ranganathan, S., Gao, Y., Haudenschild, C. und Strickland, D. K. (2005). "Platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFR-beta) activation promotes its association with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for co-receptor function" J Biol Chem **280**(30): 27872-8.

Nykjaer, A. und Willnow, T. E. (2002). "The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife?" Trends Cell Biol **12**(6): 273-80.

Octave, J. N., Schneider, Y. J., Truet, A. und Crichton, R. R. (1983). "Iron uptake and utilization by mammalian cells. I:Cellular uptake of transferrin and iron." Trends Biochem Sci **8**: 217-220.

Olivecrona, G. und Olivecrona, T. (1995). "Triglyceride lipases and atherosclerosis" Curr Opin Lipidol **6**(5): 291-305.

Oram, J. F. (2002). "ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking" Curr Opin Lipidol **13**(4): 373-81.

Packard, C. J. und Shepherd, J. (1997). "Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism" Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(12): 3542-56.

Ragozin, S., Niemeier, A., Laatsch, A., Loeffler, B., Merkel, M., Beisiegel, U. und Heeren, J. (2005). "Knockdown of hepatic ABCA1 by RNA interference decreases plasma HDL cholesterol levels and influences postprandial lipemia in mice" Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(7): 1433-8.

Ranganathan, S., Liu, C. X., Migliorini, M. M., Von Arnim, C. A., Peltan, I. D., Mikhailenko, I., Hyman, B. T. und Strickland, D. K. (2004). "Serine and threonine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein by protein kinase Calpha regulates endocytosis and association with adaptor molecules" J Biol Chem **279**(39): 40536-44.

Raychowdhury, R., Niles, J. L., McCluskey, R. T. und Smith, J. A. (1989). "Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor" Science **244**(4909): 1163-5.

Rea, S. und James, D. E. (1997). "Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles" Diabetes **46**(11): 1667-77.

Rees, D., Sloane, T., Jessup, W., Dean, R. T. und Kritharides, L. (1999). "Apolipoprotein A-I stimulates secretion of apolipoprotein E by foam cell macrophages" J Biol Chem **274**(39): 27925-33.

Rensen, P. C., Jong, M. C., van Vark, L. C., van der Boom, H., Hendriks, W. L., van Berkel, T. J., Biessen, E. A. und Havekes, L. M. (2000). "Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis" J Biol Chem **275**(12): 8564-71.

Ribalta, J., Vallve, J. C., Girona, J. und Masana, L. (2003). "Apolipoprotein and apolipoprotein receptor genes, blood lipids and disease" Curr Opin Clin Nutr Metab Care **6**(2): 177-87.

Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R. E. und Herz, J. (1998). "Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants" J Clin Invest **101**(3): 689-95.

Roses, A. D. (1996). "Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease" Annu Rev Med **47**: 387-400.

Ruiz, J., Kouiavskaia, D., Migliorini, M., Robinson, S., Saenko, E. L., Gorlatova, N., Li, D., Lawrence, D., Hyman, B. T., Weisgraber, K. H. und Strickland, D. K. (2005). "The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor" J Lipid Res **46**(8): 1721-31.

Saito, H., Dhanasekaran, P., Baldwin, F., Weisgraber, K. H., Phillips, M. C. und Lund-Katz, S. (2003). "Effects of polymorphism on the lipid interaction of human apolipoprotein E" J Biol Chem **278**(42): 40723-9.

Scherer, P. E., Lisanti, M. P., Baldini, G., Sargiacomo, M., Mastick, C. C. und Lodish, H. F. (1994). "Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles" J Cell Biol **127**(5): 1233-43.

Schneider, W. J., Kovanen, P. T., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Utermann, G., Weber, W., Havel, R. J., Kotite, L., Kane, J. P., Innerarity, T. L. und Mahley, R. W. (1981). "Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows" J Clin Invest **68**(4): 1075-85.

Schneider, W. J. und Nimpf, J. (2003). "LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signaling" Cell Mol Life Sci **60**(5): 892-903.

Shashkin, P., Dragulev, B. und Ley, K. (2005). "Macrophage differentiation to foam cells" Curr Pharm Des **11**(23): 3061-72.

Shepherd, P. R. und Kahn, B. B. (1999). "Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus" N Engl J Med **341**(4): 248-57.

Shepherd, P. R., Withers, D. J. und Siddle, K. (1998). "Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling" Biochem J **333 (Pt 3)**: 471-90.

Silver, D. L., Wang, N., Xiao, X. und Tall, A. R. (2001). "High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective

sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion" J Biol Chem **276**(27): 25287-93.

Sirinian, M. I., Belleudi, F., Campagna, F., Ceridono, M., Garofalo, T., Quagliarini, F., Verna, R., Calandra, S., Bertolini, S., Sorice, M., Torrisi, M. R. und Arca, M. (2005). "Adaptor protein ARH is recruited to the plasma membrane by low density lipoprotein (LDL) binding and modulates endocytosis of the LDL/LDL receptor complex in hepatocytes" J Biol Chem **280**(46): 38416-23.

Spooner, P. M., Chernick, S. S., Garrison, M. M. und Scow, R. O. (1979). "Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. Separation and dependence of hormonal effects on hexose metabolism and synthesis of RNA and protein" J Biol Chem **254**(20): 10021-9.

Springer, T. A. (1998). "An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components" J Mol Biol **283**(4): 837-62.

Stolt, P. C. und Bock, H. H. (2006). "Modulation of lipoprotein receptor functions by intracellular adaptor proteins" Cell Signal **18**(10): 1560-71.

Strickland, D. K., Ashcom, J. D., Williams, S., Burgess, W. H., Migliorini, M. und Argraves, W. S. (1990). "Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor" J Biol Chem **265**(29): 17401-4.

Strickland, D. K., Gonias, S. L. und Argraves, W. S. (2002). "Diverse roles for the LDL receptor family" Trends Endocrinol Metab **13**(2): 66-74.

Swertfeger, D. K., Bu, G. und Hui, D. Y. (2002). "Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E inhibition of smooth muscle cell migration" J Biol Chem **277**(6): 4141-6.

Swertfeger, D. K. und Hui, D. Y. (2001). "Apolipoprotein E receptor binding versus heparan sulfate proteoglycan binding in its regulation of smooth muscle cell migration and proliferation" J Biol Chem **276**(27): 25043-8.

Swertfeger, D. K. und Hui, D. Y. (2001). "Apolipoprotein E: a cholesterol transport protein with lipid transport-independent cell signaling properties" Front Biosci **6**: D526-35.

Tabas, I., Myers, J. N., Innerarity, T. L., Xu, X. X., Arnold, K., Boyles, J. und Maxfield, F. R. (1991). "The influence of particle size and multiple apoprotein E-receptor interactions on the endocytic targeting of beta-VLDL in mouse peritoneal macrophages" J Cell Biol **115**(6): 1547-60.

Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Nakai, T., Sakai, J. und Yamamoto, T. (1992). "Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity" Proc Natl Acad Sci U S A **89**(19): 9252-6.

Thomas, P. und Smart, T. G. (2005). "HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins" J Pharmacol Toxicol Methods **51**(3): 187-200.

Utermann, G., Langenbeck, U., Beisiegel, U. und Weber, W. (1980). "Genetics of the apolipoprotein E system in man" Am J Hum Genet **32**(3): 339-47.

van't Hooft, F. und Havel, R. J. (1981). "Metabolism of chromatographically separated rat serum lipoproteins specifically labeled with 125I-apolipoprotein E" J Biol Chem **256**(8): 3963-8.

Veniant, M. M., Zlot, C. H., Walzem, R. L., Pierotti, V., Driscoll, R., Dichek, D., Herz, J. und Young, S. G. (1998). "Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice" J Clin Invest **102**(8): 1559-68.

Verges, M., Bensadoun, A., Herz, J., Belcher, J. D. und Havel, R. J. (2004). "Endocytosis of hepatic lipase and lipoprotein lipase into rat liver hepatocytes in vivo is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein" J Biol Chem **279**(10): 9030-6.

von Eckardstein, A., Nofer, J. R. und Assmann, G. (2001). "High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport" Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(1): 13-27.

Waldron, E., Jaeger, S. und Pietrzik, C. U. (2006). "Functional role of the low-density lipoprotein receptor-related protein in Alzheimer's disease" Neurodegener Dis **3**(4-5): 233-8.

Weisgraber, K. H. (1990). "Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112" J Lipid Res **31**(8): 1503-11.

Weisgraber, K. H., Rall, S. C., Jr. und Mahley, R. W. (1981). "Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms" J Biol Chem **256**(17): 9077-83.

White, M. F. (1998). "The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action" Mol Cell Biochem **182**(1-2): 3-11.

Williams, S. E., Ashcom, J. D., Argraves, W. S. und Strickland, D. K. (1992). "A novel mechanism for controlling the activity of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein" J Biol Chem **267**(13): 9035-40.

Willnow, T. E., Armstrong, S. A., Hammer, R. E. und Herz, J. (1995). "Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo" Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4537-41.

Willnow, T. E., Moehring, J. M., Inocencio, N. M., Moehring, T. J. und Herz, J. (1996). "The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro" Biochem J **313 (Pt 1)**: 71-6.

Willnow, T. E., Sheng, Z., Ishibashi, S. und Herz, J. (1994). "Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist" Science **264**(5164): 1471-4.

Wilson, P. W., D'Agostino, R. B., Levy, D., Belanger, A. M., Silbershatz, H. und Kannel, W. B. (1998). "Prediction of coronary heart disease using risk factor categories" Circulation **97**(18): 1837-47.

Yamazaki, H., Bujo, H., Kusunoki, J., Seimiya, K., Kanaki, T., Morisaki, N., Schneider, W. J. und Saito, Y. (1996). "Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member" J Biol Chem **271**(40): 24761-8.

Yokoyama, S. (2006). "Assembly of high-density lipoprotein" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(1): 20-7.

Zambon, A., Schmidt, I., Beisiegel, U. und Brunzell, J. D. (1996). "Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins" J Lipid Res **37**(11): 2394-404.

Zannis, V. I., Just, P. W. und Breslow, J. L. (1981). "Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined" Am J Hum Genet **33**(1): 11-24.

Zerbinatti, C. V. und Bu, G. (2005). "LRP and Alzheimer's disease" Rev Neurosci **16**(2): 123-35.

Zhang, H., Links, P. H., Ngsee, J. K., Tran, K., Cui, Z., Ko, K. W. und Yao, Z. (2004). "Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment" J Biol Chem **279**(3): 2221-30.

Zheng, C., Murdoch, S. J., Brunzell, J. D. und Sacks, F. M. (2006). "Lipoprotein lipase bound to apolipoprotein B lipoproteins accelerates clearance of postprandial lipoproteins in humans" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(4): 891-6.

Zheng, P., Horwitz, A., Waelde, C. A. und Smith, J. D. (2001). "Stably transfected ABCA1 antisense cell line has decreased ABCA1 mRNA and cAMP-induced cholesterol efflux to apolipoprotein AI and HDL" Biochim Biophys Acta **1534**(2-3): 121-8.

# 8 Anhang

## 8.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| ABCA1 | ATP-Binding-Cassette-Transporter A1 |
| Apo | Apolipoprotein |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CM | Chylomikronen |
| CR | Chylomikronen-Remnants |
| Cy | Cyanin-Farbstoff |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ECFP | Enhanced Cyan Fluorescent Protein |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| EGFP | Enhanced Green Fluorescent Protein |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FAO | Rattenhepatomzellen |
| GLUT-4 | Glukosetransporter 4 |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| HEK293 | Humane Embryonale Nierenzelllinie |
| HIR-11 | Human-Insulin-Receptor-11 |
| IDL | Intermediate Density Lipoprotein |
| IRS-Proteine | Insulin-Rezeptor-Substrat-Proteine |
| kDa | Kilodalton |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| LDLR | Low Density Lipoprotein Receptor |
| LPL | Lipoproteinlipase |
| LRP1 | LDL-Rezeptor-Related Protein 1 |
| p | Vektor |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PDGF | platelet-derived growth factor |
| PDGFR | PDGF-Rezeptor |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PI-3-Kinase | Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| PPD | 1,2 Phenylendiamin |
| r | rekombinant |
| RAP | receptor-associated protein |
| RIPA-Puffer | radioimmunoprecipitation assay buffer |
| SDS | Sodiumdodecylsulfate |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SR-BI | Scavenger Receptor class B I |
| TBS | terbutaline sulfate |
| Tf | Transferrin |
| TfR | Transferrin-Rezeptor |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TRL | triglyzeridreiche Lipoproteine |
| TRLR | TRL-Remnants |
| TRLRtryps | trypsinierte TRLR |
| VLDL | Very Low Density Lipoprotein |

## 8.2 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel für die Bereitstellung des Themas und der technischen Voraussetzungen, die diese Arbeit möglich gemacht haben.

Ich danke herzlichst Herrn PD Dr. Jörg Heeren für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und geduldige Unterstützung. Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. Alexander Laatsch für die ständige Hilfsbereitschaft und kompetente Mitbetreuung bedanken.

Für die geduldige Hilfe bei dem Erlernen der molekularbiologischen Methoden und die überaus nette Zusammenarbeit gebührt mein aufrichtiger Dank Frau Sandra Ehret. Die kollegiale Atmosphäre habe ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Beisiegel zu verdanken.

## 8.3 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

| | |
|---|---|
| Name: | Marijke Sornsakrin |
| Geburtsdatum: | 22. August 1980 |
| Geburtsort: | Hamburg |
| Familienstand: | ledig |
| Staatsangehörigkeit: | deutsch |

SCHULBILDUNG

| | |
|---|---|
| 1986 – 1990 | Freie Kinderschule Hamburg |
| 1990 – 1999 | Max-Brauer-Gesamtschule, Hamburg |
| 06/1999 | Abitur |

STUDIUM

| | |
|---|---|
| 10/1999 | Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg |
| 08/2002 | 1. Staatsexamen |
| 03/2005 | 2. Staatsexamen |
| 11/2006 | 3. Staatsexamen |
| 10/2003 – 06/2004 | Studium der Humanmedizin an der Facultad de Medicina de Cádiz / Spanien |

PRAKTISCHES JAHR

| | |
|---|---|
| 10/2005 – 09/2006 | Pädiatrie, UKE, Hamburg<br>Chirurgie, Princess Alexandra Hospital, Brisbane und Singapore General Hospital, Singapur<br>Innere Medizin, AK Altona, Hamburg |

BERUFLICHER WERDEGANG

| | |
|---|---|
| seit 05/2007 | Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, UKE, Hamburg<br>Ärztliche Leitung: Prof. Dr. med. K. Ullrich |

## 8.4 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Marijke Sornsakrin