Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Aus dem Institut für Biochemie, Molekularbiologie und
molekulare Zellbiologie
Direktor (komm.): Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Guse

Charakterisierung des Lipoproteinstoffwechsels der Zelllinie HepaRG

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Tobias Hesper
aus Bad Pyrmont

Hamburg, 2011

Angenommen von der medizinischen Fakultät am: 25.08.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. rer. nat. J. Heeren

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. med. M. Merkel

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. med. P. Algenstaedt

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 1

1 Arbeitshypothese und Fragestellung 5

2 Einleitung 6

2.1 Lipoproteinstoffwechsel 6

2.1.1 Übersicht über die verschiedenen Lipoproteinklassen und ihre Apolipoproteine 6

2.1.2 Exogener Lipoproteinstoffwechsel 11

2.1.3 Endogener Lipoproteinstoffwechsel 15

2.1.4 Reverser Cholesteroltransport 17

2.2 Low density liporotein receptor-related protein 1 und die LDL-Rezeptor Gen-Familie 19

2.3 Leberzellmodelle 25

2.4 HepaRG 27

2.5 Ziele der Arbeit 30

3 Material und Methoden 31

3.1 Materialien 31

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel 31

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien 32

3.1.3 Lösungen und Puffer 33

3.1.4 Antikörper 36

3.2 Proteinbiochemie 37

3.2.1 Zelllyse und Gesamt-Protein Präparation 37

3.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry 37

3.2.3 SDS-PAGE 38

3.2.4 Western-Blot 38

3.2.5 Untersuchung der Insulinsensitivität mittels Phosphoprotein-spezifischer Antikörper 39

3.3 Zellbiologie und Ligandenpräparation 40

3.3.1 Zellkultur 40

3.3.2 Zelldifferenzierung 42

3.3.3 Herstellung von TRL aus EDTA-Vollblut 42

3.3.4 Cholesterol- und Triglyzeridbestimmung 43

3.3.5 Hydrolyse von Chylomikronen zur Herstellung von Chylomikronen-Remnants 43

3.3.6 Darstellung der insulinabhängigen Aufnahme von LRP1-Liganden mittels Fluoreszenzdetektion 44

3.3.7 ^{125}I-Uptake-Assays zur Quantifizierung der insulinabhängigen Aufnahme über LRP1 44

3.3.8 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung 45

3.3.9 Durchflusszytometrie 45

3.4 Mikroskopie 47
3.4.1 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie 47
3.4.2 Lichtmikroskopie 49

4 Ergebnisse 50
4.1 Morphologisches Erscheinungsbild von HepaRG 51
4.1.1 Lichtmikroskopische Darstellung im Laufe der Differenzierung 51
4.1.2 Untersuchung des DNA-Gehalts 53
4.2 Proteinexpressionsprofil 56
4.2.1 LDL-Rezeptorfamilie 56
4.2.2 Apolipoproteine 59
4.3 Intrazelluläre Lokalisation von LRP1 60
4.4 Insulinsensitivität und Partikelaufnahme 62
4.4.1 Insulinabhängige Phosphorylierung der Insulinrezeptor-Signaltransduktionskaskade 62
4.4.2 Darstellung der insulinabhängigen Aufnahme mittels Fluoreszenzdetektion 65
4.4.3 Quantitative Analyse der insulinstimulierten Partikelaufnahme 68

5 Diskussion 71
5.1 Interpretation der Zellmorphologie 71
5.2 Proteinexpressionsprofil 75
5.3 Zellbiologische Eigenschaften von HepaRG 78
5.3.1 Intrazelluläre Lokalisation von LRP1 78
5.3.2 Phosphorylierungszustände in der IR-Signaltransduktionskaskade 79
5.3.3 Insulinabhängige Aufnahme über LRP1 81

6 Zusammenfassung 84

Abbildungsverzeichnis 85

Tabellenverzeichnis 86

Literaturverzeichnis 87

Danksagung 105

Lebenslauf 106

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit 108

Abkürzungsverzeichnis

Aβ	β-Amyloid-Peptid
ABCA1	ATP Binding Casette Transporter A1
ACAT	Acyl-CoA: Cholesterol-Acyltransferase
AK	Antikörper
α_2M*	aktiviertes α_2-Makroglobulin
AP1	Adaptor-related Protein 1 (Golgi-Marker)
Apo	Apolipoprotein
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2 (LRP8)
APP	Amyloid Precursor Protein
ATP	Adenosintriphosphat
β-HMG-CoA	β-Hydoxy-β-Methylglutaryl-Coenzym A
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
CE	Cholesterolester
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
Chol	Cholesterol
CM	Chylomikronen
CoA	Coenzym A
CR	Chylomikronen-Remnants
CS	Coverslip
CYP	Cytochrom P450
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EEA1	Early Endosomal Antigen 1
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAO	Hepatomzelllinie (Ratte)
FCS	fötales Rinderserum

FFA	freie Fettsäuren
FSC	Forward Scatter
GSTα	Glutathion-S-Transferase α
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDL	High Density Lipoprotein
HDL_E	mit ApoE angereicherte HDL
HL	hepatische Lipase
HSPG	Heperansulfatproteoglykan
HuH7	Hepatomzelllinie (human)
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IMF	Immunfluoreszenz
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insuline Receptor Substrate
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L	Liter
LCAT	Lecithin: Cholesterol-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	Low Density Lipoprotein-Rezeptor
LpL	Lipoproteinlipase
LRP1	LDL Receptor-related Protein 1
LSM	Laserscanning-Mikroskopie
min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
MTTP	Microsomal Triglyceride Transfer Protein
NC	Nitrocellulose
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline

PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PDK	Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase
PFA	Paraformaldehyd
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PL	Phospholipid
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PPD	p-Phenylendiamin
RAP	Receptor-associated Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S6K	S6-Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SR-B1	Scavenger Receptor Class B Type 1
SSC	Side Scatter
TG	Triacylglyzerol
TGFβ	Transforming Growth Factor β
tPA	tissue-type Plasminogen Aktivator
TRL	triglyzeridreiche Lipoproteine
ü.N.	über Nacht
uPA	urokinase-type Plasminogen Aktivator
V	Volt
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VLDLR	Very Low Density Lipoprotein-Rezeptor
ZNS	zentrales Nervensystem
ZO-1	Zona Occludens Marker 1

Weitere Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
etc.	et cetera
Kap.	Kapitel
o.g.	oben genannt
S.	Seite
s.o.	siehe oben
sog.	so genanntes
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Für die Untersuchung des hepatischen Lipoproteinstoffwechsels dienen als *in vitro*-Modelle verschiedene Zellsysteme. Um die vielfältigen Nachteile einer Primärkultur zu umgehen, kommen dabei in aller Regel Hepatomzelllinien zum Einsatz. Neben einer im Vergleich zur Primärkultur einfachen Präparation und guten Kultivierbarkeit bieten Hepatomzelllinien den Vorteil, dass sie über eine lange Lebensdauer verfügen, sowie in Bezug auf ihr Verhalten im Zellverband eine hohe Homogenität aufweisen.

Mit der beobachteten Dedifferenzierung von Zelllinien gehen jedoch immer bestimmte Funktionsverluste einher, sodass Hepatomzelllinien funktionell nicht mehr in allen Punkten einem primären Hepatozyten entsprechen. Dieses führt dazu, dass bestimmte Hepatomzelllinien nur eingeschränkt verwendet werden können bzw. unterschiedliche Fragestellungen die Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme erfordern.

2002 wurde erstmals die humane Hepatomzelllinie HepaRG beschrieben, die sich unter Kulturbedingungen zu einem Phänotyp differenzieren ließ, der dem einer primären Hepatozytenkultur stark ähnelte. Die differenzierte Zelllinie ließ sich mit einem Hepatits-B-Virus (HBV) infizieren (Gripon et al. 2002), eine Infektion, die wegen ihrer Komplexität bestimmte, für Hepatozyten spezifische, intrazelluläre Prozesse voraussetzt. Diese Beobachtung gab zusammen mit weiteren Eigenschaften Anlass zu der Vermutung, dass sich diese differenzierte Zelllinie als Modell nutzen lässt, das dem einer primären Hepatozytenkultur stärker ähnelt als andere, bereits etablierte Hepatomzelllinien.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die humane Hepatomzelllinie HepaRG für Fragestellungen, die im Rahmen des Lipoproteinstoffwechsels auftreten, näher zu charakterisieren. Aufgrund der Komplexität dieses Themenbereichs sollen dabei Aspekte rund um das Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1), einem im Rahmen des Lipoproteinstoffwechsels essenziellen Proteins, im Fokus stehen.

2 Einleitung

2.1 Lipoproteinstoffwechsel

Neben Proteinen und Kohlenhydraten stellen Lipide die dritte Klasse energiereicher Substanzen im menschlichen Körper dar. Die Stoffgruppe der Lipide umfasst dabei neben den amphiphilen Fettsäuren, Phospholipiden (PL) und freiem Cholesterol (Chol) apolare Substanzen wie Cholesterolester (CE) und Triacylglyzerole (TG). Neben der Bereitstellung von Energie erfüllen Lipide weitere Aufgaben im Stoffwechsel. Die 60-100 g Nahrungsfett, die wir täglich zu uns nehmen, werden zusätzlich zur Synthese essentieller Bestandteile biologischer Membranen, als Grundgerüst bei der Vitamin- und Steroidhormonsynthese und zur Produktion von Gallensäuren benötigt.

Während kurzkettige Fettsäuren in der Blutbahn vorwiegend an Albumin gebunden transportiert werden, sind für einige lipophile Hormone und Vitamine spezielle Transportproteine bekannt. Für die übrigen, relativ wasserunlöslichen Lipide, sind spezielle Mechanismen für die Passage im Blutstrom notwendig: Sie bilden zusammen mit einem spezifischen Proteinanteil, den Apolipoproteinen, mizellare Komplexe, die sogenannten Lipoproteine.

2.1.1 Übersicht über die verschiedenen Lipoproteinklassen und ihre Apolipoproteine

Lipoproteine ermöglichen Mikroemulsionen: In ihrem Inneren werden apolare Stoffgruppen wie TG und CE, die überwiegende Transportform von Cholesterol, sowie lipophile Vitamine transportiert. In die Oberfläche von Lipoproteinen sind amphiphil gebaute Apolipoproteine (Apo) eingelagert, die zusammen mit den hydrophilen Kopfgruppen der umhüllenden Phospholipide die Wasserlöslichkeit dieser Partikel vermitteln. Neben einer strukturell stabilisierenden Funktion kommt den Apolipoproteinen maßgeblicher Anteil am Stoffwechsel der Lipide zu. Sie dienen sowohl der Interaktion mit verschiedenen Oberflächenproteinen als auch als Kofaktoren für einige, in den Lipoproteinstoffwechsel eingebundener Enzyme (Übersicht bei Mahley et al. 1984).

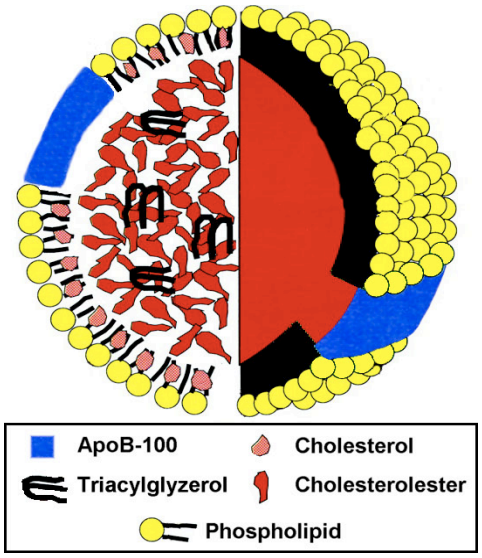

Abb. 2-1: Lipoproteinpartikel (LDL)

Schematische Darstellung eines Lipoproteins, hier am Beispiel von LDL. Der hydrophobe Kern enthält v.a. CE und TG. In die Hülle, die aus freiem Cholesterol sowie PL besteht, ist ein Molekül ApoB100 eingelagert.

(Modifiziert nach Segrest et al. 2001)

Nach Ultrazentrifugation in einem Dichtegradienten trennen sich Lipoproteine in verschiedene Fraktionen auf, was die Grundlage für ihre Einteilung in verschiedene Klassen bildet. Entscheidend für die Dichte der Lipoproteinkomplexe ist dabei das relative Verhältnis von Proteinanteil zu Lipidanteil (Durstine und Haskell 1994), welches positiv mit der Dichte und invers mit der Größe der Lipoproteinpartikel korreliert. Anhand zunehmender Dichten lassen sich Chylomikronen (CM), Chylomikronen-Remnants (CR), Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL), Lipoproteine intermediärer Dichte (IDL), Lipoproteine geringer Dichte (LDL) und Lipoproteine hoher Dichte (HDL) unterscheiden. Einen Überblick über die Lipidzusammensetzung sowie die Verteilung der Apolipoproteine auf den jeweiligen Lipoproteinklassen gibt Tabelle 1:

Lipoprotein	Dichte [g/ml]	Chol [%]	TAG [%]	Lipidanteil [%]	Proteinanteil [%]	Apolipo-proteine
Chylomikronen	<0,960	4	88	98-99	1	ApoB48
VLDL	0,960-1,006	23	56	90-93	8	ApoB100 ApoC
IDL	1,006-1,019	43	29	89	11	ApoB100 ApoC ApoE
LDL	1,019-1,063	58	13	79	21	ApoB100
HDL	1,063-1,21	35-41	13-16	43-67	33-57	ApoAI ApoC ApoE

Tabelle 1: Zusammensetzung der verschiedenen Lipoproteinklassen

(Modifiziert nach Biggerstaff und Wooten 2004)

Apolipoproteine stellen eine heterogene Gruppe von Plasmaproteinen dar, die sich grob in zwei Gruppen unterteilen lassen. Die erste Gruppe besteht aus den relativ kleinmolekularen (ca. 5 bis 50 kDa) Apolipoproteinfamilien ApoA, ApoC und ApoE und enthält viele amphiphatische α-Helices. Innerhalb dieser Gruppe können die Apolipoproteine intravaskulär zwischen den einzelnen Lipoproteinen ausgetauscht werden.

Die zweite Gruppe bilden die mit einem Molekulargewicht von bis zu 550 kDa (Segrest et al. 2001) wesentlich größeren Strukturapolipoproteine. Hierzu zählen ApoB48 und ApoB100. ApoB ist ein großes, amphiphatisches Protein (Segrest et al. 2001), das in zwei Varianten, als ApoB100 und ApoB48 vorkommt. ApoB48 besteht dabei aus den N-terminalen 48% von ApoB100.

Beide Varianten werden vom gleichen Gen transkribiert, allerdings entsteht ApoB48 im menschlichen Organismus lediglich in den Mukosazellen des Dünndarms durch sog. mRNA-Editing. Durch die Desaminierung eines Cytosylrestes in Codon 2152 (CAA) durch das Enzym Cytidin-Desaminase wird in die ApoB-mRNA ein Stoppcodon (UAA) eingefügt, was zu einem Syntheseabbruch führt.

Die Tertiärstruktur von ApoB besteht aus großen, antiparallel verlaufenden β-Faltblattstrukturen, die für eine feste Assoziation mit dem Lipidkern verantwortlich gemacht werden (Segrest et al. 2001). Wahrscheinlich ist diese feste Assoziation auch der Grund dafür, dass ApoB nicht zwischen den einzelnen Lipoproteinfraktionen ausgetauscht werden kann. Während ApoB48 auf CM und CR zu finden ist, bildet ApoB100 das Proteingerüst für die in der Leber synthetisierten VLDL und die daraus entstehenden IDL und LDL (Kane 1983).

Die ApoA-Proteine stellen den überwiegenden Proteinanteil der HDL-Fraktion dar, wobei ApoAI als Strukturprotein dient. HDL sind maßgeblich am Transport von extrahepatischem Cholesterol zurück zur Leber beteiligt. Da die Leber das einzige Organ im menschlichen Körper ist, das über die Synthese von Gallensäuren größere Mengen an Cholesterol aus dem Körper eliminieren kann, wird dem reversen Cholesteroltransport zurück zur Leber eine atheroprotektive Wirkung zugesprochen.

Aufgrund der Tatsache, dass ApoB auf allen potenziell atherogenen Lipoproteinfraktionen zu finden ist, ApoAI dagegen die Hauptproteinkomponente der atheroprotektiven HDL-Fraktion darstellt, wird dem ApoB/ApoAI-Index und seiner thera-

peutischen Modifikation eine zunehmend höhere Bedeutung für die Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen zugeschrieben (Walldius und Jungner 2006).

Für einen gerichteten Cholesteroltransport zurück zur Leber wird ApoAI in Form lipidarmer HDL-Vorläufermoleküle sezerniert, welche anschließend im Plasma zu reifen HDL-Partikeln lipidiert werden. Maßgeblich an diesem Prozess beteiligt ist der *ATP Binding Cassette Transporter A1* (ABCA1), der in der Leber sowie in Makrophagen den Transport von Cholesterol aus den Zellen in Richtung der HDL vermittelt. Des Weiteren wird ApoAI in Mukosazellen des Dünndarms gebildet, wo es an Chylomikronen assoziiert und intravasal auf HDL übertragen wird. Eine weitere Funktion kommt ApoAI als Aktivator des Enzyms *Lecithin: Cholesterol-Acyltransferase* (LCAT) zu, welches durch die Veresterung von Cholesterol eine konzentrierte Speicherung von Cholesterol im Inneren der HDL ermöglicht.

Erst 2001 wurde ein weiteres Apolipoprotein dieser Familie entdeckt: ApoAV (Pennacchio et al. 2001; van der Vliet et al. 2001). Ein Defekt dieses Apolipoproteins konnte mit der Entstehung einer familiären Hypertriglyzeridämie in Verbindung gebracht werden (Marçais et al. 2005). Diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Funktion von ApoAV als Inhibitor der hepatischen VLDL-Synthese (Weinberg et al. 2003; Beckstead et al. 2003; Olofsson 2005). Zudem wird postuliert, ApoAV beschleunige die intravasale Triglyzerid-Hydrolyse durch Aktivierung der Lipoproteinlipase (LpL) (Fruchart-Najib et al. 2004; Merkel und Heeren 2005; Schaap et al. 2004).

Um ihre größtmögliche Aktivität zu entwickeln, benötigt die LpL ApoCII und möglicherweise ApoAV als Kofaktoren (Bengtsson und Olivecrona 1981; Merkel et al. 2005).

Die LpL ist eine Serinesterase und gehört ebenso wie die Pankreaslipase oder die hepatische Lipase (HL) zur Familie der Triglyzeridlipasen. Als Dimer liegt die LpL gebunden an Heperansulfatproteoglykane (HSPG) der endothelialen Matrix v.a. im Fettgewebe, dem Herzen und der Muskulatur vor. Hier katalysiert sie die schnelle Hydrolyse triglyzeridreicher Lipoproteine (TRL), wie die der CM zu CR bzw. VLDL zu LDL. Ferner dient die LpL als Ligand für LRP1 und ist somit an der Aufnahme zirkulierender CR in die Zellen beteiligt (Beisiegel et al. 1991).

Die ApoC-Apolipoproteine wirken in ihrer Gesamtheit modulierend auf den Lipoproteinstoffwechsel ein. Dabei zeigen ApoCI und ApoCIII eine antagonistische Wir-

kung zu ApoCII. Während ApoCII als essentieller Kofaktor der LpL einen positiven Effekt auf die Hydrolyse triglyzeridreicher Lipoproteine hat, wirken ApoCI und ApoCIII inhibierend auf die Aktivität der LpL (Brown und Baginsky 1972; Havel et al. 1973). Alle ApoC-Proteine sind zudem in der Lage, die Bindung von ApoE-angereicherten Lipoproteinen an Lipoproteinrezeptoren zu inhibieren (Kowal et al. 1990; Weisgraber et al. 1990).

Während der Metabolisierung von Lipoproteinen wird ein ständiger Austausch von Apolipoproteinen zwischen den einzelnen Lipoproteinfraktionen beobachtet. Vermutlich ist dieses auf einen diffusionsgesteuerten Prozess zwischen Lipoproteinen zurückzuführen. Für den Transport von CE und PL sind dagegen eigenständige Enzyme verantwortlich: Das Cholesterolester-Transferprotein (CETP) bzw. das Phospholipid-Transferprotein (PLTP). ApoCI wird in diesem Zusammenhang eine inhibierende Wirkung auf das CETP (Sparks und Pritchard 1989) sowie eine Aktivierung der LCAT (Albers et al. 1979) zugesprochen. ApoCIII gilt dagegen als Inhibitor der HL (Landis et al. 1987).

Neben der LpL (s.o.) fungiert auch ApoE als Ligand für LRP1 (Beisiegel et al. 1989) und den LDL-Rezeptor (LDLR). Für ApoE lassen sich die verschiedenen Isoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4 unterscheiden. Die Verteilung der entsprechenden Allele im humanen Genom wird mit 9% (ε2), 74% (ε3) und 17% (ε4) angegeben (Zannis et al. 1982). Das ε3-Allel gilt dabei als Wildtyp. Alle drei Isoformen unterscheiden sich lediglich durch die Aminosäuren an Position 112 und 158 (Weisgraber et al. 1981). Während ApoE2 hier zwei Cysteinylreste aufzeigt, besitzt ApoE4 an diesen Stellen zwei Arginylreste. ApoE3 hat an Position 112 einen Cysteinyl- und an Position 158 einen Arginylrest (Weisgraber et al. 1981). Zwischen den einzelnen ApoE-Isoformen ergeben sich dabei unterschiedliche Affinitäten zum LDLR, insbesondere ApoE2 bindet den LDLR praktisch nicht. Eine zusätzliche pathophysiologische Relevanz besitzt ApoE4, da es mit der Entstehung der neurodegenerativen Alzheimer-Erkrankung assoziiert ist (Mahley et al. 2006). So konnte gezeigt werden, dass der Prozentsatz der homozygoten ε4-Genträger unter Alzheimer-Patienten gegenüber der Normalbevölkerung stark erhöht ist (Depboylu et al. 2006).

Der Lipoproteinstoffwechsel lässt sich in drei Abschnitte unterteilen. Der erste Abschnitt umfasst den postprandialen Weg der Nahrungsfette, die unter Umgehung des enterohepatischen Kreislaufs in Form der CM zu Muskel- und Fettgewebe transportiert werden. Der Lipidkern der CM wird im Kapillarbett durch das endothelständige Enzym LpL hydrolysiert und die aus TG entstandenen freien Fettsäuren (FFA) können über Fettsäuretransporter von den jeweiligen Zellen aufgenommen werden. Die aus der Hydrolyse hervorgehenden CR werden anschließend von der Leber LRP1-vermittelt aufgenommen. Der zweite Abschnitt - der endogene Lipoproteinstoffwechsel - beginnt in der Leber mit der Synthese triglyzeridreicher Lipoproteine (VLDL), die anschließend in extrahepatische Gewebe transportiert werden. Diese werden analog des exogenen Lipoproteinstoffwechsels durch zunehmende Delipidierung mittels LpL über die Zwischenstufe der IDL zu LDL. Im dritten Abschnitt wird mittels HDL überschüssiges Cholesterol aus der Peripherie zurück zur Leber geführt, da die Leber das einzige Organ im menschlichen Körper ist, das größere Mengen an Cholesterol zu Gallensäuren umwandeln und ausscheiden kann.

2.1.2 Exogener Lipoproteinstoffwechsel

Die mit der Nahrung zugeführten Lipide müssen zunächst im wässrigen Milieu des Chymus emulgiert werden, woran neben Lysophospholipiden auch durch die Darmmotilität hervorgerufene Scherkräfte beteiligt sind. Die frühzeitige Hydrolyse der Emulsionspartikel wird durch eine säurestabile Lipase vermittelt, die sowohl von Zungengrunddrüsen, als auch aus den Hauptzellen der Magenmukosa sezerniert wird. Die hydrolytisch abgespalteten, langkettigen Fettsäuren stellen einen adäquaten Reiz für die Cholezystokininfreisetzung dar. Dieses Hormon, welches von den I-Zellen des Duodenums und Jejunums gebildet wird, führt zu einer Stimulation der exogenen Pankreassekretion und bewirkt eine Kontraktion der Gallenblasenmuskulatur.
Die hydrolytische Spaltung der Nahrungslipide, die von der pankreatischen Lipase, Colipase, Phospholipase A2 und Cholesterinesterase vorangetrieben wird, führt zusammen mit sezernierten Gallensäuren zur Entstehung amphiphiler Mizellen. Anschließend können Enterozyten einzelne Bestandteile der Mizellen aufnehmen,

nachdem diese bei Kontakt mit der Enterozytenmembran zerfallen und ihre Bestandteile freisetzen. Kurz- und mittelkettige Fettsäuren gelangen dabei durch die Enterozyten direkt in den Blutstrom, wo sie an Serumalbumin gebunden und transportiert werden. Langkettige Fettsäuren, Monoacylglyzeride, Cholesterol und Lysophospholipide erfahren im glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) der Enterozyten eine Resynthese zu TG, CE und PL. Sie werden anschließend in Form von CM und zu einem geringen Teil auch in Form von ApoB48-VLDL, welche interdigestiv von den Mukosazellen gebildet werden, gespeichert. Eine wichtige Rolle nimmt hierbei das *microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP) ein, welches die Anlagerung von Lipiden an ApoB48 vermittelt (Ingram und Shelness 1997). Bevor die CM den Enterozyten durch Exozytose an der basolateralen Zellseite verlassen, werden sie zusätzlich zu ApoB48 mit ApoAI und ApoAIV angereichert.

Nach dem Übertritt in den interstitiellen Raum gelangen die CM unter Umgehung des enterohepatischen Kreislaufs in das Lymphsystem, wo sie über den *Ductus thoracicus* in den linken Venenwinkel münden. Sie stehen so zunächst v.a. der Muskulatur und den Fettzellen zur Verfügung. Katalysiert durch die LpL werden TG aus dem Lipidkern hydrolysiert und über Fettsäuretransporter in die jeweilige Zielzelle aufgenommen. Hier dienen sie im Rahmen der β-Oxidation entweder der Energiegewinnung (v.a. Herz- und Skelettmuskulatur), oder werden durch das Enzym *Acyl-CoA: Cholesterol-Acyltransferase* (ACAT) erneut verestert, um Speicherfett zu bilden. Durch die fortschreitende Hydrolyse der CM mittels LpL entstehen kleinere, cholesterolreiche CR, die schließlich die Leber erreichen. Bei der Umwandlung von CM zu CR findet neben dem Austausch von Lipiden auch ein Austausch verschiedener Apolipoproteine statt, der vermutlich durch einen diffusionsgesteuerten Prozess zwischen den Oberflächen verschiedener Lipoproteine vermittelt wird. CM übernehmen die Apolipoproteine ApoCI, ApoCII, ApoCIII und ApoE von zirkulierenden HDL-Partikeln. Von besonderer Bedeutung ist hierbei ApoCII, da es als Kofaktor für die LpL fungiert. Des Weiteren findet ein Austausch von PL gegen CE statt, wofür das PL- bzw. CETP verantwortlich ist. Am Ende des Transformationsprozesses stehen CR, die neben TG und PL die Apolipoproteine ApoAI, AII und AIV abgegeben haben und stattdessen mit CE sowie ApoCI, CII, CIII und ApoE aus der HDL-Fraktion angereichert wurden.

In den Kapillaren der Leber sorgt ein fenestriertes Endothel dafür, dass lediglich die kleineren CR den *Dissé*-Raum erreichen, während die größeren CM zurückgehalten werden. In diesem HSPG und ApoE reichen Milieu (Hamilton et al. 1990; Stow et al. 1985) binden CR via ApoE an HSPG (Mahley 1996) und werden nach einer weiteren Prozessierung, an der auch die HL beteiligt ist, sowie einer zusätzlichen Anreicherung mit ApoE (Mahley und Ji 1999) endozytotisch über den LDLR und LRP1 aufgenommen. ApoE trägt dabei maßgeblich zu einer gesteigerten Affinität der CR zum LDLR und zu LRP1 bei (Florén et al. 1981; Beisiegel et al. 1989). Bezüglich LRP1 gilt dies auch für die LpL, die nach der Hydrolyse weiter an CR assoziiert bleiben kann (Felts et al. 1975; Beisiegel et al. 1991, Zambon et al. 1996; Heeren et al. 2002).

Nach Internalisierung der CR-Partikel stellt sich deren intrazellulärer Degradationsprozess weit komplexer dar, als das für LDL der Fall ist. Während LDL den klassischen lysosomalen Degradierungsweg einschlagen (Brown und Goldstein 1986), desintegrieren CR zunächst in peripheren *sorting endosomes*. Der Lipidkern und ApoB48 werden lysosomal degradiert, ApoC, ApoE, LpL sowie eine Restmenge Lipid, die hauptsächlich aus Cholesterol und Phospholipiden besteht, werden in Form von sog. *surface remnants* recycelt (Heeren et al. 1999 und 2001). Die Beobachtung, dass ein Großteil des TRL-ApoE und LpL von Hepatozyten resezerniert wird und anschließend in der Lipoproteinfraktion der HDL wiederzufinden ist (Heeren et al.1999 und 2001), stellt eine Verbindung zwischen dem exogenen mit dem HDL-Lipoproteinstoffwechsel her. Es wird davon ausgegangen, dass intrazellulär HDL mit ApoE/Cholesterolhaltigen *surface remnants* fusioniert und auf diese Weise zu einem Cholesterolefflux in Form von ApoE-reichen HDL (HDL_E) führt (Heeren et al. 2003). Maßgeblich daran beteiligt ist der ABCA1. Vermutlich über die Bindung an ApoAI entlässt er discoidale, naszierende HDL-Partikel und damit auch Cholesterol aus der Zelle (Vedhachalam et al. 2007). Die auf diese Weise in der postprandialen Phase in den Blutstrom entlassenen HDL_E gewährleisten so einen Nachschub an HDL-abgeleitetem ApoE, welches nun erneut mit CM assozieren kann.

In einem Mausmodell (Véniant et al. 1998) konnte gezeigt werden, dass LRP1 der entscheidende Rezeptor bei der postprandialen Aufnahme von ApoB48-Remnants ist, während er keine signifikante Rolle bei der Aufnahme von ApoB100-

Lipoproteinen zu haben scheint. Diese Beobachtung deckt sich mit der Tatsache, dass Patienten mit einem absoluten LDLR-Defekt einen normalen CR-Metabolismus zeigen (Brown und Goldstein 1983) und unterstreicht die Bedeutung dieses Proteins im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel.

Für das experimentelle Vorgehen im Rahmen dieser Arbeit sind dabei Erkenntnisse bezüglich Lokalisation und Eigenschaften von LRP1 in anderen Zellmodellen von Bedeutung (Laatsch 2005). So stellt sich LRP1 in perinukleären, vesikulären Strukturen dar, die insulinabhängig an die Plasmamembran translozieren. Da dies bislang noch in keiner humanen Hepatomzelllinie gezeigt werden konnte, könnte das HepaRG-Zellmodell diesbezüglich helfen die postprandialen, physiologischen Abläufe noch genauer zu verstehen. Hierbei spielen die molekularen Signaltransduktionswege des Insulinsignals eine entscheidende Rolle.

Die bisher bekannten Details der Insulinsignaltransduktion sind folgendermaßen beschrieben: Zunächst bindet Insulin an den Insulinrezeptor (IR), welcher ubiquitär exprimiert wird und aus zwei extrazellulären α- und zwei hauptsächlich intrazellulären β-Untereinheiten besteht (McKern et al. 2006). Durch die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor kommt es zu einer Autophosphorylierung des IR, was wiederum zur Bindung verschiedenster *scaffold proteins*, u.a. der Proteine der *insulin receptor substrates* (IRS)-Familie führt (Cohen 2006; Taniguchi et al. 2006). Die Phosphorylierung dieser *scaffold proteins* durch den IR initiiert dabei eine Reihe unterschiedlicher Signaltransduktionswege, die die verschiedenen metabolischen Effekte von Insulin induzieren. Die Vielfalt dieser Signaltransduktionswege erklärt dabei die Fülle von Einzelwirkungen, die Insulin in den verschiedenen Geweben des Körpers ausübt. Aus der IRS-Familie sind die Proteine IRS-1 und IRS-2 am weitesten verbreitet (White et al. 1985). Während IRS-1 für die insulinstimulierte Glukoseaufnahme und die Aktivierung anaboler Stoffwechselwege in der Muskulatur und dem Fettgewebe verantwortlich ist, werden die anabolischen Effekte in der Leber durch IRS-2 vermittelt (Muoio und Newgard 2008). Die weiteren intrazellulären Prozesse sind äußerst vielfältig. Unter anderem kommt es - vermittelt durch intrazelluläre Adapterproteine - zu einer Anreicherung des *second messengers* Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). PIP3 leitet wiederum Signalwege durch Bindung an die *phosphoinositide dependent protein kinase 1* und *2* (PDK1 und PDK2) sowie an

Akt/Proteinkinase B (PKB) ein. Die PKB ist anschließend als phosphorylierendes Agens an der Regulation verschiedener Enzyme beteiligt.
Neben den IRS-Proteinen sind also v.a. PI3K und Akt/PKB an der Signaltransduktion von Insulin beteiligt und zusätzlich maßgeblich in Zellwachstum, Teilung und Differenzierung involviert (Mamane et al. 2006).
Die oben beschriebende Signaltransduktionskaskade führt unter anderem zur Beeinflussung der mRNA-Translation. Die Aktivierung der Akt/PKB führt durch die Phosphorylierung mehrerer Proteine - unter anderem des ribosomalen Proteins S6 via S6-Kinase (S6K) - zur Zusammenlagerung des Translationsinitiationskomplexes (Mamane et al. 2006).
Eine Dysregulation der beteiligten Proteine, insbesondere in den Mitgliedern der IRS-Familie, PI3K und von Akt/PKB kann somit ein gesteigertes Zellwachstum zur Folge haben und möglicherweise eine onkogene Transformation begünstigen. Darüber hinaus sind Insulinwirkungen bekannt, die, zum Beispiel über die Beeinflussung von Kontrollmechanismen der zellulären Integrität wie Apoptose und DNA-Reparatur (Cheng et al. 2005), einen Zusammenhang zwischen Insulin und der onkogenen Transformation einzelner Zellen herstellen.

2.1.3 Endogener Lipoproteinstoffwechsel

Im Hungerzustand dient der endogene Lipoproteinstoffwechsel dazu, periphere Gewebe mit TG zur Energiegewinnung, Cholesterol für die Membranbiosynthese und Steroidhormonproduktion sowie mit lipophilen Vitaminen zu versorgen. Hierzu synthetisiert die Leber VLDL-Partikel. Ähnlich den CM erfahren VLDL im Kapillarbett peripherer Gewebe eine Hydrolyse durch die LpL. Die so entstandenen Remnant-Partikel (IDL) können anschließend wieder in die Leber aufgenommen werden oder durch fortschreitende Hydrolyse und Anreicherung mit CE durch das CETP zu LDL umgewandelt werden.
Die Entstehung der VLDL in der Leber ähnelt der CM-Synthese in den Enterozyten (Shelness und Sellers 2001), wobei VLDL als Hauptproteinkomponente ApoB100 enthalten. Nach der Lipidierung von ApoB100 durch das MTTP im ER des Hepatozyten erhalten VLDL-Partikel ApoE sowie kleine Mengen ApoC und werden anschließend exozytiert. Je nach Beladung der VLDL werden hier große, triglyzerid-

reichere $VLDL_1$ von kleineren, triglyzeridärmeren $VLDL_2$ unterschieden (Packard und Shepherd 1997).

In die Zirkulation gelangte VLDL nehmen im weiteren Verlauf ApoE sowie ApoC aus der HDL-Fraktion auf, übertragen PL mittels PLTP und erfahren eine Anreicherung mit CE via CETP durch eben diese HDL. Die durch die endothelständige LpL katalysierte Hydrolyse der VLDL führt zu einer Bereitstellung von FFA an die umliegenden Gewebe und es entstehen kleinere, ApoE- und cholesterolreiche Partikel, die VLDL-Remnants (IDL). Diese können nun entweder aufgrund ihres hohen ApoE-Gehalts via LDLR und LRP1 zurück in die Leber aufgenommen und abgebaut, oder weiter zu LDL hydrolysiert werden. Die LpL- und HL-vermittelte Umwandlung der Remnant-Partikel zu LDL erfolgt unter Verlust des ApoE und ApoC, welche zurück auf die HDL-Fraktion übertragen werden (Shachter 2001; Heeren et al. 2006), sowie einer weiteren CETP-vermittelten Cholesterolanreicherung.

Die entstandenen LDL besitzen unter physiologischen Bedingungen als einziges Apolipoprotein ApoB100, über das sie an den ubiquitär exprimierten LDLR binden können (Brown und Goldstein 1986). Auf diese Weise dienen sie insbesondere den extrahepatischen Zellen als Cholesteroldonatoren. Die Halbwertszeit der LDL-Partikel beträgt dabei ca. zwei Tage und ist so wesentlich länger als die der VLDL-Remants, die bereits nach wenigen Stunden abgebaut sind (Millar und Packard 1998). Der Grund hierfür liegt in einer - im Vergleich zu ApoB - gesteigerten Affinität von ApoE zum LDLR (Krul et al. 1985). ApoE tragende VLDL-Remnants können so wesentlich schneller aus der Zirkulation geklärt werden, als dass für LDL der Fall ist.

Erhöhte LDL-Plasmaspiegel sind maßgeblich an der Entstehung atherosklerotischer Läsionen beteiligt. Von allen Lipoproteinen sind neben HDL lediglich LDL - aufgrund ihrer geringen Molekülgröße sowie hohen Affinität zu Proteoglykanen - in der Lage, die Endothelschranke zu passieren. LDL können sich so proportional zu ihrer Blutkonzentration in den Gefäßwänden anreichern und nach Oxidation durch freie Radikale aus dem Endothel via *scavenger receptors* in Makrophagen aufgenommen werden. Bei einem Überangebot von LDL, bei gleichzeitigem HDL-Mangel, führen sie zu Ablagerungen von CE in den lysosomalen Verdauungsvakuolen der Makrophagen, die jetzt als Schaumzellen imponieren. Die Schaumzel-

len sterben im weiteren Verlauf ab und markieren so die charakteristischen Veränderungen zu Beginn atherosklerotischer Läsionen.

2.1.4 Reverser Cholesteroltransport

Cholesterol kann bis auf geringe Mengen, die über Darmepithelien oder die Haut abgeschilfert werden, lediglich von der Leber aus dem menschlichen Organismus entfernt werden. Intrazelluläres Cholesterol ist zwar in der Lage die eigene Synthese (durch Hemmung des Schlüsselenzyms seiner eigenen Biosynthese: β-Hydoxy-β-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase) zu hemmen und über eine Verminderung der LDLR-Expression auf der Zellmembran seine eigene Aufnahme zu regulieren. Dennoch können pathologisch erhöhte Serum-Cholesterolspiegel zu einer Überladung der Zelle mit Cholesterol führen, was zytotoxisch wirken kann (Leake und Peters 1982; Sevanian und Peterson 1986).
Aus diesem Grund nimmt der reverse Cholesteroltransport im menschlichen Organismus eine wichtige Stellung ein. Er ermöglicht den Rücktransport überschüssigen Cholesterols in Form von HDL aus peripheren Geweben zurück zur Leber, wo es in Gallensäuren umgesetzt und eliminiert werden kann. Da Gallensäuren, wie andere zunächst sezernierte Substanzen auch, im enterohepatischen Kreislauf bei Bedarf rückresorbiert werden können, kommt dem enterohepatischen Kreislauf eine Speicherfunktion für Cholesterol und andere physiologische Substanzen zu. Die Synthese von HDL-Partikeln ist komplex. Sie beginnt mit einer Lipidierung von ApoAI, dem Hauptstrukturprotein der HDL, via ABCA1 (Fitzgerald et al. 2004). Die naszierenden, diskoidalen HDL-Partikel enthalten außerdem die Apolipoproteine AII, AIV und E und sind im weiteren Verlauf in der Lage, peripher gelagertes, freies Cholesterol aufzunehmen und zu verestern. Die Veresterung geschieht durch die LCAT, mit ApoAI als Kofaktor (Fielding und Fielding 1980; Phillips et al.,1998).
CE werden entweder direkt von HDL-Partikeln zur Leber transportiert, wo sie über den *Scavenger Receptor Class B Type I* (SR-BI) selektiv aufgenommen werden (Krieger 2001). Alternativ werden sie mittels CETP von HDL auf ApoB-haltige Lipoproteine übertragen und gelangen so über LDLR- bzw. LRP1-vermittelte Endozytose zurück zur Leber.

Eine schematische Übersicht des Lipoproteinstoffwechels ist in Abb. 2-2 dargestellt:

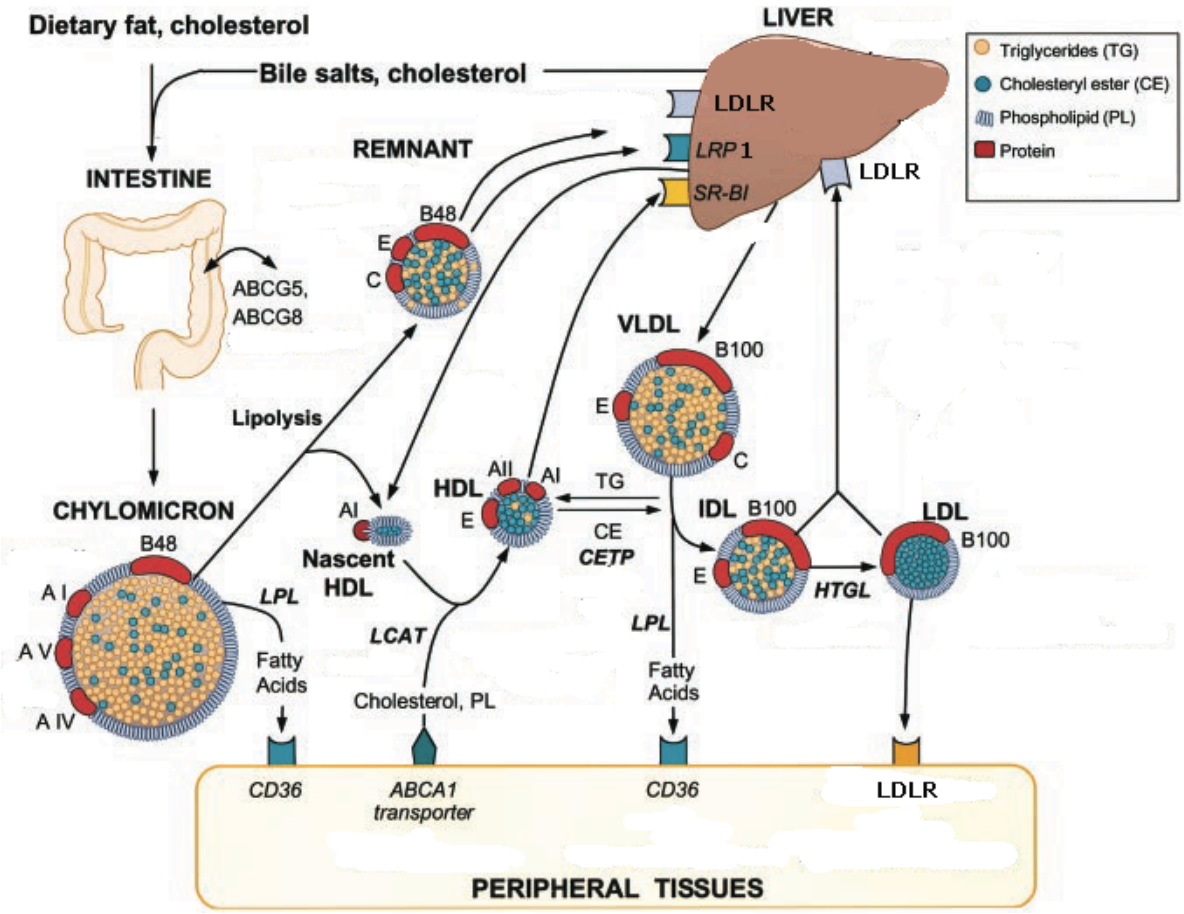

Abb. 2-2: Übersicht über den Lipoproteinstoffwechsel

Mit der Nahrung aufgenommene Lipide gelangen zunächst in Form von CM in den Blutkreislauf. Durch das endothelständige Enzym LpL werden deren energiereiche Bestandteile hydrolysiert und stehen so peripheren Geweben zur Verfügung. Die resultierenden CR werden anschließend über Lipoproteinrezeptoren in die Leber aufgenommen und abgebaut. Endogen synthetisierte Lipide werden von der Leber in Form von VLDL sezerniert und erfahren in der Peripherie durch eine zunehmende Delipidierung eine Umwandlung zu LDL. Der reverse Cholesteroltransport dient dazu, peripheres Cholesterol in Form von HDL zurück zur Leber zu transportieren, wo es in Form von Gallensäuren aus dem Körper eliminiert werden kann.

(Modifiziert nach Lusis et al. 2004)

2.2 Low density liporotein receptor-related protein 1 und die LDL-Rezeptor Gen-Familie

Bei den Rezeptoren der LDLR-Gen-Familie handelt es sich um mindestens sieben strukturell eng miteinander verwandte Membranrezeptoren. Ihre Bezeichnung leitet sich von dem zuerst entdeckten und noch immer am bekanntesten Mitglied, dem LDL-Rezeptor, ab (May 2006). Neben dem LDLR selbst sind LRP1, LRP1b, Megalin/LRP2, VLDL-Rezeptor (VLDLR), MEGF7/LRP4 und Apolipoprotein E-Rezeptor 2 (ApoER2)/LRP8 zu dieser Familie zu rechnen (May et al. 2007).

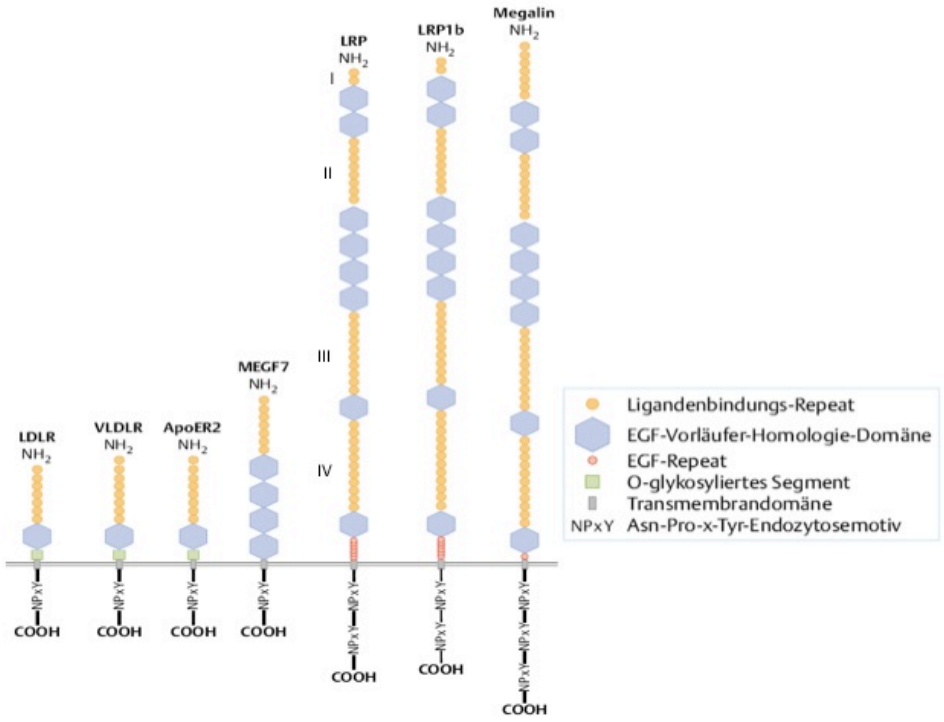

Abb. 2-3: Mitglieder der LDL-Rezeptor Gen-Familie

Teilweise unterscheiden sich die Mitglieder der LDL-Rezeptor Gen-Familie deutlich in ihrer Größe, sie weisen jedoch alle ähnliche Strukturmerkmale auf. Durch die vier Ligandenbindungs-Domänen (I-IV) von LRP1 ergibt sich eine weitaus größere Anzahl von möglichen Bindungspartner, als das z.B. für den LDLR der Fall ist.

(Modifiziert nach May 2006)

Das Hauptaufgabengebiet des LDLR liegt in der Regulierung der Cholesterolhomöostase. Mutationen des LDLR-Gens sind mit einer familiären Hypercholesterol-

ämie sowie dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert. Das Fehlen des LDLR führt dabei zu einer mangelhaften Eliminierung von LDL-Partikeln aus dem Blutstrom und daraus resultierenden, stark erhöhten Plasmacholesterolspiegeln. Folge ist ein erhöhtes Risiko für Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen.
Während sich die Rolle des LDL-Rezeptors mittels rezeptorvermittelter Endozytose auf die Cholesterolhomöostase zu beschränken scheint, übernehmen die übrigen Vertreter der Familie weitere, wichtige physiologische Aufgaben, die über die reine Endozytose extrazellulärer Partikel hinausreichen (May et al. 2007). Während MEGF7, LRP1, LRP1b und LRP2/Megalin eine Zwischenstellung zwischen Endozytose- und Signalrezeptoren einnehmen, besteht die Aufgabe des VLDLR und ApoER2 offenbar im Wesentlichen in der Regulation von zellulären Signalwegen. Endozytosevorgänge spielen für ihre Funktion eine untergeordnete Rolle. In *knockout*-Versuchen konnte demonstriert werden, dass ein Verlust dieser Rezeptoren keine oder allenfalls diskrete Fettstoffwechselveränderungen hervorruft (May 2006). Durch die Interaktion mit dem extrazellulären Signalmolekül Reelin sind ApoER2 und der VLDLR maßgeblich an der Gehirnentwicklung beteiligt. Ein gleichzeitiger Funktionsverlust beider Rezeptoren führt zu einem Verlust der normalen Schichtung der Großhirnrinde und des Hippocampus sowie zu einer Kleinhirndysplasie (May 2006).
LRP2/Megalin wird hauptsächlich in den proximalen Tubuluszellen der Niere exprimiert und ist maßgeblich in den Vitamin D-Stoffwechsel involviert, indem es Komplexe aus glomerulär filtriertem Vitamin D und Vitamin D-bindendem Protein rückresorbiert. Es verhindert zum einen den Verlust von Vitamin D, zum anderen begünstigt es die Entstehung des aktiven Metaboliten 1,25-Dihydroxycholecalciferol in der Niere. Exzessive Vitamin D-Ausscheidung mit allen nachfolgenden Zeichen des Vitaminmangels konnte bei einem Verlust von LRP2/Megalin im Tierversuch bestätigt werden (May et al. 2005). Neben Vitamin D werden auch Vitamin A und Vitamin B12 - jeweils gebunden an ihre Transportproteine - aus dem Glomerulumfiltrat mittels LRP2/Megalin rückresorbiert. Durch diese hohe Expression in der Niere lässt sich auch die Entdeckung von LRP2/Megalin als Antigen bei der Entstehung einer Heymann-Nephritis (Farquhar et al. 1994; Kerjaschki und Neale 1996; Christensen et al. 1998) erklären. Erst kürzlich wurde eine weitere Funktion von LRP2/Megalin im Rahmen des Hormonstoffwechsels

beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass LRP2/Megalin während der Entwicklung der männlichen und weiblichen Genitalorgane benötigt wird, um an Sexualhormon-bindendes-Globulin gebundene Androgene bzw. Östrogene aufzunehmen und so die Wirkung der Hormone zu ermöglichen (Hammes et al. 2005).
Während die Erforschung von LRP1b und MEGF7 noch am Anfang steht und wenig über ihre biologische Bedeutung bekannt ist, stellt sich das Aufgabengebiet von LRP1 als äußerst komplex dar.
LRP1 wurde 1988 erstmals von Herz et al. beschrieben und als zweites Mitglied der LDLR-Familie identifiziert. Es wurde zunächst als reiner Endozytoserezeptor deklariert, bis Gotthardt et al. intrazelluläre Bindungspartner von LRP1 identifizieren konnten, die in keinem Zusammenhang mit dem Endozytoseapparat standen (Gotthardt et al. 2000). Sie vermuteten daher eine Beteiligung von LRP1 an zellulären Signaltransduktionsprozessen. Ein weiterer Hinweis auf eine umfassendere Bedeutung von LRP1 war die beobachtete frühembryonale Letalität von LRP1-*knockout*-Mäusen (Herz et al. 1992), die aus dem alleinigen Verlust der Endozytoseaktivität von LRP1 nicht ausreichend erklärbar war.
Wie alle Mitglieder der LDLR-Familie besitzt auch LRP1 die typischen cysteinreichen Ligandenbindungs- und EGF-Vorläufer-Homologiedomänen auf der extrazellulären Membranseite, eine transmembranäre Domäne sowie einen zytoplasmatischen Abschnitt, der zwei NPxY-Motive beherbergt und als Interaktionsstelle für intrazelluläre Adapterproteine und den Endozytoseapparat zuständig ist (Li et al. 2000).
LRP1 stellt eines der größten bekannten Membranproteine dar. Posttranslational besteht es zunächst aus einer 600 kDa großen Einheit, die im weiteren Verlauf eine Prozessierung im Trans-Golgi-Kompartiment erfährt. Katalysiert durch die Protease Furin (Willnow et al. 1996a) enstehen dabei eine 85 kDa sowie eine 515 kDa Untereinheit. Die transmembranäre 85 kDa Untereinheit und die vollständig extrazellulär lokalisierte 515 kDa Untereinheit bleiben dabei nicht-kovalent miteinander verbunden. Eine weitere proteolytische Prozessierung - analog den Rezeptoren aus der Notch-Familie - kann offenbar zu einer Abspaltung der intrazellulären Domäne führen und ist möglicherweise an der Regulation von Transkriptionsvorgängen beteiligt. Zellkulturstudien legten nahe, dass das freie Fragment in den Zellkern translozieren und dort an der Regulation von Gentranskriptionsvorgängen be-

teiligt sein kann (May, 2006). Zudem kann die Spaltung von LRP1 eine Rolle bei der Modulation von Zelladhäsion und Migration spielen, die wiederum in *in vitro*-Experimenten als LRP1-abhängig beschrieben wurden (May et al. 2005). Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass LRP1 eine Bedeutung im Rahmen von malignem Wachstum bzw. Metastasierung durch die Beteiligung sowohl am Auf- bzw. Abbau von Zellverbindungen, als auch an der Migration von Zellen, zukommt (May, 2006).

Unter physiologischen Bedingungen wurde für die Funktionalität der beiden LRP1-Untereinheiten ein rezeptorassoziiertes Protein (RAP) beschrieben (Willnow et al. 1996b). Nachdem RAP innerhalb des ER an neusynthetisiertes LRP1 bindet (Bu et al. 1995), fungiert es als Chaperon und ist somit maßgeblich an der Faltung und Funktionalität von LRP1 beteiligt. Des Weiteren verhindert RAP die prämature Bindung von ebenfalls im ER synthetisierten LRP1-Liganden und beugt somit einer Komplexbildung vor (Bu und Rennke 1996). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen des RAP-Proteins zu einem massiven Expressionsverlust von LRP1 an der Zelloberfläche führt (Willnow et al. 1995). Aufgrund der spezifischen Bindung von RAP an LRP1 dient es - auch im Rahmen dieser Arbeit - häufig als Marker, um die Expression und Funktionalität von LRP1 zu überprüfen.

Während LRP1 anfangs lediglich eine Rolle im Lipoproteinstoffwechsel und bei der Endozytose von aktiviertem α2-Makroglobulin (α2M*) zugesprochen wurde, sind heute mehr als 40 verschiedene LRP1-Liganden bekannt. Die Vielfältigkeit dieser Liganden reicht dabei von den klassischen Lipoproteinen über Protease/Protease-Inhibitor-Komplexe, extrazelluläre Matrixproteine, Viren und einigen Wachstumsfaktoren bis hin zu Zytokinen (Krieger und Herz 1994; Herz und Strickland 2001). Eine Übersicht über die wichtigsten LRP1-Liganden gibt Tabelle 2:

Proteine des Lipoproteinmetabolismus	***Matrix-Proteine***
ApoE	Thrombospondin 1
Lipoproteinlipase	Thrombospondin 2
Hepatische Lipase	***Intrazelluläre Proteine***
β-VLDL	RAP
Sphingolipid-Aktivator-Protein	HIV Tat-Protein
Protease/Protease-Inhibitor-Komplexe	***Wachstumsfaktoren***
α2M*	Platelet-derived growth factor
uPA	Transforming growth factor β
tPA	
Matrixmetalloproteasen	***Andere***
Neuroserpin	Gentamicin
β-Amyloid-Vorläufer-Protein	Rhinovirus

Tabelle 2: Übersicht über die Liganden der extrazellulären Bindungsstellen von LRP1

(Modifiziert nach Lillis et al. 2005)

Wie genau LRP1 in der Lage ist, diese Vielzahl an strukturell unterschiedlichen Liganden zu binden, konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden. Es ließ sich jedoch zeigen, dass die beiden Bindungsstellen II und IV in gleicher Weise an der Bindung nahezu aller Liganden beteiligt sind. Für RAP konnte eine Bindung an jede der Bindungsstellen II bis IV nachgewiesen werden, wohingegen für Bindungsstelle I bislang kein Ligand identifiziert werden konnte (siehe Abb. 2-3).

LRP1 wird in annähernd allen Geweben exprimiert, wobei Leber, Lunge, Blutgefäße sowie das zentrale Nervensystem hervorzuheben sind. Klassischerweise als Endozytoserezeptor zirkulierender Remnant-Partikel beschrieben (Brown et al. 1991), sind heute weit vielfältigere Aufgaben von LRP1 bekannt. So stellt LRP1 z.B. einen wichtigen Regulator von proteolytischer Aktivität im extrazellulären Raum dar. Es konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Proteinase/Proteinase-Inhibitor-Komplexen eine wichtige Gruppe von Liganden für LRP1 darstellen. Neben α2M* sind hier v.a. die Serinproteinasen uPA, tPA und Matrixmetalloproteinasen (MMP) zu nennen (siehe Tab. 2). Aufgrund der Beobachtung, dass MMP eine wichtige Rolle auf dem Feld der Tumorprogression und Tu-

mormetastasierung einnehmen (Westermarck und Kähäri 1999), kommt auch LRP1 diesbezüglich eine wichtige Funktion zu. So scheint eine direkte Interaktion von LRP1 mit MMP-2, MMP-9 und MMP-13 (Barmina et al. 1999; Hahn-Dantona et al. 2001; Yang et al. 2001) die proteolytische Aktivität im extrazellulären Raum zu begrenzen und so maßgeblich einem unkontrollierten, invasiven Wachstum entgegenzuwirken. Gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass LRP1-Level in einigen Tumoren erheblich reduziert waren (Kancha et al. 1994).

Zudem werden LRP1 weitere Funktionen im Rahmen intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse zugeschrieben. So scheint LRP1 eine schützende Wirkung auf Gefäßwände zu haben. Boucher et al. zeigten 2003, dass ein Verlust von LRP1 in Zellen glatter Gefäßmuskeln zu einer stark hypertrophierten *Tunica media* und einer zerstörten *Tunica elastica* sowie einem erhöhten Atheroskleroserisiko führt. Gründe hierfür liegen vermutlich in einer direkten Interaktion zwischen LRP1 und dem *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Boucher et al. 2002; Loukinova et al. 2002), einem Wachstumsfaktor, der sowohl an der Proliferation als auch an der Migration von glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt ist. Des Weiteren konnte ein regulierender Einfluss von LRP1 auf die Expressionslevel vom PDGF-Rezeptor β auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Takayama et al. 2005). Ebenfalls eine Rolle für die pathologisch-proliferativen Gefäßveränderungen könnte die Tatsache spielen, dass LRP1 identisch mit dem *transforming growth factor* β (TGFβ)-Rezeptor V ist, der TGFβ stimuliert eine wachstumsinhibierende Wirkung vermittelt (Huang et al. 2003).

Weitere Aufgaben übernimmt LRP1 im zentralen Nervensystem (ZNS), wo es ubiquitär exprimiert vorliegt (Moestrup et al. 1992; Bu et al. 1994; Ishiguro et al. 1995). Neben einem Einfluss auf den zellulären Ca^{2+}-Einstrom über N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (Martin et al. 2008), ist LRP1 an der Endozytose einiger neuronaler Proteasen beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass bei Fehlen von LRP1 die Protease Neuroserpin in erhöhter synaptischer Konzentration vorliegt und zu synaptischen Dysfunktionen beitragen kann (Makarova et al. 2003). Durch seine Funktion als tPA-Rezeptor trägt LRP1 des Weiteren zur Langzeitprozessierung im Hippocampus bei, einem für die Gedächtnisbildung entscheidenden Prozess (Zhuo et al. 2000). Eine wichtige Rolle scheint LRP1 auch bei der Pathogenese der Alzheimer-Demenz zu spielen. Durch Interaktion mit dem in der Zellmembran vor-

kommenden Amyloid-Precursor-Proteins (APP) ist es an der Entstehung des aus APP hervorgehenden Amyloid-β-Peptids (Aβ) beteiligt. Die Ablagerung dieses Aβ in schwerlöslichen Fibrillen, den sog. amyloiden Plaques, ist ein histologisches Charakteristikum für die Alzheimer'sche Krankheit (Xia 2003).
Weitere Untersuchungen zu LRP1 ergaben eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke (Yepes et al. 2003), der Modulation der extrazellulären Matrix (Gaultier et al. 2006; Hu et al. 2006) sowie eine Beteiligung an der Phagozytose und Zytokinproduktion von Alveolarmakrophagen (Gardai et al. 2003). Auch an der Degradierung von Lipiden durch Aktivierung lysosomaler Enzyme ist LRP1 indirekt beteiligt.

2.3 Leberzellmodelle

Die Leber ist mit einem Gewicht von ca. 1,5 - 2 kg die größte Drüse des menschlichen Körpers. Neben ihrer Rolle als zentrales Stoffwechselorgan, das durch die Aufnahme, Abgabe oder Speicherung den Körper mit energiereichen Substanzen und Vitaminen versorgt, kommt der Leber eine herausragende Rolle bei der Synthese lebenswichtiger Proteine, wie z.B. den Gerinnungsfaktoren oder dem Albumin zugute. Darüber hinaus obliegt der Leber im Rahmen der Galleproduktion eine entgiftende Funktion, indem sie Stoffwechselabbauprodukte, Medikamente oder Giftstoffe in eine wasserlösliche Form überführt und aus dem Blutstrom eliminieren kann.
Neben ihren metabolischen Funktionen im Rahmen des Stoffwechsels stellen Äthiologie und Pathogenese von vielen Lebererkrankungen einen weiteren Forschungsschwerpunkt dar. Zur Klärung der verschiedensten wissenschaftlichen Fragestellungen rund um die Leber dienen dabei neben dem *in vivo*-Tiermodell verschiedenste *in vitro*-Techniken, wobei intakte Zellsysteme wie die explantierte, perfundierte Leber, Lebergewebsschnitte und die Isolierung einzelner Hepatozyten von immortalisierten Leberzelllinien oder genetisch veränderten Zellen, unterschieden werden (Guillouzo 1998). Alle genannten Modelle zeigen dabei verschiedenste Vor- bzw. Nachteile.
Die isolierte, perfundierte Leber stellt das *in vitro*-Modell dar, dass *in vivo*-Bedingungen am nächsten kommt (Guillouzo 1998). Neben der erhaltenen dreidi-

mensionalen Struktur ermöglicht es eine separate Analyse der Gallenflüssigkeit und lässt Rückschlüsse bezüglich haemodynamischer Fragestellungen zu (Conway et al. 1983). Dieses Modell wurde für Untersuchungen bezüglich chemisch- und medikamenteninduzierter Hepatotoxizität verwendet (Plaa 1993), hat aber den Nachteil, dass Funktionsverluste bereits nach wenigen (2-3) Stunden eintreten.
Die bei der Kultivierung von Leberschnitten erhaltene strukturelle Organisation des Organs ermöglicht es zwar Zell-Zell sowie Zell-Matrix-Interaktionen zu untersuchen, eine separate Analyse des Gallenflusses ist jedoch nicht mehr möglich. In Studien konnte gezeigt werden, dass diese Gewebsschnitte für zwei bis drei Tage eine metabolische Aktivität aufweisen (Vickers 1994; Beamand et al. 1993), dadurch in ihrer Verwendbarkeit also auch zeitlich limitiert sind.
Aufgrund der zeitlich begrenzten Verfügbarkeit dieser beiden Lebermodelle gelten heute neben primären, humanen und murinen Hepatozytenkulturen immortalisierte Hepatozyten als Basis für wissenschaftliche Fragestellungen rund um die Leber. Je nach Fragestellung weisen beide Zellsysteme ihre spezifsichen Limitierungen auf. Primäre Hepatozyten zeigen unter Kulturbedingungen eine hohe interexperimentelle Heterogenität bezüglich ihres Verhaltens im Zellverband. Phänotypische Abweichungen, begrenztes Wachstumsverhalten und ihre im Vergleich zu immortalisierten Zellen stark verkürzte Lebensdauer stellen dabei Aspekte dar, die für eine Verwendung von Hepatomzelllinien sprechen. Der für Hepatomzellen beobachtete Funktionsverlust von leberspezifischen Funktionen im Zuge der Entartung steht dem jedoch entgegen. Bis heute ist es nicht gelungen eine immortalisierte Leberzelllinie zu etablieren, die alle hepatozytenspezifischen Funktionen in sich vereint, weshalb unterschiedliche Fragestellungen die Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme erfordern.

2.4 HepaRG

2002 wurde von Gripon et al. erstmals die humane Hepatomzelllinie HepaRG beschrieben, die aus einem hepatozellulären Karzinom - bedingt durch eine chronische Hepatitis-C-Virusinfektion (HCV) - einer weiblichen Patientin isoliert werden konnte. Unter definierten Kulturbedingungen ließen sich diese Zellen anschließend in einen heterogenen Phänotyp transdifferenzieren, der neben hepatozytenähnlichen Zellen auch Gallengangsstrukturen aufzeigte. Neben einem insulin- und hydrocortisonhaltigen Medium war eine Exposition der Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) dabei entscheidend (Gripon et al. 2002). Sowohl DMSO, als auch Hydrocortison, sind bekannt dafür, eine zelldifferenzierende Wirkung zu haben (Santos et al. 2003). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die simultane Verwendung beider Stoffe einen positiven Effekt auf den Differenzierungsstatus humaner Primärkulturen hepatischen Ursprungs hat (Isom et al. 1987; Gripon et al. 1988).
Die Modulation der jeweiligen Konzentration sowie Expositionsdauer ergaben eine maximale morphologische Differenzierung nach 28 Tagen in Kultur, wobei in den letzten 14 Tagen DMSO zu dem insulin- und hydrocortsinhaltigen Kulturmedium dazugegeben wurde.
Im Vergleich zu anderen, bereits etablierten humanen Hepatomzelllinien wie HuH7 (Nakabayashi et al. 1982) oder der aus *Rattus norvegicus* stammenden Linie FAO (Deschatrette et al. 1979) zeigen HepaRG-Zellen lediglich geringe chromosomale Veränderungen. So konnte an der Untersuchung von 40 Mitosen ein pseudodiploider Chromosomensatz nachgewiesen werden, wobei 65% aller Zellen 46 Chromosomen aufwiesen, bei 22% wurde ein zusätzliches Chromosom gefunden, wobei es sich immer um Chromosom 7 handelte. Neben dem zusätzlichen Chromosom 7 zeigte sich eine Translokation t(12;22) mit dem Verlust des 12p Fragments (Gripon et al. 2002).
Neben den morphologischen Charakteristika gab eine Northern-Blot-Analyse Aufschluss über die Expression leberspezifischer Enzyme. So konnte die Expression von Albumin, Transferrin, Aldolase B sowie einiger Cytochrom P450-Enzyme (CYP2E1, CYP3A4, GSTα) für differenzierte HepaRG-Zellen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Gripon et al. 2002).
Zusätzlich zu der charakteristischen Morphologie und dem vielversprechenden Proteinexpressionsprofil leberspezifischer Enzyme gelang es differenzierte He-

paRG-Zellen mit HBV zu infizieren (Gripon et al. 2002). Diese Fähigkeit, die komplexe, für Hepatozyten spezifische intrazelluläre Prozesse voraussetzt, macht HepaRG zu einem wichtigen Werkzeug für die Erforschung des Aufnahmemechanismus von HBV in Zellen, da es das erste humane, infizierbare Zellkultursystem darstellt, das den vollständigen Replikationszyklus von humanem HBV aufzeigt (Griepon et al. 2002). Zusammen mit den Infektionskompetitionsversuchen von Le Sayec et al. (1998 und 1999), die zunächst virale und zelluläre Proteine auf eine Beteiligung an den frühen Schritten der Infektion untersuchten, ergeben sich nun mithilfe von HepaRG umfangreichere Erkenntnisse bezüglich des Replikationszyklus und möglicherweise neue Ansätze für eine antivirale Therapie.

Auf der Suche nach neuen Leberzellmodellen veranlassten die Ergebnisse von Gripon et al. weitere Forschergruppen sich eingehender mit HepaRG zu beschäftigen. So zeigten Aninat et al. 2006, dass es sich bei HepaRG um die erste humane Hepatomzelllinie handelt, die nicht nur eine Vielzahl von leberspezifischen Proteinen, Phase 2-Metabolisierungsenzymen, nukleären Rezeptoren sowie sechs der wichtigsten Cytochrom P450-Enzyme exprimiert, sondern dies auch in einer Quantität tut, die an primäre humane Hepatozyten heranreicht. Aus diesen Ergebnissen resultiert für das HepaRG-Zellmodell eine Verwendbarkeit auf dem Gebiet von Metabolisierungs- und Toxizitätsstudien.

Parent et al. postulierten 2004, dass es sich bei HepaRG um die erste beschriebene Leber-Progenitor-Zelle handelt, aufgrund der beobachteten Expression einiger, für diese Zellen charakteristischen Marker. Leber-Progenitor-Zellen, die einen intermediären Phänotyp zwischen Hepatozyten und Gallengangszellen aufzeigen, werden wahlweise auch als ovale Zellen bezeichnet und besitzen definitionsgemäß die Fähigkeit sich in zwei Richtungen zu differenzieren (Cerec et al. 2007). Sie zeigen eine Expression sowohl hepatozytärer, als auch biliärer Marker wie die Zytokeratine 8, 18 und 19 (Lowes et al. 1999). Ovale Zellen kommen im gesunden Lebergewebe nur in geringer Anzahl vor, wobei eine Lokalisation im Bereich der Hering-Kanäle wahrscheinlich scheint (Theise et al. 1999). Vermutlich übernehmen sie im menschlichen Organismus keine Rolle bei der Regeneration von Lebergewebe, da normale Hepatozyten über enormes proliferatives Potential verfügen (Lee et al. 1996). Vielmehr scheinen sie eine Rolle bei chronischen Lebererkrankungen sowie akuten Leberverletzungen zu übernehmen, wenn die Proliferation von Hepatozyten

beeinträchtigt ist bzw. verspätet eintritt (Lee et al. 1996; Theise et al. 1999; Thorgeirsson und Grisham 2003). Dadurch könnte HepaRG als Zellmodell für die Untersuchung verschiedener pathophysiologischer Vorgänge in der Leber dienen und Aufschlüsse über Signale, die an der Expansion von Leber-Progenitor-Zellen beteiligt sind, liefern (Cerec et al. 2007).

Die seit der Erstbeschreibung 2002 beobachteten vielfältigen Eigenschaften charakterisieren HepaRG als ein außergewöhnliches Zellmodell, das in vielerlei Hinsicht mit den Eigenschaften einer primären Hepatozytenkultur konkurrieren kann. Die Tatsache, dass nur wenig Erkenntnisse über dieses Zellsystem bezüglich des Lipoproteinstoffwechsels vorliegen, gaben Anlass zu der vorliegenden Arbeit.

2.5 Ziele der Arbeit

Die Hepatomzelllinie HepaRG ist ein neues, wertvolles Modellsystem für humane Hepatozyten, da diese Zellen sich sehr ähnlich zu primären Hepatozyten in Bezug auf hepatozytäre Differenzierung und Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus verhalten. Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, die HepaRG-Zellen für Fragestellungen im Zusammenhang mit dem hepatozytären Lipoproteinstoffwechsel zu charakterisieren. Der Fokus lag dabei insbesondere auf dem postprandialen Lipoproteinstoffwechsel im Zusammenhang mit LRP1. Die zentralen Aspekte hierbei sind:

- Die Erstellung eines Proteinprofils, um die Expression der Proteine zu charakterisieren, die für den Lipoproteinstoffwechsel eine wichtige Rolle innehaben
- Die Untersuchung der Insulinsensitivität mittels Phosphoprotein-spezifischer Antikörper
- Die Darstellung und quantitative Analyse der insulinstimulierten Aufnahme über LRP1

Dem folgenden Kapitel sind die dabei verwendeten Materialien sowie eine Erörterung der methodischen Ansätze zu entnehmen.

3 Material und Methoden

Alle im Folgenden aufgeführten Materialien und Methoden dienten als Grundlage für die in Abschnitt 4 aufgeführten Experimente. Bei der Verwendung gewöhnlicher Chemikalien wird auf eine Angabe des Herstellers verzichtet.

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Geräte	Bezugsquelle
Amersham Biotrak II Visible Plate Reader	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
CO_2-Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Digitalkamera: Axiocam	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Durchflusszytometer: Cytomics FC 500	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Entwicklungsmaschine: X - OMAT 1000 Processor	Kodak, Rochester, NY, USA
Fluoreszenzmikroskop: Axiovert 100	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Gamma-Counter: LKB Wallac 1272 CLINIGAMMA	LKB Wallac, Perkin Elmer Life Sciences, Gaithersburg, MD, USA
HERAsafe - Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Hoefer Processor Plus	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Laborzentrifuge: 1-15K	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Laborzentrifuge: 6K15	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Laborzentrifuge: LABOFUGE^{GL}	Heraeus, Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop: LH50A	Olympus, Hamburg, Deutschland
LSM 510 META	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Power supply: Powerpack 3000	BioRad, Hercules, CA, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ULTRA-TURRAX T25 Sonifier	IKA Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Ultrazentrifuge: Optima L-90K	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Vortexer	Heidolph Instr., Schwabach, Deutschland
Wasserbad SW-20C	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland

Tabelle 3: Geräte

Verbrauchsmittel	Bezugsquelle
96-well Platten	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Blot-Kammer X Cell II™	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
EDTA-Blutentnahmeröhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filmkasette: Hypercassette™	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Gradientengel NuPAGE 4-12% Bis-Tris	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Polyallomer Centrifuge Tubes, 25x89 mm	Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA, USA
Protran Nitrozellulosemembran 0,45 µm	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Röntgenfilm Kodak BioMax Light Film™	Sigma-Aldrich, St. Louis, CA, USA
Ultra-Clear Centrifuge Tubes, 14x95 mm	Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA, USA
Whatman-Papier	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland

Tabelle 4: Verbrauchsmittel

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Bezugsquelle
Acridine Orange	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
BSA - fatty acid free, low endotoxin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (A8806)
BSA Standard	Pierce, Rockford, IL, USA (23209)
Complete Mini Protease inhibitor cocktail tablets	Roche, Basel, Schweiz
Cy2 Mono-Reactive Dye	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Cy3 Mono-Reactive Dye	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Cy5 Mono-Reactive Dye	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
ECL Super Signal	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Folin-Ciocalteau-Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Heparin-Natrium - 25.000	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (I1882)
LpL (bovine)	Freundlich zur Verfügung gestellt von O. Bruns, Hamburg, Deutschland
MES SDS Laufpuffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Milchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Mowiol	Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA, USA (475904)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (15140-163)
Ponceau S	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
PPD	Merck, Darmstadt, Deutschland (L930943)
RPN 800 V Marker	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Saponin From Quillaja Bark	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Standardlösung für Chol/TG	Lilly, Indianapolis, IND, USA
TG-Reagenz	Roche, Basel, Schweiz

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

3.1.3 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusätze
*A*cridine Orange Puffer 1	26,5 mL 0,1 M Zitronensäure
	6,9 mL 0,2 M Natriumphosphat
	13,7 g Saccharose
	0,2 mL Triton X-100
	40 µL Ethylendiamintetraessigsäure
	Aqua dest. ad 200 mL Steril filtrieren, Lagerung bei 4°C
Acridine Orange Puffer 2	9,9 mL 0,1 M Zitronensäure
	5,5 mL 0,2 M Natriumphosphat
	1,7 g Natriumchlorid
	Aqua dest. ad 200 mL Steril filtrieren, Lagerung bei 4°C
Blocklösung (Western Blot)	400 g Natriumchlorid
	121 g Tris-Base
	5 g Tween
	Aqua dest. ad 5 L 10% Milchpulver

Blot-Puffer	56,2 g Glycin
	12,1 g Tris
	1 L Methanol
	Aqua dest. ad 5 L
Gelladepuffer (Western Blot)	10% SDS (in 0,25 M Tris, pH 8,0)
	87% Bromphenolblau
	25% Glycerol
	25% Mercaptoethanol
Hungermedium	500 mL Dulbeccos MEM low glucose
	5 g Penicillin-Streptomycin (15140-163)
	0,1 g BSA fatty acid free
	10 mM Hepes
	Steril filtrieren, Lagerung bei 4°C
KRP Puffer (10x)	1,2 M Natriumchlorid
	50 mM Kaliumchlorid
	12 mM Kaliumdihydrogenphosphat
	6 mM Magnesiumsulfat
	9 mM Calciumchlorid
Lowry Lösung A	20 g Na_2CO_3
	0,2 g Natrium-Kalium-Tartrat
	0,1 N NaOH ad 1 L
Lowry Lösung B	50 g SDS
	5 g Kupfersulfat-Pentahydrat
	Aqua dest. ad 1 L
Lowry Lösung C	Lowry Lösung A + Lowry Lösung B (50:1)
PBS	40 g Natriumchlorid
	1,0 g Kaliumchlorid
	1,0 g Kaliumdihydrogenphosphat
	5,8 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
	Aqua dest. ad 5 L pH 7,5
PBS-Heparin	1 Ampulle Heparin 25.000
	ad 500 mL PBS
PGS	5 g Glycin
	500 mg Saponin
	ad 1 L PBS

Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	1 mM Pepstatin
	10 mM Chymostatin
	10 mM Leupeptin
	10 mM Antipain
RIPA Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,4
	5 mM Ethylendiamintetraessigsäure
	50 mM Natriumchlorid
	10 mM Natriumpyrophosphat
	50 mM Natriumfluorid
	1% Nondiet P40 (IGEPAL CA-630)
TBS (10x)	400 g Natriumchlorid
	121 g Tris-Base
	Aqua dest. ad 5 L pH 7,6
TBS-Tween (10x) (TBS-T)	400 g Natriumchlorid
	121 g Tris-Base
	5 g Tween
	Aqua dest. ad 5 L
Uptake-Medium	500 mL Dulbeccos MEM with Glutamax 4,5 g Glukose/Liter
	5 g Penicillin-Streptomycin (15140-163)
	5 g BSA
Zelllysispuffer	50 mM Tris
	2 mM Calciumchlorid
	80 mM Natriumchlorid
	1% Triton X-100
	pH 8,0

Tabelle 6: Lösungen und Puffer

3.1.4 Antikörper

Primärantikörper:

Alle Primärantikörper wurden in der angegebenen Verdünnung in TBS-T + 5% BSA + 1:1000 20% Na-Azid angesetzt. Sofern bekannt, ist der jeweils verwendete Klon angegeben.

Antigen	Klon	Aus Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle (Lotnummer)
hApoAI	1405	m	1:1000	Biodesign International, Saco, ME, USA
hApoAII		gt	1:1000	WAK Chemie, Bad Homburg, Deutschland
hApoAV		gt	1:1000	Mit freundlicher Genehmigung von Robert Ryan, USA
hApoB	R1032P	gt	1:5000	Acris, Hiddenhausen, Deutschland
hApoCI		rb	1:1000	Academy Bio-Medical Company, Houston, TX, USA (103053)
hApoCII		rb	1:1000	Academy Bio-Medical Company, Houston, TX, USA (043056)
hApoCIII		rb	1:1000	Academy Bio-Medical Company, Houston, TX, USA (123158)
hApoE		rb	1:5000	DAKO, Glostrup, Dänemark (048)
hEEA1		m	IMF	BD Biosiences, San Jose, CA, USA (610456)
hAP1		m	IMF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (A4200)
hLDL-R		ch	1:1000	Progen Biotechnik, Heidelberg, Deutschland
hLRP1(515kDa)	8G1	m	1:500	Progen, Queensland, Australien
hLRP1(85kDa)	5A6	m	1:500	Progen, Queensland, Australien
hLRP1 (Monomix)			IMF	Progen, Queensland, Australien
hRab5	s-19	rb	IMF	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA (sc-309)
hβ-Aktin	AC-15	m	1:50000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (102K4811)

Tabelle 7: Primärantikörper

Erläuterung: ch: chicken; gt: goat; h: human; m: mouse; rb: rabbit

Sekundärantikörper:

Alle Sekundärantikörper wurden 1:5000 in Blocklösung angesetzt.

Antigen	Aus Spezies	Bezugsquelle
AK-F_c	dk-α-ch	Jackson Immuno Research, West Grove, USA, bezogen über Dianova, Hamburg, Deutschland
AK-F_c	dk-α-gt	Dianova, Hamburg, Deutschland
AK-F_c	gt-α-m	Dianova, Hamburg, Deutschland
AK-F_c	gt-α-rb	Dianova, Hamburg, Deutschland
AK-F_c	dk-α-sh	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle 8: Sekundärantikörper

Erläuterung: ch: chicken; dk: donkey; gt: goat; m: mouse; rb: rabbit; sh: sheep

3.2 Proteinbiochemie

3.2.1 Zelllyse und Gesamt-Protein Präparation

Die zu lysierenden Zellen wurden zunächst in 500 µL (6-well Platte) bzw. 4-6 mL (T75-Zellkulturflasche) 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend mithilfe eines Zellkratzers in gleichem Volumen PBS vorsichtig von der Oberfläche des jeweiligen Kulturgefäßes abgelöst, um anschließend in ein geeignetes Zentrifugationsgefäß überführt zu werden. Dieser Prozess geschah vollständig auf Eis.
Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 800 rpm (LABOFUGE^{GL}) wurde das sedimentierte Zellpalett in 200-500 µL Zelllysispuffer + PIC (1:1000 verdünnt) resuspendiert, in ein Eppendorf-Tube überführt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Der durch nochmaliges Zentrifugieren bei 13.000 rpm und 4°C (1-15K) gewonnene Proteinüberstand wurde zur Weiterverarbeitung erneut überführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach Lowry bestimmt.

3.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Neben 20 µL einer BSA Standardverdünnungsreihe wurde eine ggf. vorverdünnte Probe von 20 µL auf 100 µL mit 0,1 N NaOH verdünnt. Nach Zupipettieren von 1 mL Lösung C wurde jedes Reaktionsgefäß gevortext. Der zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) und anschließendem Zugeben von 100 µL Folin-Ciocalteau-Reagenz (1:2 in H_2O), folgte ein erneutes Vortexen jedes Reaktionsge-

fäßes. Die darauffolgende Inkubation erfolgte für 30 Minuten im Dunkeln. 300 µL jedes Probenansatzes wurden neben der Standardreihe auf eine 96-well Mikrotiterplatte aufgetragen und im Biotrak II Visible Plate Reader bei einer Wellenlänge von 750 nm vermessen.

3.2.3 SDS-PAGE

Die jeweils gewünschte Proteinmenge wurde nach der o.g. Proteinbestimmung durch eine Verdünnung in Aqua dest. eingestellt. Ca. 1/3 des Gesamtvolumens einer jeden Probe stellte der Gelladepuffer, der wahlweise b-Mercaptoethanol enthielt (reduzierte Proben), oder nicht (nicht-reduzierte Proben). Nach zehnminütigem Aufkochen der Proben und anschließendem Anzentrifugieren wurden gleiche Mengen Protein zusammen mit einem Marker (RPN 800 V) auf das NuPAGE-System aufgetragen. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein Volumen von 25 µg/Lane Gesamtzellprotein nicht überschritten wurde. Läufe wurden in 1x MES bei 180 V durchgeführt.

3.2.4 Western-Blot

Der Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (NC) mit einer Porengröße von 0,45 µm erfolgte nach der Semi-dry-Blot-Methode gemäß Beschreibung der Firma Invitrogen in der zugehörigen Blot-Kammer (X Cell II), in Blot-Puffer und einer angelegten Spannung von 40 V. Die zur Visualisierung des Proteintransfers 5 min mit Ponceau S angefärbte NC-Membran wurde nach Kennzeichnung der Markerbanden gemäß den Anforderungen geteilt und durch dreimaliges Waschen in TBS-T entfärbt. Durch eine 60-minütige Inkubation in 10% fettarmen Milchpulver wurden die noch freien Bindungsstellen der Membran blockiert. Nach erneutem Waschen in TBS-T wurde die Membran mit dem 1. Antikörper (siehe Tab. 7) unter leichtem Schütteln bei 4°C über Nacht (ü.N.) inkubiert.

Das sich anschließende Waschen sowie die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten 2. Antikörper (siehe Tab. 8) erfolgte automatisiert (Hoefer Processor Plus). Dabei wurde zunächst 1x 10 min mit PBS, anschließend 4x 10 min mit TBS-T gewaschen, gefolgt von der Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 90

Minuten. Die Waschschritte wiederholten sich anschließend in umgekehrter Reihenfolge.

Zur Darstellung der Proteinbanden wurde die NC-Membran in eine Filmkassette überführt und vom restlichen PBS mithilfe von Whatman-Papier befreit. Zur Initiierung der Enzymreaktion zwischen der an den Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase und der ECL-Lösung, wurden diese zu je 2 mL auf jede NC-Membran pipettiert. Die anschließende Inkubation betrug exakt 2 Minuten.
Das durch die Enzymreaktion entstandene Signal wurde mithilfe eines Röntgenfilms detektiert. Die Belichtungszeit orientierte sich dabei an der jeweiligen Stärke des ECL-Signals.

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Quantifizierungen der Western-Blot-Ergebnisse wurden mit der Software ImageQuant, Version 5.2 (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) durchgeführt.

3.2.5 Untersuchung der Insulinsensitivität mittels Phosphoprotein-spezifischer Antikörper

Zur Untersuchung der Insulinsensitivität von HepaRG wurde das entsprechende Proliferations- bzw. Differenzierungsmedium einer 6-well Multidishplatte abgesaugt und der konfluente Zellrasen 1x PBS gewaschen. Darauf folgte eine 120-minütige Inkubation in KRP-Puffer bei 37°C. Die sich anschließende Stimulation mit Insulin verschiedener Konzentrationen erfolgte für genau 15 Minuten in einem Volumen von 500 µL je Well, ebenfalls in KRP-Puffer, bei gleichbleibenden Kulturbedingungen.
Anschließend wurden die Zellen in 150 µL RIPA-Puffer mithilfe eines Zellkratzers vorsichtig vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und in - nach Zelllinie, Differenzierungsstatus und jeweiliger Insulinkonzentration - vorsortierte Eppendorf-Tubes überführt. Dieser Prozess geschah vollständig auf Eis.
Dem Sonifizieren der Zellen für zehn Sekunden bei einer Amplitude von 20% folgte ein Zentrifugieren für 20 Minuten bei 13.000 rpm und 10°C, woraufhin der Proteinüberstand zur Weiterverarbeitung abgenommen wurde.

Das Ergebnis der Insulinstimulation wurde nach einer Proteinbestimmung (Lowry) mittels Western-Blot analysiert. Als Primärantikörper diente dabei ein AK-Cocktail gegen verschiedene Proteine der IR-Signaltransduktionskaskade (PathScan Multiplex Western Cocktail I, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA).

3.3 Zellbiologie und Ligandenpräparation

3.3.1 Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% Kohlendioxidanteil einheitlich kultiviert. Nach einmaligem Waschen des konfluenten Zellrasens mit PBS wurden die Zellen zum Passagieren durch Zugabe von Trypsin-EDTA (ca. 1,5 mL/25 cm^2) innerhalb weniger Minuten vom Boden des jeweiligen Zellkulturgefäßes abgelöst. Das Ablösen der Zellen wurde dabei im inversen Mikroskop kontrolliert. Durch Zugabe der doppelten Menge von FCS-haltigem Kulturmedium wurde die proteolytische Aktivität des Trypsin-EDTA inaktiviert und die Zellen wurden in ein geeignetes Gefäß überführt, um bei 800 rpm abzentrifugiert zu werden.
Nach Bedarf wurde eine Zellzählung mithilfe einer Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt, um die Zellen anschließend in der gewünschten Zellzahl neu auszusetzen.
Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden die Zellen mit einer Zelldichte von ca. 60.000 Zellen/cm² in entsprechend geeigneten Zellkulturflaschen (25 cm^2, 75 cm^2, 175 cm^2, 300 cm^2) bzw. Multidishplatten (6-,12-well) ausgesetzt. Neben HepaRG- wurden HuH7- und FAO-Zellen kultiviert. Das hierbei verwendete Zellkulturmedium richtete sich nach der jeweiligen Zellinie:

Zellinie	Zellkulturmedium, Zusätze und Bezugsquelle
HepaRG	500 mL Williams Medium E, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (32551-020)
	50 mL Foetal Bovine Serum Gold, Invitrogen, Carlsbad, USA (A64904-0443)
	5 mL L-Glutamine, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (25030-024)
	5 mL Penicillin/Streptomycin, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (15140-163)
	5 µg/mL Insulin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (I1882)
	50 µM Hydrocortison, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (H4881)
HuH7 und FAO	500 mL Dulbeccos MEM with Glutamax/4,5 g Glukose/Liter, Invitrogen, Carlsbad, USA (31966-021)
	50 mL Foetal Bovine Serum, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (10270-106)
	5 mL Penicillin/Streptomycin, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (15140-163)

Tabelle 9: Zellkulturmedien

Die zusätzlich im Rahmen der Zellkultur verwendeten Reagenzien und Verbrauchsmittel sind Tab. 10 zu entnehmen.

Reagenzien/Verbrauchsmittel	Bezugsquelle
„Well-Platten“ (6- und 12-well)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Zellkratzer	Sarstedt, Newton, NC, USA
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypan-Blau 0,5%	Seromed, München, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175, T300)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

Tabelle 10: Im Rahmen der Zellkultur verwendete Reagenzien und Verbrauchsmittel

Alle aufgeführten Lösungen wurden vor deren Gebrauch auf 37°C erwärmt und im Fall der Kulturmedien alle zwei Tage erneuert.

3.3.2 Zelldifferenzierung

Die Differenzierung der HepaRG-Zellen erfolgte nach Griepon et al. (2002). Nach dem Aussetzen in einer Dichte von ca. 60.000 Zellen/cm^2 wurden die Zellen zunächst für 14 Tage in Proliferationsmedium kultiviert, wo sie zwischen dem vierten und sechsten Tag vollständige Konfluenz erreichten.
Beginnend mit dem 15. Tag (d15) wurde bei einem Teil der Zellen das Proliferationsmedium um 1,5% DMSO ergänzt, um den Differenzierungsprozeß zu induzieren, welcher erneut 14 Tage in Anspruch nahm. Die im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen für die jeweiligen Differenzierungsstände sind Abb. 3-4 zu entnehmen.

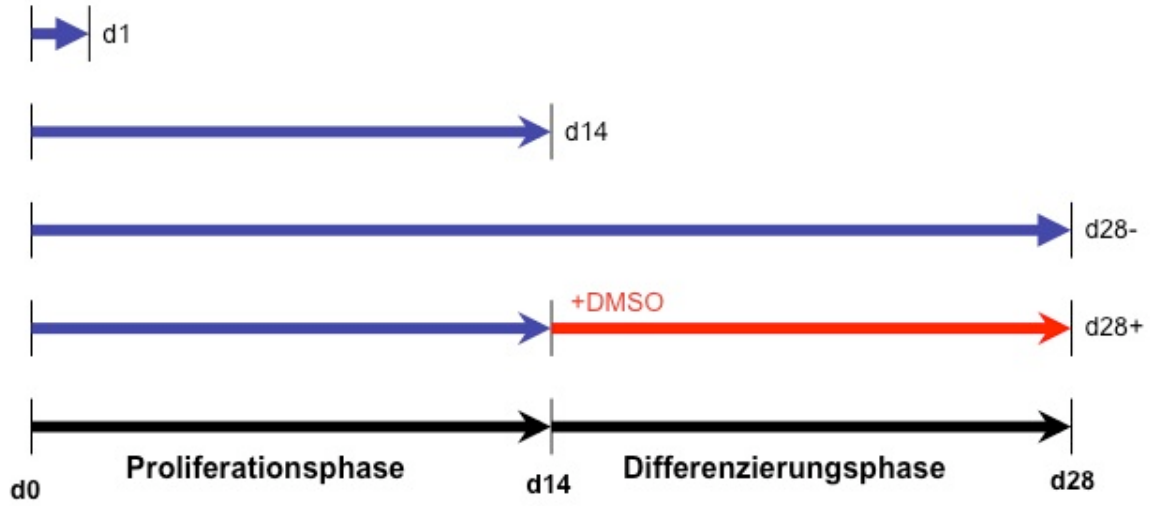

Abb. 3-4: Differenzierungsprotokoll von HepaRG-Zellen

Nach einer 14-tägigen Proliferationsphase wird den HepaRG-Zellen wahlweise 1,5% DMSO zugesetzt. Für die Angaben im weiteren Verlauf dieser Arbeit gilt:

d1: HepaRG-Zellen an Tag 1 nach Passagieren
d14: HepaRG-Zellen an Tag 14 nach Passagieren
d28-: HepaRG-Zellen an Tag 28 nach Passagieren, ohne DMSO während der Differenzierungsphase
d28+: HepaRG-Zellen an Tag 28 nach Passagieren, mit 1,5% DMSO während der Differenzierungsphase

3.3.3 Herstellung von TRL aus EDTA-Vollblut

Einem ApoCII-defizienten Spender wurden zehn Röhrchen EDTA-Blut abgenommen und bei 2500 rpm für zehn Minuten abzentrifugiert (6K15). Der Plasmaüber-

stand wurde 1:6 mit Saccharose versetzt. In einem Zentrifugenröhrchen (Polyallomer Centrifuge Tubes, 25x89 mm) wurden 15 mL PBS vorgelegt und anschließend mit 23 mL Plasma/Saccharose unterschichtet. Nach exaktem Austarieren der jeweiligen Zentrifugenröhrchen wurde in einem SW-32 Rotor bei 28.000 rpm (Optima L-90K Ultrazentrifuge) für zwei Stunden zentrifugiert. Der durch die PBS-Zentrifugation aufgereinigte Lipidanteil wurde erneut 1:6 mit Saccharose versetzt und nochmals mithilfe einer vorgelegten PBS-Säule sowie zweistündigem Zentrifugieren bei 28.000 rpm (SW-40 Rotor; Ultra-Clear Centrifuge Tubes, 14x95 mm), geklärt. Dieser Schritt wurde noch ein weiteres Mal wiederholt.
Anschließend wurde der Cholesterolgehalt sowie die Triglyzeridkonzentration bestimmt. Die Lagerung der Lipidphase erfolgte unter einer Stickstoffatmosphäre bei 4°C.

3.3.4 Cholesterol- und Triglyzeridbestimmung

Die zuvor präparierten TRL (s.o.) wurden in einem geeigneten Volumen PBS verdünnt und in eine 96-well Mikrotiterplatte à 100 µL pipettiert. Nach Zugabe von 200 µL TG-Reagenz und einer Inkubationszeit von zehn Minuten bei 37°C wurde jede Probe gegen eine Standardreihe bei 540 nm vermessen (Amersham Biotrak II Visible Plate Reader).

3.3.5 Hydrolyse von Chylomikronen zur Herstellung von Chylomikronen-Remnants

Die TRL wurden in einem Gesamtvolumen von 10 mL PBS auf eine Konzentration von 6 mg/mL eingestellt und im weiteren Verlauf mit 10 mL FCS versetzt. Bovine LpL wurde in einer Konzentration von 1 µg/mL zugefügt. Die Hydrolyse erfolgte in 30 Minuten bei 37°C.
Anschließend wurden dem Reaktionsgefäß 4 mL Saccharose (60%) zugefügt und die CR wurden durch dreimaliges Zentrifugieren (Optima L-90K Ultrazentrifuge) in PBS, ähnlich der Herstellung der TRL (siehe 3.3.3), aufgereinigt.

3.3.6 Darstellung der insulinabhängigen Aufnahme von LRP1-Liganden mittels Fluoreszenzdetektion

Die Dauer für alle im Folgenden angegebenen Waschschritte betrug fünf Minuten und erfolgte unter leichtem Schütteln bei RT.

Zur Darstellung der insulinabhängigen Aufnahmefähigkeit verschiedener Liganden wurden die zu untersuchenden Zellen auf Coverslips (CS) ausgesetzt und dem Differenzierungsprotokoll entsprechend kultiviert. Die Zellen wurden zunächst 1x mit PBS gewaschen, um anschließend für 120 Minuten in Hungermedium inkubiert zu werden. Einer 15-minütigen Vorinkubation ohne, oder mit Insulin (50 nM), folgte das Zupipettieren der jeweiligen Aufnahmeansätze. Die Aufnahme erfolgte in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxidanteil und einer Temperatur von 37°C für 30 Minuten, wobei Insulin den Aufnahmeansätzen in der gewählten Menge zugesetzt wurde.
Die Aufnahmeansätze, die jeweilige Konzentration der verwendeten Liganden sowie eventuelle Vorinkubationen mit Insulin sind im Ergebnisteil dargestellt.
Es folgten Waschritte mit PBS-Heparin (100 U/mL), um die an der Zelloberfläche gebundenen Liganden zu entfernen, sowie mit PBS.
Die Zellen wurden in 4% Paraformaldehyd (PFA) für 30 Minuten bei RT fixiert, um anschließend zum Permeabilisieren 4x mit PGS gewaschen zu werden. Für eine DNA-Färbung wurde für fünf Minuten in PBS-DAPI inkubiert, gefolgt von einem Waschdurchgang in PBS.
Abschließend wurde jeder CS mit Mowiol/PPD auf einem Objektträger fixiert und mit Nagellack eingedeckelt. Die Betrachtung der Ergebnisse erfolgte an einem LSM 510 META.

3.3.7 ^{125}I-Uptake-Assays zur Quantifizierung der insulinabhängigen Aufnahme über LRP1

Zur Quantifizierung der Aufnahme über LRP1 wurden sowohl CR/ApoE, als auch RAP mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. Jörg Heeren radioaktiv markiert (Jodogen).

Der jeweils konfluente Zellrasen einer 6-well Multidishplatte wurde nach einmaligem Waschen in PBS für 120 Minuten in Hungermedium inkubiert. Die sich anschließende Vorinkubation mit Insulin erfolgte in Aufnahmemedium, wobei nach exakt zehn Minuten die radioaktiv markierten Liganden zugeführt wurden. Die Konzentration lag für ^{125}I-RAP bei 10 µg/mL, die der ^{125}I-CR/ApoE betrug 5 µg/mL. Die Dauer der Aufnahme betrug 20 Minuten und wurde durch Absaugen der jeweiligen Aufnahmenansätze gestoppt. Nach den folgenden Waschschritten (2x PBS-Heparin, 1x PBS), die alle auf Eis stattfanden, wurden die Zellen in 1 mL 0,1 N NaOH lysiert und die jeweilige Aufnahme wurde als Counts/Minute in einem Gamma-Counter gemessen.

3.3.8 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Die Dauer für alle im Folgenden angegebenen Waschschritte betrug fünf Minuten und erfolgte unter leichtem Schütteln bei RT.

Im Gegensatz zu den Aufnahme-Assays wurden die Zellen bei diesem Verfahren zunächst 2x mit PBS gewaschen, um anschließend in 4% PFA für 30 Minuten bei RT in einer 12-well-Platte fixiert zu werden. Viermaligem Waschen mit PBS folgte einmaliges Waschen in PGS zum Permeabilisieren der Zellen. Blockiert wurde für 30 Minuten bei 37°C mit je 80 µL 2% BSA in PGS pro CS. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tab. 7) für 60 Minuten bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre und 5% Kohlendioxidanteil. Einmaligem Waschen in PBS folgte analog die Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (siehe Tab. 8) für 45 Minuten unter gleichen Bedingungen. Die abschließenden Waschschritte mit PGS, PBS-DAPI und PBS sowie die Fixierung der CS mit Mowiol/PPD erfolgten in der gleichen Art und Weise wie in Abschnitt 3.3.6 beschrieben.

3.3.9 Durchflusszytometrie

Prinzipiell muss im Rahmen der Durchflusszytometrie zwischen zwei unterschiedlichen Methoden differenziert werden: Je nach verwendetem Gerät steht auf der einen Seite das FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*), bei welchem das je-

weilige Zytometer in der Lage ist, eine Zelle aufgrund von fluoreszenzmarkierten Eigenschaften einer definierten Population zuzuordnen und diese auch räumlich von anderen Populationen zu trennen.
Auf der anderen Seite steht das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer Cytomics FC 500, dem diese Fähigkeit zur Zellseparation fehlt. Es beschränkt sich auf die Detektion quantitativer Unterschiede zwischen Zellen einer- oder auch verschiedener Populationen und stellt diese dem Anwender mithilfe unterschiedlichster Softwareprodukte graphisch dar.

Prinzip der Methode:

Initial wird die zu untersuchende Einzelzellsuspension mithilfe einer Kanüle angesaugt. Durch stetig kleiner werdende Durchmesser, durch die sich die Zellsuspension im Inneren des Zytometers zu bewegen hat sowie durch das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung, gelingt es einen Zellfluss zu generieren, bei dem sich eine Zelle an die Nächste reiht, jedoch zwei Zellen nicht nebeneinander liegen.
Dieser Strom aneinandergereihter Zellen wird nun an einer Lichtquelle vorbeigeführt, bei der es sich in aller Regel um einen Laser handelt. Das an dieser Stelle auf die jeweilige Zelle treffende Licht wird von dieser gestreut. Detektoren die sich gegenüber der Lichtquelle befinden (*Forward Scatter*; FSC) registrieren dabei die Größe einer vorbeifließenden Zelle, ein im 90° Winkel zur Lichtquelle angeordneter Detektor (*Side Scatter*; SSC) gibt Auskunft über die Oberflächenbeschaffenheit einer jeden Zelle. Weitere Detektoren dienen dazu, das emittierte Lichtsignal einer etwaigen Fluoreszenzmarkierung zu erfassen. Jeder gemessenen Zelleigenschaft (Intensitätssignal) wird dabei eine Anzahl an Ereignissen (Häufigkeit) zugeordnet, was durch die entsprechende Software graphisch dargestellt wird.
Auf diese Art und Weise lassen sich die durch das Zytometer fließenden Zellen nicht nur bezüglich ihrer physiko-chemischen Eigenschafen wie Größe und Granularität charakterisieren. Die Möglichkeit mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper, Lebend- bzw. Totzellfarbstoffen oder anderer, fluorochromassoziierter Werkzeuge, eine oder mehrere Zelleigenschaften hervorzuheben, ermöglicht eine Identifizierung von Zellpopulationen, die über Zellart und Oberflächeneigenschaften bis auf die Ebene von Differenzierungsstatus und Proteinexpression reicht.

Durchführung:

Der konfluente Zellrasen einer 6-well Multidishplatte wurde nach einmaligem Waschen mit PBS vorsichtig trypsiniert, abzentrifugiert und anschließend in einer Konzentration von ≈1x10^6 Zellen in 100 µL PBS resuspendiert. Puffer 1 wurde unter leichtem Schütteln in einem Volumen von 0,5 mL bei RT hinzugefügt. Der Lebendzellfarbstoff Acridin Orange wurde in Aqua dest. auf eine Konzentration von 2 mg/mL eingestellt, 1:100 in Puffer 2 verdünnt und in einem Volumen von weiteren 0,5 mL unter leichtem Schütteln bei RT supplementiert.

Die weitere Lagerung der verschiedenen Zellpopulationen bis zu deren Vermessung im Durchflusszytometer, bei der eine Anzahl von 20.000 Lebendzellereignissen nicht unterschritten wurde, erfolgte auf Eis.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Prinzip der Methode:

Im Gegensatz zur Transmissionsmikroskopie, bei der es während der Bildaufnahme zu einer Überlagerung von scharfen, sich in der Fokusebene befindlichen Bildpunkten mit weiteren, von außerhalb dieser Ebene kommenden Lichtstrahlen kommt, werden bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (LSM) mithilfe verschiedener optischer Elemente virtuelle, dünne Schnitte (ca. 1 µm) durch ein Präparat erzeugt. Eine geeignete Software ist in der Lage die so gewonnenen Aufnahmen verschiedener Schichten anschließend zu einem dreidimensionalen Bild zusammenzufügen.

Ein zuvor mit einem Fluorophor gekoppeltes Präparat (s.o.) wird hierzu von einem Laser, der die betrachtete Ebene durchläuft, gescannt. Anregungs- sowie Emissionspeaks verschiedener Fluorophore sind spezifisch, daher müssen Filter und Farbteiler im jeweiligen Lichtweg entsprechend individuell angepasst werden. Das von dem jeweiligen Fluorophor absorbierte monochromatische Laserlicht einer definierten Wellenlänge führt zu dessen Anregung und zu einer Lichtemission von langwelligerem Licht (siehe Tabelle 11). Durch eine sich in der ersten Abbildungsebene befindlichen Lochblende (Pinhole) wird gewährleistet, dass lediglich die Signale, die sich unmittelbar in der Fokusebene befinden, die nachgeschalteten Pho-

tomultiplier erreichen. Die von außerhalb der Fokusebene emittierten Signale werden von der Lochblende ausgeblendet, und es kommt zu einer Schichtaufnahme, deren Dicke sich neben der verwendeten numerischen Apertur des Objektivs aus dem Pinhole-Durchmesser ergibt. Das vom Photomultiplier registrierte Signal wird anschließend mittels einer geeigneten Software am Computer dargestellt.

Durchführung:

Alle im Rahmen dieser Arbeit gezeigten konfokalen Darstellungen wurden mit einem LSM 510 META und der zum jeweiligen Zeitpunkt aktuellen Software-Version aufgenommen. In Multifluoreszenz-Experimenten wurden die einzelnen Fluorophore sowohl separat voneinander angeregt als auch detektiert. Diese Vorgehensweise diente einer spezifischeren Detektion der einzelnen Farbstoffe, da ein breites Emissionssprektum bei gleichzeitiger Aufnahme zu einer überlappenden Detektion der Farbstoffe („Crosstalk“) führen kann.

Die Einstellung der variablen Parameter wie Laserintensität und Detektorempfindlichkeit orientierten sich an der im jeweiligen Präparat am stärksten vorzufindenden Signalintensität, wobei darauf geachtet wurde, dass dieses Signal im Bereich der Detektorsättigung lag. Für eine hohe Signalqualität wurden zusätzlich Auflösung, Signalmittelung sowie Scangeschwindigkeit optimiert, wobei alle Einstellungen im Laufe der Betrachtung einer experimentellen Serie beibehalten wurden, um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten.

Tabelle 11 gibt eine Übersicht über verwendete Fluorophore, deren Anregungsbereiche sowie Detektionsfenster.

Fluorophor	Anregung	Detektionsbereich
Cy2	488 nm	505-530 nm
Cy3	543 nm	560-615 nm
Cy5	633 nm	>650 nm
DAPI	364 nm	435-485 nm

Tabelle 11: Fluorophore, deren Anregungsbereiche sowie Detektionsfenster

3.4.2 Lichtmikroskopie

Alle lichtmikroskopischen Bilder wurden mithilfe einer Axiocam an einem Axiovert 100 Fluoreszenzmikroskop und der hierfür vorgesehenen Software Axiovision, Version 2.0.5 aufgenommen.
Zellen wurden hierfür auf CS ausgesetzt und vor der jeweiligen Aufnahme PBS gewaschen, in 4% PFA fixiert und auf einen Objektträger überführt.
Einstellungen an den einzelnen Blenden und Filtern sowie die Wahl des verwendeten Objektivs erfolgten ebenso wie eine Modulierung der Belichtungsdauer in Abhängigkeit der einzelnen Präparate.

4 Ergebnisse

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, die humane Hepatomzelllinie HepaRG in Ihren Eigenschaften hinsichtlich des Lipoproteinstoffwechsels zu charakterisieren und diese Ergebnisse in Bezug auf eine mögliche Verwendbarkeit dieses Zellmodels im Rahmen des Lipidstoffwechsels einzuordnen.
Das nachfolgende Kapitel gliedert sich in drei Bereiche:
Zunächst wurde eine morphologische Grundcharakterisierung von HepaRG-Zellen durchgeführt. Diese Ergebnisse sind Kapitel 4.1 zu entnehmen. Neben der lichtmikroskopischen Darstellung, mit der die morphologischen Veränderungen im Laufe der vierwöchigen Differenzierung dokumentiert wurden, wurden Experimente durchgeführt, um das Verhalten im Zellverband sowie die Ausbildung organspezifischer Strukturen zu untersuchen.
In Kapitel 4.2 ist die Expressionsanalyse essentieller, am Lipoproteinstoffwechsel beteiligter Rezeptoren sowie wichtiger Apolipoproteine dargestellt.
Die in Kapitel 4.3 vorgestellten Ergebnisse geben einen Überblick über die zellbiologischen Eigenschaften von HepaRG-Zellen. Neben der intrazellulären Lokalisation von LRP1 sowie dessen Assoziation zu bestimmten intrazellulären Strukturen, die in den postprandialen Degradierungsprozess triglyzeridreicher Lipoproteine eingebundenen sind, wurde die Insulinsensitivität sowie die insulinstimulierte Aufnahme von LRP1-Liganden untersucht.

Die für den jeweiligen Differenzierungsstatus der HepaRG-Zellen verwendete Schreibweise nach dem Schema d(X) +/- bezieht sich auf die Dauer der Differenzierung in Tagen mit (+) oder ohne (-) DMSO ab dem 15. Kulturtag (siehe Abb. 3-4). Die Angabe d28+ würde demnach einer 28-tägigen Differenzierung von HepaRG-Zellen entsprechen, wobei dem Nährmedium beginnend mit dem 15. Tag 1,5% DMSO zugesetzt wurde.

4.1 Morphologisches Erscheinungsbild von HepaRG

Alle lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden zu dem jeweils gewünschten Differenzierungsstatus, an einem Lichtmikroskop der Firma Carl Zeiss AG unter Verwendung der Software Axiovision (Version 2.0.5) durchgeführt.

4.1.1 Lichtmikroskopische Darstellung im Laufe der Differenzierung

Nach dem Aussetzen in einer Dichte von ca. 60.000 Zellen/cm^2 zeigte sich zunächst eine einheitliche, epitheliale Zellmorphologie, die keinerlei organspezifische Strukturen erkennen ließ. Unter dem Einfluss eines insulin- und hydrocortisonhaltigen Mediums erreichten die Zellen im Verlauf der ersten vier bis sechs Tage vollständige Konfluenz. Morphologisch zeigte sich während dieser Phase ein Bild elongierter, sich teilender Zellen mit klarem Zytoplasma. Eine Weiterkultivierung des hochkonfluenten Zellrasens führte zu zwei unterschiedlichen Zelltypen: Kleinere, polygonale Zellen, die eine erhöhte Zytoplasmagranularität aufwiesen und etwa 40-50% des Gesichtsfeldes ausmachten, wurden von flacheren Zellen mit klarem Zytoplasma umgeben.

Im Laufe der vierzehntägigen Differenzierung mit 1,5% DMSO nahm die Zytoplasmagranularität der kleineren, polygonalen Zellen weiter zu und es entwickelte sich ein Phänotyp, der dem mikroskopischen Erscheinungsbild einer primären Hepatozytenkultur mit dem charakteristischen, kopfsteinpflasterartigen Relief ähnelte. In einigen dieser Zellen ließ sich lichtmikroskopisch das Vorliegen mehrerer Zellkerne beobachten. Die Ausbildung gallengangsähnlicher Strukturen ließ sich andeutungsweise in mehreren Bereichen dieser hepatozytenähnlichen Zellen erkennen, was die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gripon et al. bestätigen (Gripon et al. 2002).

Der andere Teil der Zellen zeigte hingegen eine eher epitheliale Morphologie mit größerer, abgeflachterer Form und einem nicht so homogenen Zytosol wie es bei der zuerst beschriebenen Population der Fall war.

Durch die Verwendung von DMSO war neben der induzierbaren Differenzierung gleichzeitig eine deutliche Zunahme der Zellmortalität bei den regelmäßigen Medienwechseln festzustellen. Dennoch nahm der hochkonfluente Zellrasen im Laufe des Differenzierungsprotokolls eine mehr und mehr dreidimensionale Struktur an, was sich in der Entstehung regelrechter „Zelltürme“ äußerte.

Alle beschriebenen morphologischen Veränderungen der Zellen waren durch eine Behandlung mit Trypsin reversibel und gingen bei jeder Passagierung vollständig verloren.

Das morphologische Erscheinungsbild der HepaRG-Zellen nach Beendigung ihrer 28-tägigen Differenzierung ist in Abb. 4-5 dargestellt.

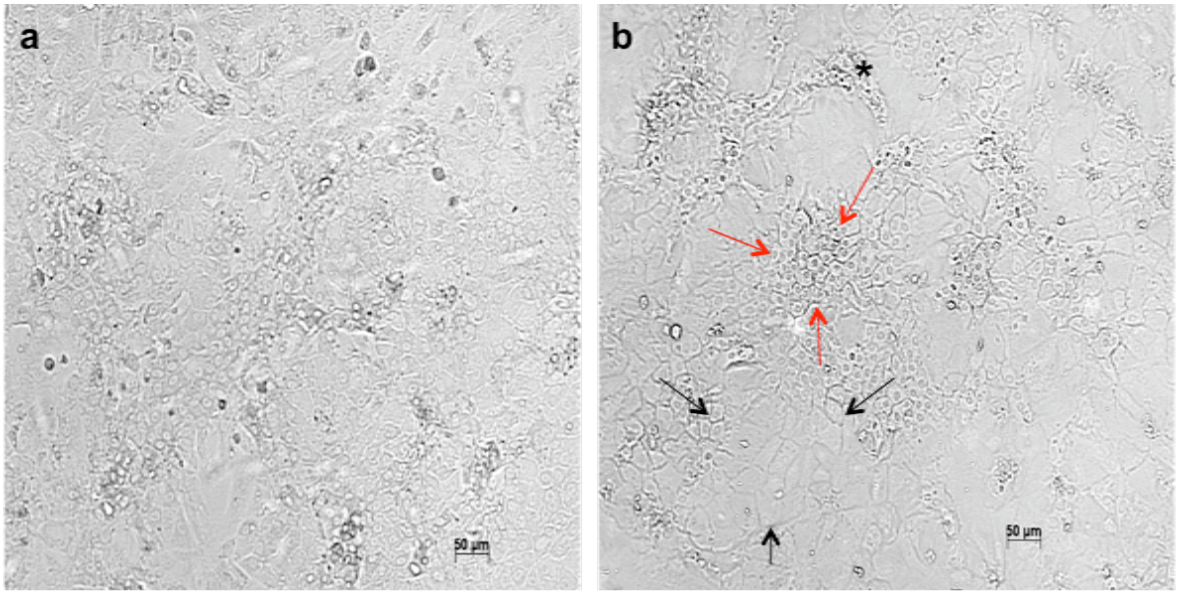

Abb. 4-5: Morphologisches Erscheinungsbild von HepaRG

Lichtmikroskopische Aufnahmen differenzierter HepaRG-Zellen an d28- (a) und d28+ (b). Unter dem Einfluss von 1,5% DMSO sind Bereiche mit typischem, hepatozytärem Phänotyp (Kopfsteinpflaster) zu erkennen (rote Pfeile), die von Zellen epithelialer Morphologie umgeben sind (schwarze Pfeile). Mit (*) ist beispielhaft ein Bereich gekennzeichnet, in dem gallengangsähnliche Strukturen im Laufe der Differenzierung erkennbar wurden.
Skalierungsbalken: 50 µm

4.1.2 Untersuchung des DNA-Gehalts

In der Literatur wird beschrieben, dass HepaRG-Zellen am 28. Tag ihrer Differenzierung nahezu keine proliferative Aktivität mehr zeigen (Parent et al. 2004). Aufgrund der Tatsache, dass mikroskopisch eine Mehrkernigkeit in differenzierten Zellen beobachtet wurde, wurde der DNA-Gehalt zu verschiedenen Stadien der Zelldifferenzierung näher untersucht, um eventuell Rückschlüsse auf das Vorliegen einer Polynukleose ziehen zu können.

Hierzu wurden HepaRG-Zellen mit dem Lebendzellfarbstoff Acridine Orange, der mit der DNA einer jeweiligen Zelle interagiert, angefärbt und im Durchflusszytometer vermessen.

Als Beobachtungszeitpunkt für den Proliferationsprozess wurde d4 gewählt. Im Hinblick auf den Einfluss von DMSO auf den DNA Gehalt wurden des Weiteren die Differenzierungsstadien d28- und d28+ analysiert. Als Negativkontrolle diente jeweils eine Probe, die nicht mit dem DNA-interagierenden Fluorochrom versetzt wurde. Zu Vergleichszwecken wurden konfluente HuH7-Zellen nach dem gleichem Schema unter Verwendung der gleichen Gates vermessen.

Abbildung 4-6 zeigt den Effekt des verwendeten Fluorochroms am Beispiel der HuH7 Zellen.

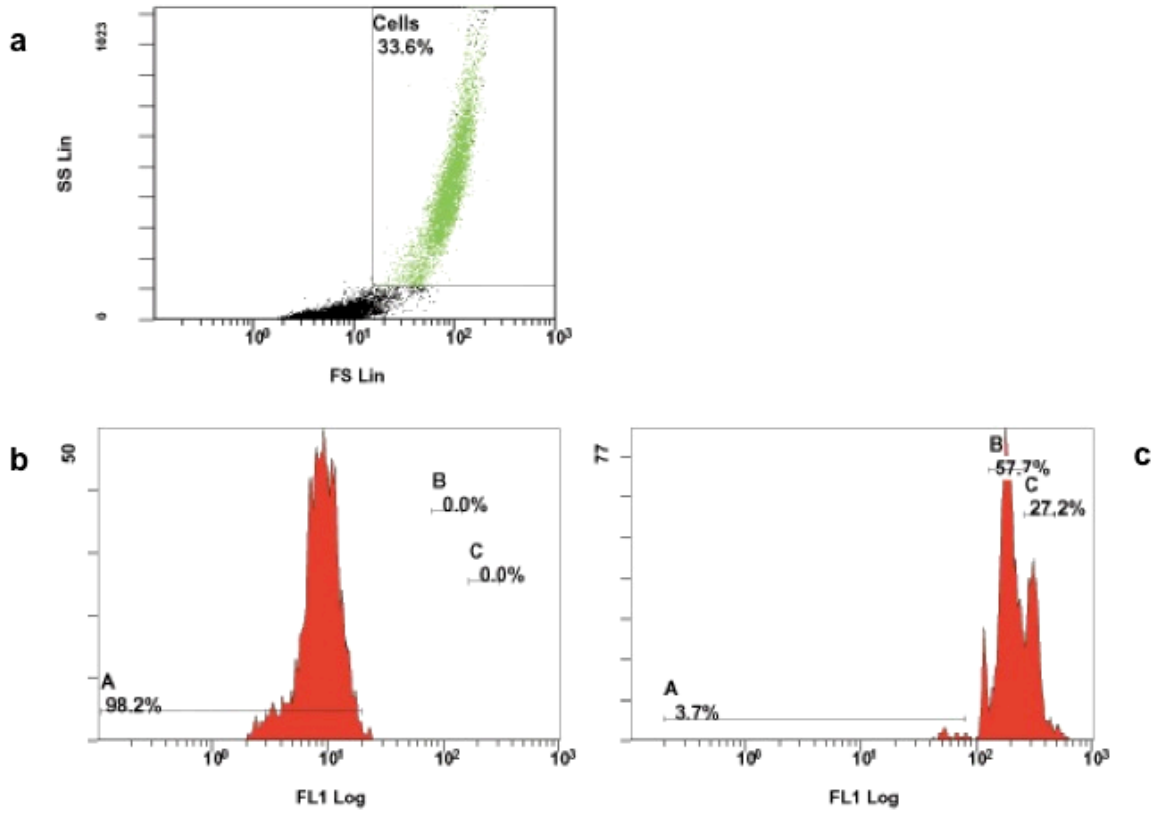

Abb. 4-6: Zytometrische Vermessung von HuH7–Zellen mit Acridine Orange als DNA-Farbstoff

Mit dem Fluorochrom Acridine Orange inkubierte HuH7-Zellen.
Neben den Lebendzellereignissen (a) wurden Gates für die Intensitätsänderung vor (b) und nach (c) Verwendung von Acridine Orange festgelegt. In Gate A werden alle ungefärbten Zellen vermutet. Gate B und C repräsentieren gefärbte Zellen, wobei Gate C in etwa die doppelte Signalintensität wie Gate B erfassen soll. Um auch die Zellen zu erfassen, mit denen Acridine Orange vermutlich nicht reagiert hat, wurde der Messbereich von Gate A in (c) erweitert.
Auf der X-Achse ist das im Fluoreszenzkanal gemessene Intensitätssignal, auf der Y-Achse die zu der jeweiligen Intensität gehörige Anzahl an Ereignissen aufgetragen. Der angegebene Prozentwert repräsentiert den Teil der Gesamtereignisse, der dem jeweiligen Gate zuzuordnen ist.

Gate A repräsentiert ungefärbte Zellen. Die Inkubation mit dem Lebendzellfarbstoff hatte eine Intensitätszunahme im Fluoreszenzkanal (X-Achse) zur Folge und führte zu einem Doppelpeak. Die Gates B und C wurden dabei so festgelegt, dass Gate B den ersten und Gate C den zweiten Peak einfaßt. Die zum jeweiligen Peak gehörige Intensität verdoppelte sich von Gate B zu Gate C in etwa.

Anschließend wurden HepaRG-Zellen nach dem gleichen Schema vermessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-7 dargestellt:

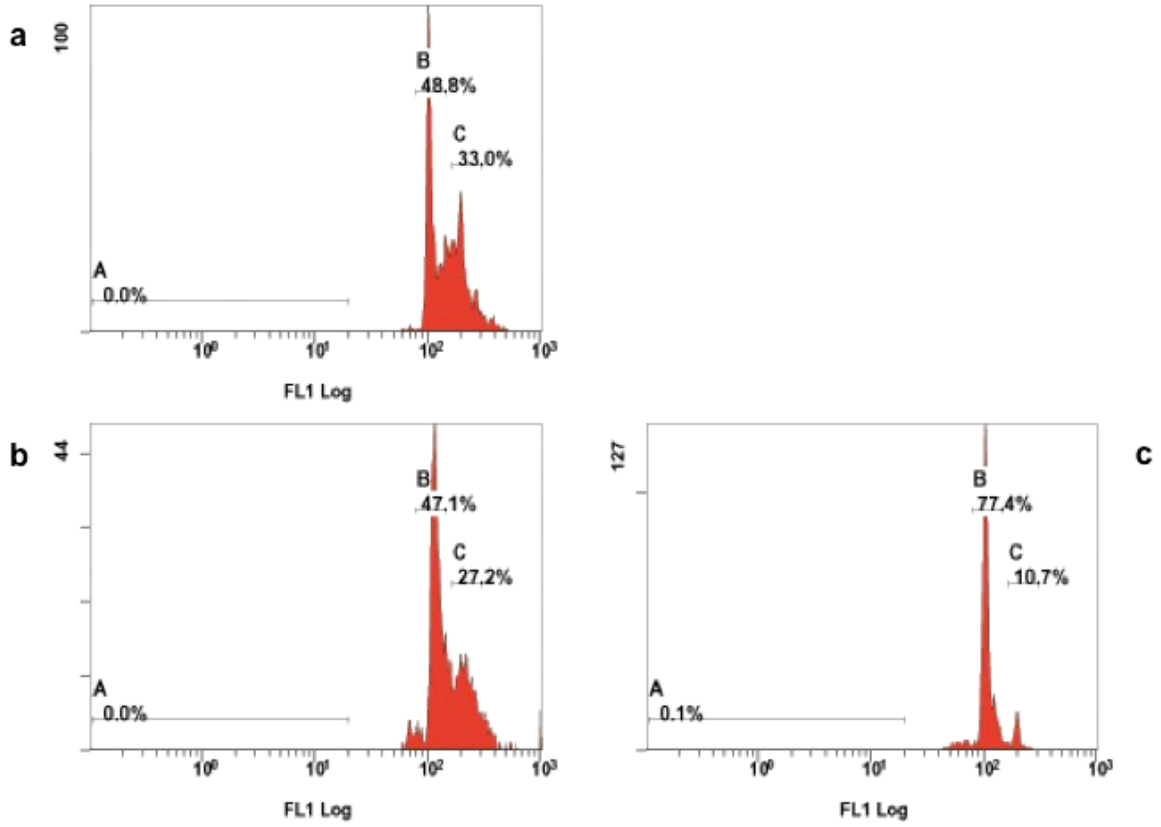

Abb. 4-7: Zytometrische Messung von HepaRG-Zellen mit Acridine Orange als DNA-Farbstoff

Mit dem Fluorochrom Acridine Orange inkubierte HepaRG-Zellen zu den Differenzierungszeitpunkten d4 (a), d28- (b) sowie d28+ (c).
In Gate A werden alle ungefärbten Zellen vermutet. Gate B und C repräsentieren gefärbte Zellen, wobei Gate C in etwa die doppelte Signalintensität wie Gate B erfassen soll.
Auf der X-Achse ist das im Fluoreszenzkanal gemessene Intensitätssignal, auf der Y-Achse die zu der jeweiligen Intensität gehörige Anzahl an Ereignissen aufgetragen. Der angegebene Prozentwert repräsentiert den Teil der Gesamtereignisse, der dem jeweiligen Gate zuzuordnen ist.

Die in Abbildung 4-7 dargestellten Ergebnisse zeigen für das Detektionsfenster A (ungefärbt) keine Signale. Für die Detektionsfenster B und C sind an den jeweiligen Differenzierungsstadien unterschiedliche Intensitätsaufnahmen zu erkennen. Während an den Differenzierungsstadien d4 sowie d28- jeweils ca. 30% der Messsignale in das Detektionsfenster C (doppeltes DNA-Signal) fallen, ist dies an d28+ lediglich für 11% der Ereignisse der Fall.
Die für d4 zu beobachteten „Zwischenpeaks“ zwischen den Detektionsfenstern B und C sind an d28- kaum, an d28+ gar nicht zu sehen.

4.2 Proteinexpressionsprofil

Um zu überprüfen, ob sich das HepaRG-Zellmodell prinzipiell für wissenschaftliche Fragestellungen rund um den Lipoproteinstoffwechsel eignet, wurde ein Proteinexpressionsprofil der wichtigsten, in diesem Zusammenhang beschriebenen Proteine, erstellt. Neben LRP1 und dem LDLR stehen hier v.a. die verschieden Apolipoproteine im Vordergrund. Hierzu wurden definierte Mengen an Zellprotein (siehe 3.2.3) mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert. Um die Quantität der Expression verschiedener Proteine besser einordnen zu können, wurden an einigen Stellen neben HepaRG- sowohl HuH7-, als auch FAO-Zellen, dargestellt.

4.2.1 LDL-Rezeptorfamilie

LDL-Rezeptor:

Zunächst wurde die Expression des LDL-Rezeptors untersucht. Neben den Differenzierungsstadien d28- und d28+ ist HuH7 abgebildet. Durch die bekannte, schwierige Detektierbarkeit des LDL-Rezeptors, die trotz Verwendung verschiedenster Antikörper und alternierender Bedingungen lediglich einmal gelang, ist es nicht möglich gewesen weitere Differenzierungsstadien von HepaRG zu erfassen. Die Quantifizierung der Banden bezieht sich daher lediglich auf die in Abb. 4-8 dargestellten Ergebnisse.

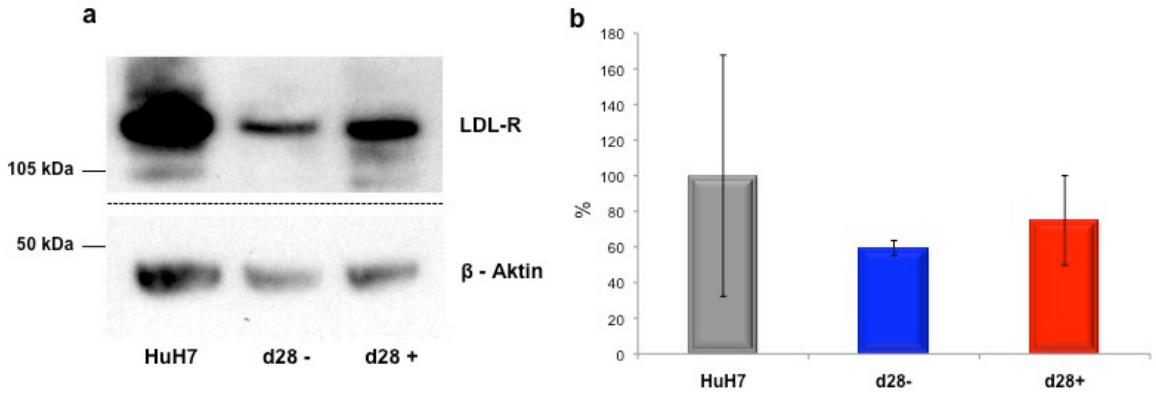

Abb. 4-8: Quantifizierung der Expression des LDL-Rezeptors in HepaRG- und HuH7-Zellen

25 µg Gesamtzellprotein wurden mittels SDS-PAGE in einem 4-12% Bis-Tris-Gradientengel aufgetrennt. Anschließend wurde der LDLR detektiert (a). Die Expression des LDLR in HuH7-Zellen wurde dabei relativ zu β-Aktin als 100% festgelegt. Aufgrund der schwierigen Detektierbarkeit des LDLR repräsentiert die graphische Darstellung (b) lediglich die Ergebnisse eines Versuchs. Die Messung wurde dabei zur Fehlerminimierung mehrmals durchgeführt.

Die Quantifizierung der in Abbildung 4-8 dargestellten Ergebnisse erfolgte unter Berücksichtigung der aufgetragenen Proteinmenge (Aktin-Bande). Der für HuH7 ermittelte LDLR-Wert wurde dabei relativ zu β-Aktin als 100% festgelegt.

Die Abbildung zeigt eine für HepaRG - im Vergleich zu HuH7 Zellen - verminderte Expression des LDL-Rezeptors. Ob eine Differenzierung mit DMSO einen positiven Effekt auf die LDLR-Expression hat, ist nicht zuletzt durch die fehlende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht eindeutig ersichtlich.

LRP1:

Abbildung 4-9 (a) zeigt ein repräsentatives Ergebnis der LRP1-Detektion. Die quantitative Analyse der Expression beider LRP1 Untereinheiten (515 kDa und 85 kDa) ergibt sich dabei aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (Abb. 4-9, b). Auch ApoE ist als zentrales Protein des TRL-Stoffwechsels dargestellt.

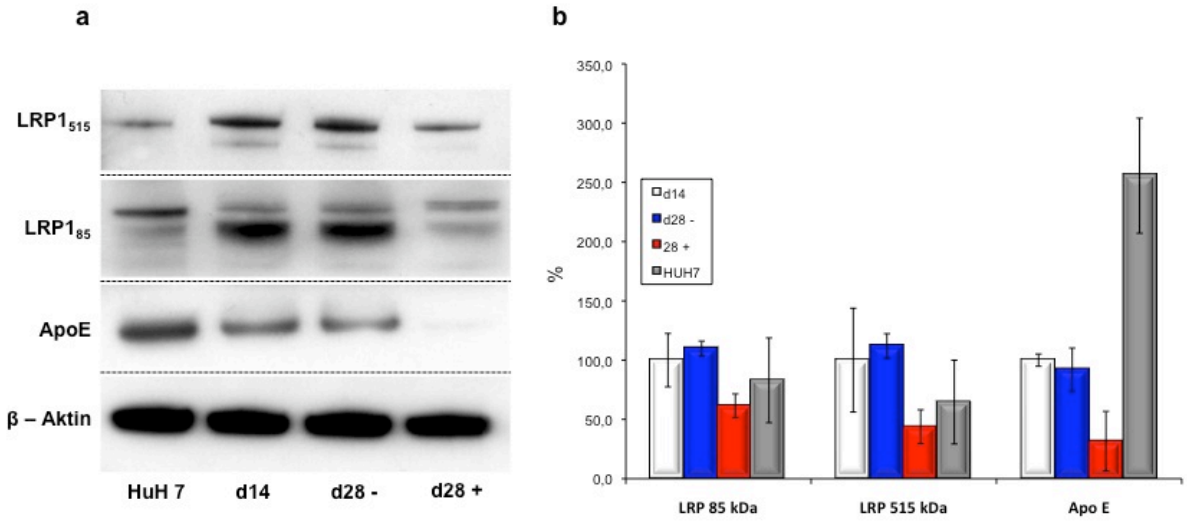

Abb. 4-9: Quantifizierung der Expression von LRP1 und ApoE in HepaRG- und HuH7-Zellen

25 µg Gesamtzellprotein wurden mittels SDS-PAGE in einem 4-12% Bis-Tris-Gradientengel aufgetrennt. Anschließend wurden beide LRP1-Untereinheiten sowie ApoE detektiert (a). Die Expression der LRP1-Untereinheiten und ApoE an d14 wurde dabei relativ zu β-Aktin als 100% festgelegt. Die graphische Darstellung (b) repräsentiert dabei mehrere, unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Für die quantitative Analyse der Proteinexpression beider LRP1 Untereinheiten sowie für ApoE wurde unter Berücksichtigung der aufgetragenen Proteinmenge die Expression an d14 relativ zu β-Aktin als 100% festgelegt.

Die gemessenen Werte für die 515 kDa und die 85 kDa Untereinheit korrelieren dabei innerhalb der verschiedenen Diiferenzierungsstadien gut miteinander. Für LRP1 ist ein Expressionsmaximum an den Differenzierungsstadien d14 sowie d28- zu erkennen, an denen die Expression etwas mehr zu sein scheint als für HuH7-Zellen. Die Expression an d28+ liegt dagegen etwas unterhalb derer der HuH7-Zellen.

Im Falle des ApoE liegen die Expressionslevel zwischen HepaRG- und HuH7-Zellen deutlich weiter auseinander. Während sich die ApoE-Expression im Falle der HepaRG-Zellen analog zu LRP1 mit annähernd gleichen Leveln an d14 und d28- sowie einem Abfall an d28+ präsentiert, ist die Expression von ApoE in HuH7-Zellen wesentlich höher als an allen Differenzierungsstadien von HepaRG.

4.2.2 Apolipoproteine

In Abbildung 4-10 ist die Expression wichtiger Apolipoproteine dargestellt. Neben den Differenzierungsstadien d1, d14, d28- sowie d28+ sind zum Vergleich HuH7 und FAO-Zellen abgebildet.

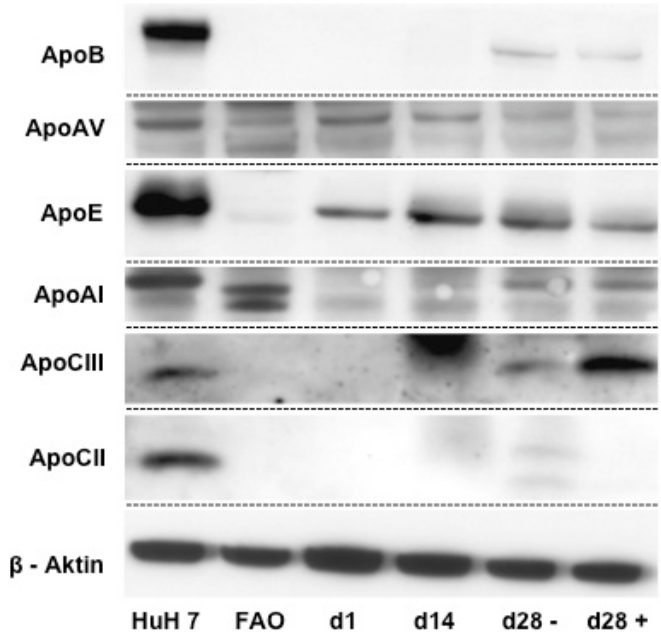

Abb. 4-10: Expressionsprofil wichtiger Apolipoproteine in HuH7-, FAO- und HepaRG-Zellen

25 µg Gesamtzellprotein wurden mittels SDS-PAGE in einem 4-12% Bis-Tris-Gradientengel aufgetrennt. Anschließend wurden wichtige Apolipoproteine detektiert. Bezüglich ApoCII ist in HepaRG-Zellen nur eine schwache Expression erkennbar. Dennoch sind im Gegensatz zu FAO-Zellen alle untersuchten Apolipoproteine in HepaRG-Zellen exprimiert. HuH7-Zellen zeigen mit Ausnahme von ApoCIII eine erhöhte Expression gegenüber HepaRG-Zellen.

Mit Ausnahme von ApoCIII zeigt sich für alle untersuchten Apolipoproteine eine gegenüber HuH7-Zellen verminderte Expression. Dennoch ist in HepaRG-Zellen jedes der untersuchten Apolipoproteine, abhängig vom Differenzierungsstatus, exprimiert, was für FAO-Zellen nicht zutrifft.

HuH7-Zellen zeigen für ApoB eine deutlich höhere Expression als die beiden anderen Hepatomzelllinien. Eine gut detektierbare Expression dieses Apolipoproteins ist in HepaRG-Zellen erst nach 28 Tagen Differenzierung zu beobachten.

Der für ApoE bereits beschriebene (s.o.) Expressionsverlauf zeigt analog zu den Ergebnissen aus 4.2.1 eine Mehrexpression für HuH7- gegenüber HepaRG-Zellen.

Für HepaRG wird ein Expressionsmaximum an d14 und d28- erreicht, der Einsatz von DMSO wirkt sich diesbezüglich nicht positiv aus.

4.3 Intrazelluläre Lokalisation von LRP1

In anderen Zelllinien wurde die Lokalisation des LRP1-Kompariment bereits dargestellt (Laatsch et al. 2008). Während die immunzytochemische Detektion des LDLR vorwiegend zu einer Plasmamembranfärbung führt, zeigte sich LRP1 in perinukkleären, vesikulären Strukturen. In Abbildung 4-11 ist die Lokalisation von LRP1 im Vergleich zum LDLR in HuH7-Zellen dargestellt.

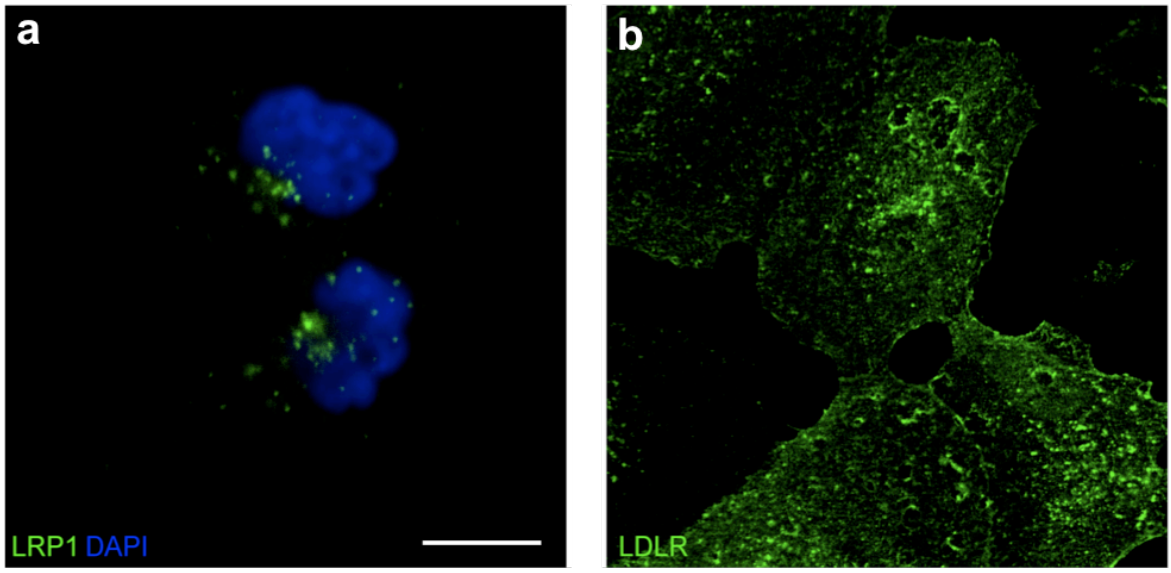

Abb. 4-11: Intrazelluläre Lokalisation von LRP1 im Vergleich zum LDLR in HuH7-Zellen

In HuH7-Zellen lässt sich LRP1 in perinukleären Vesikeln detektieren (a). Dem gegenüber führt eine immunzytochemische Anfärbung des LDLR zu einer Färbung der Plasmamembran (b). Aus technischen Gründen enthält (b) keine Zellkernfärbung.
Skalierungsbalken: 10 µm

(Mit freundlicher Genehmigung von J. Heeren und A. Laatsch, Hamburg, Deutschland)

Um zu überprüfen, ob diese Beobachtungen auch für das HepaRG-Zellmodell gelten, wurde LRP1 zunächst immunzytochemisch angefärbt. Anschließend wurden neben LRP1 weitere, intrazelluläre Markerproteine detektiert, um eine eventuelle Kolokalisation mit dem LRP1-Kompartiment aufzuzeigen. Bei den Markerproteinen

handelte es sich neben dem LDLR um EEA1 (frühe Endosomen), AP1 (Golgi-Marker) sowie Rab5 (*Clathrin-coated-vesicles*).
Abbildung 4-12 zeigt die intrazelluläre Lokalisation von LRP1 in HepaRG-Zellen sowie die Kolokalisation des LRP1-Kompartiments mit frühen Endosomen.

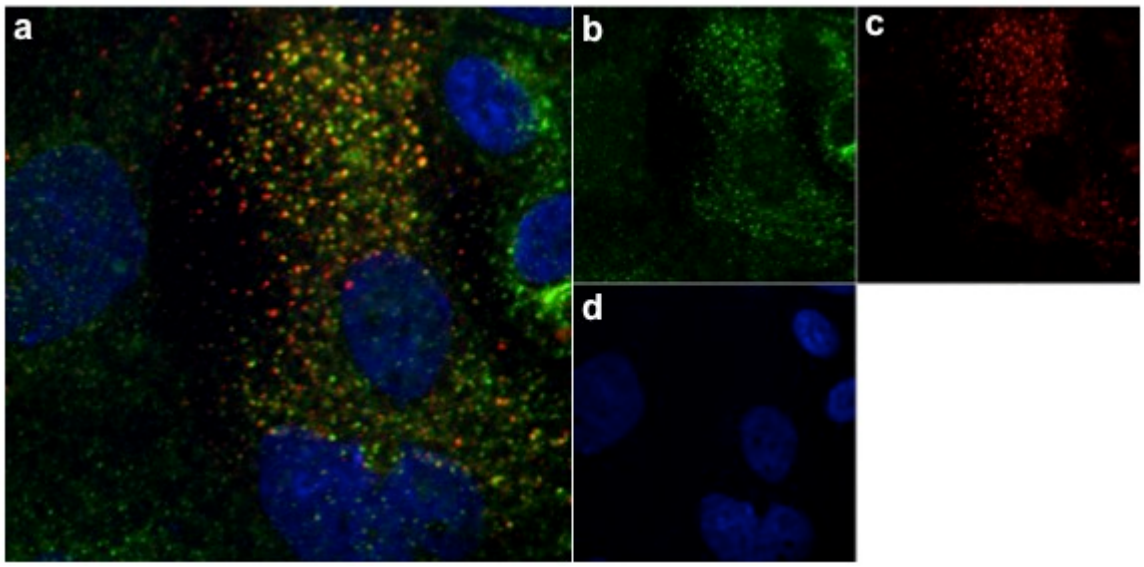

Abb. 4-12: Intrazelluläre Lokalisation von LRP1 sowie Kolokalisation mit EEA1 in HepaRG-Zellen

Ebenso wie in HuH7-Zellen zeigt sich auch für HepaRG-Zellen ein typisches, endosomales Verteilungsmuster von LRP1. Die häufig beobachtete perinukleäre Lokalisation dieser Vesikel ist im rechten Bildrand von (a) und (b) erkennbar. Immunzytochemisch angefärbtes LRP1 kolokalisiert mit EEA1. Die Kolokalisation ergibt sich aus der Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale von LRP1 (grün; b) und EEA1 (rot; c) als gelbes Signal (a). Eine Kolokalisation mit AP1 (Golgi) bzw. Rab5 (Clathrin-coated-vesicles) konnte nicht nachgewiesen werden. Die Kernfärbung mittels DAPI stellt sich als blaues Signal (d) dar.

Auch in HepaRG-Zellen stellt sich immunzytochemisch angefärbtes LRP1 (grün) in vesikulären Strukturen dar. Hierbei zeigt sich eine Kolokalisation mit frühen Endosomen (rot), die in Abbildung 4-12 (a) durch die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale als gelbe Punkte zu erkennen ist.
Eine Kolokalisation mit anderen untersuchten Markerproteinen konnte für LRP1 nicht nachgewiesen werden.

4.4 Insulinsensitivität und Partikelaufnahme

Eine Dysregulation in den verschiedenen Ebenen der Insulinsignaltransduktion kann häufig in onkogen transformierten Zellen beobachtet werden (Mamane et al 2006). Nicht selten geht die Dedifferenzierung von Tumorzellen dabei mit einem Verlust der Insulinsensitivität einher. Die daraus resultierende Diskrepanz zu physiologischen Verhältnissen kann die Relevanz eines Zellmodells daher - abhängig von der jeweiligen Fragestellung - limitieren.

Es konnte gezeigt werden, dass Insulin in der postprandialen Phase maßgeblich an der Aufnahme von TRL in die Leber beteiligt ist, da es zu einer Translokation von LRP1 an die Zellmembran führt (Laatsch et al. 2008). Ein insulinsensitives Leberzellsystem wäre demnach für Fragestellungen rund um den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel wünschenswert.

Ziel der nachfolgend vorgestellten Ergebnisse war es, das HepaRG-Zellmodell bezüglich einer Insulinstimulation näher zu untersuchen. Neben einem direkten Effekt des Hormons auf die Signalkaskade seines Rezeptors stehen die funktionalen Aspekte bezogen auf LRP1 im Vordergrund.

4.4.1 Insulinabhängige Phosphorylierung der Insulinrezeptor-Signaltransduktionskaskade

Um den Effekt von Insulin auf die Phosphorylierungszustände der in den Signaltransduktionsweg des Insulinrezeptors eingebundenen Proteine zu untersuchen, wurden HepaRG-Zellen in den entsprechenden Differenzierungsstadien mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (zwischen 10 nM und 500 nM) für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Zellprotein wurde in einem semiquantitativen Western-Blot unter Verwendung eines AK-Cocktails (siehe 3.2.5) untersucht. Abbildung 4-13 gibt im Sinne einer besseren Interpretierbarkeit der Ergebnisse neben einer Übersicht der beteiligten Proteine Auskunft über das zu erwartende Verteilungsmuster der ECL-Banden.

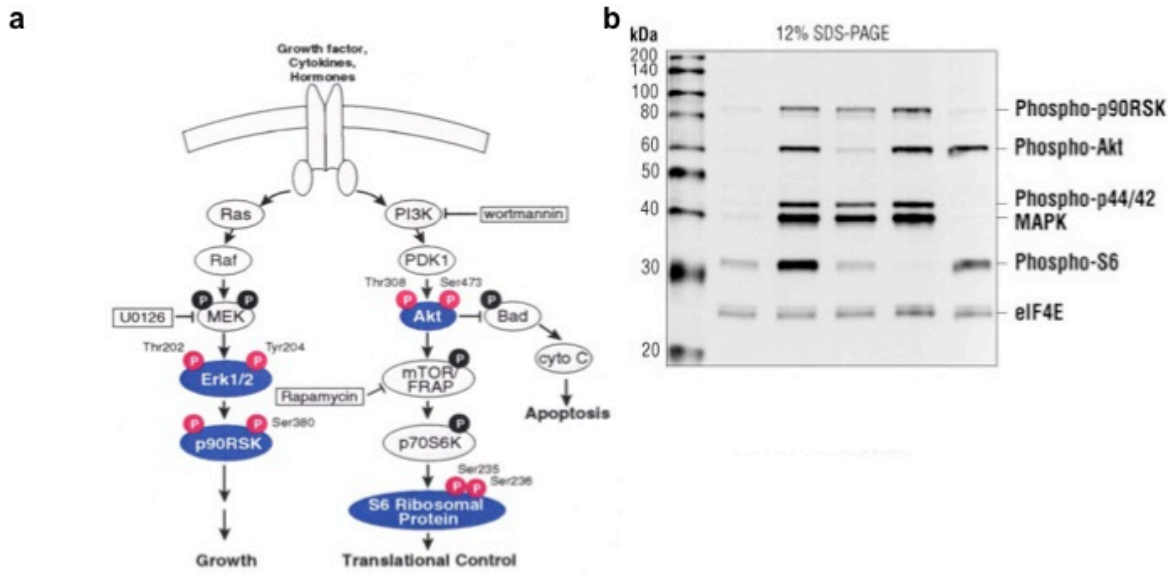

Abb. 4-13: Übersicht der in den Signaltransduktionsweg des IR eingebundenen Proteine

Dargestellt sind sowohl die in die Insulinkaskade involvierten Proteine (a), als auch das zu erwartende Verteilungsmuster der ECL-Banden (b). Ausführlicher wird die Signaltransduktion dieses Hormons in Kap. 2.1.2 beschrieben.

(Modifiziert nach den Angaben des Herstellers: Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA)

Da im Gegensatz zu den Herstellerangaben Gradientengele verwendet wurden, weichen die absoluten Bandenpositionen hiervon ab. Abbildung 4-14 zeigt die Phosphorylierungszustände der in den Signaltranduktionsweg des Insulinrezeptors eingebundenen Proteine im HepaRG-Zellmodell. Neben den Differenzierungsstadien d14, d28- und d28+, die jeweils mit Insulinkonzentrationen zwischen 0 nM und 500 nM stimuliert wurden, ist zum Vergleich der Effekt einer bereits geringen Insulinkonzentration auf HuH7-Zellen gezeigt.

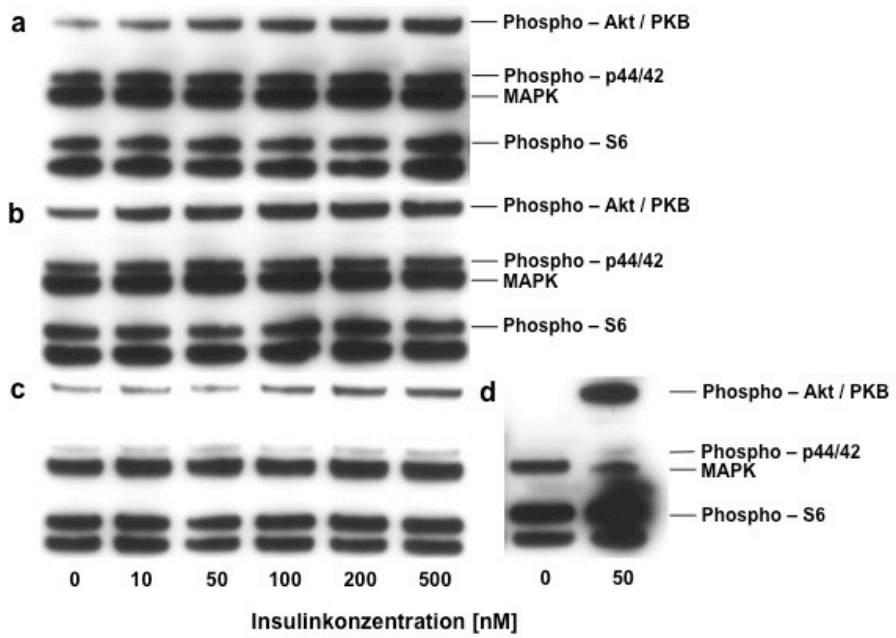

Abb. 4-14: Insulinabhängige Phosphorylierung der IR-Signaltransduktionskaskade in HepaRG- und HuH7-Zellen

Die Inkubation der jeweiligen Zelllinie mit Insulin erfolgte für exakt 15 Minuten. Anschließend wurden gleiche Mengen an Protein für die SDS-PAGE aufgetragen. Mittels Western-Blot und spezifischer Antikörper wurden die Phosphorylierungszustände der IR-Signaltransduktionskaskade detektiert. Abgebildet sind d14 (a), d28- (b), d28+ (c) und HuH7-Zellen (d). In HuH7-Zellen scheint die Phosphorylierung nach einem An/Aus-Prinzip zu erfolgen. Dagegen zeigt sich für HepaRG-Zellen ein gradueller, dosisabhängiger Effekt, zumindest auf Ebene von Phospho-Akt/PKB. Eine Differenzierung der HepaRG-Zellen mit DMSO scheint grundsätzlich eine reduzierende Wirkung auf die Grundphosphorylierung zu haben.

In Abbildung 4-14 ist ein insulininduzierter, dosisabhänger Effekt auf Ebene des Phospho-Akt/PKB zu erkennen. Während in HuH7-Zellen die Phosphorylierung dieses Proteins nach einem An/Aus-Prinzip zu erfolgen scheint, ist im Falle der HepaRG-Zellen ein gradueller, mit zunehmender Insulinkonzentration ansteigender Phosphorylierungseffekt zu sehen.

Auch wenn bezüglich des Insulineffekts zwischen den jeweiligen Differenzierungsstadien von HepaRG mit Ausnahme von Phospho-Akt/PKB kaum ein Unterschied erkennbar wird, so fällt doch auf, dass eine 28-tägige Differenzierung mit DMSO die Grundphosphorylierung der in den Signaltransduktionsprozess involvierten Proteine zu reduzieren scheint. Dieses ist v.a. auf der Ebene der Phospho-Akt/PKB sowie des Phospho-p44/42 zu sehen.

Die für HuH7-Zellen beobachtete massive Phosphorylierung auf Ebene des Phospho-S6 bei bereits geringen Insulinkonzentrationen ist im HepaRG-Zellmodell

zu keinem Differenzierungsstadium detektierbar. Vielmehr führt eine Steigerung der Insulinstimulation über physiologische Werte hinaus zu einem Sistieren der Phosphorylierungsrate auf nahezu allen Ebenen. Ein insulininduzierter Effekt bezüglich des Phospho-S6 bleibt für HepaRG lediglich zu erahnen.

4.4.2 Darstellung der insulinabhängigen Aufnahme mittels Fluoreszenzdetektion

Nachdem die in Kapitel 4.3 präsentierten Ergebnisse ein für LRP1 typisches intrazelluläres Verteilungsmuster im HepaRG-Zellmodell erahnen lassen, geben die in 4.4.1 gezeigten Resultate Hinweise auf einen graduellen, dosisabhängigen Insulineffekt. Ob eine Insulinstimulation tatsächlich zu einer LRP1-vermittelten Mehraufnahme führt, wurde daher mittels fluorochromassoziierter LRP1-Liganden untersucht. Da gezeigt werden konnte, dass LRP1 identisch mit dem Rezeptor für α2-Makroglobulin ist (Strickland et al. 1990), wurde neben dem LRP1-Liganden RAP (Willnow et al. 1996b) aktiviertes α2-Makroglobulin (α2M*) an dieser Stelle verwendet.

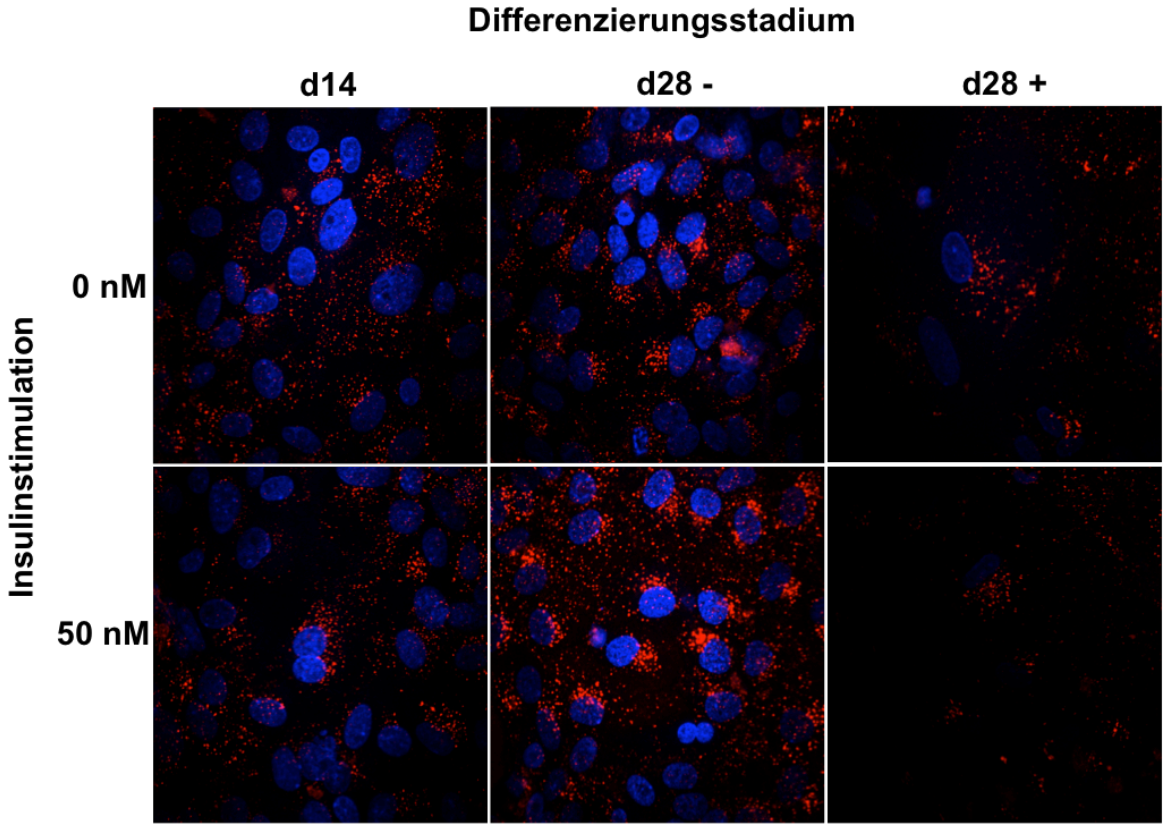

Abb. 4-15: Insulinabhängige Aufnahme von RAP-Cy3 in HepaRG-Zellen

Vor der Inkubation mit 10 µg·ml^{-1} Rap-Cy3 wurden die Differenzierungsstadien d14, d28- sowie d28+ wahlweise +/- Insulin für 10 Minuten vorinkubiert. Im Anschluss enthielten auch die jeweiligen Aufnahmeansätze die entsprechende Insulinkonzentration. Neben der RAP-Cy3 Aufnahme (rot), sind DAPI gefärbte Zellkerne zu erkennen (blau).

Abbildung 4-15 zeigt die insulinabhängige Aufnahme von RAP-Cy3. Es ergibt sich ein typisches intrazelluläres Verteilungsmuster der RAP-Vesikel mit perinukleärer Anordnung. Die Gesamtaufnahme scheint insulinunabhängig zwischen den einzelnen Differenzierungsstadien zu variieren und erreicht an d28- einen Höhepunkt. Bezüglich des Insulineinflusses lässt sich lediglich für d28- eine gesteigerte Aufnahme vermuten. Ferner lässt sich im Hinblick auf den Einfluss von Insulins eine Zunahme der Größe einzelner RAP-Vesikel an d28- dokumentieren.
Die Ergebnisse der Aufnahmeexperimenten mit Cy3-assoziiertem α_2M* sind in Abbildung 4-16 dargestellt.

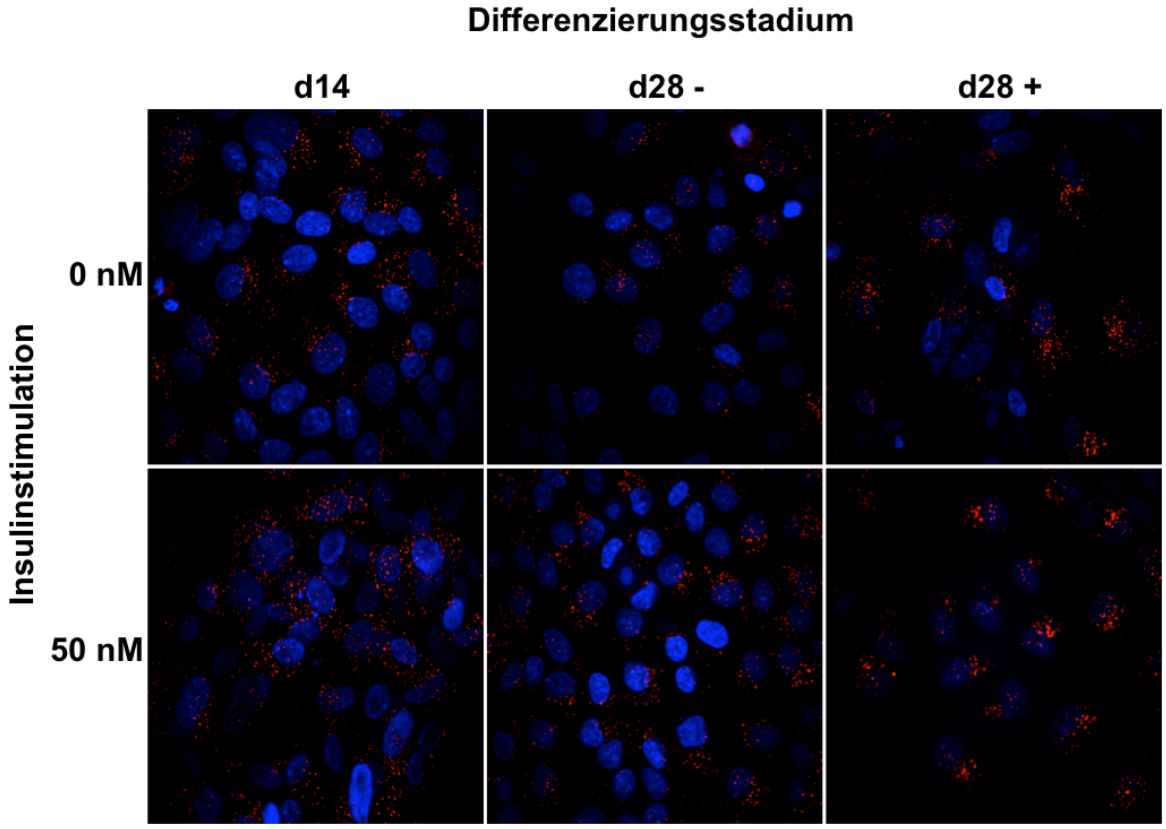

Abb. 4-16: Insulinabhängige Aufnahme von α2M*-Cy3 in HepaRG-Zellen

Vor der Inkubation mit 10 µg·ml^{-1} α2M-Cy3 wurden die Differenzierungsstadien d14, d28- sowie d28+ wahlweise +/- Insulin für 10 Minuten vorinkubiert. Im Anschluß enthielten auch die jeweiligen Aufnahmeansätze die entsprechende Insulinkonzentration. Neben der α2M*-Cy3 Aufnahme (rot), sind DAPI gefärbte Zellkerne zu erkennen (blau).*

Analog den Ergebnissen in Abbildung 4-15 (RAP) zeigt sich auch für α2M* ein für die Aufnahme über LRP1 typisches, endosomales Aufnahmemuster. Die für d28- vermutete insulinabhängige Mehraufnahme von RAP-Cy3 (s.o.) könnte man auch bezüglich α2M* an d28- optisch annehmen. Gleiches gilt für den Differenzierungsstatus d28+. Definitive Aussagen über eine quantitative Mehraufnahme unter dem Einfluss von Insulin lassen sich aus Abbildung 4-16 jedoch nicht formulieren. Im Gegensatz zu RAP-Cy3, wo eine insulinabhängige Zunahme der Vesikelgröße an d28- zu beobachten war, scheint dieses Phänomen für α2M* an d28+ zuzutreffen.

Es lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse der fluorochromassoziierten Aufnahmeassays somit ebenfalls einen insulininduzierten Effekt erahnen lassen, quantitative Aussagen bezüglich der Aufnahme unter dem Einfluss von Insulin lassen sich hieraus jedoch nicht ableiten.

4.4.3 Quantitative Analyse der insulinstimulierten Partikelaufnahme

Die beschriebenen Aufnahmeexperimente mit fluorochromassoziierten LRP1-Liganden zeigten zwar sowohl differenzierungs- als auch insulinabhängige Unterschiede bezüglich des endosomalen Verteilungsmusters, eine quantitative Beurteilung der jeweiligen Aufnahme ist daraus jedoch nicht möglich. Für eine quantitative Analyse der insulinstimulierten Ligandenaufnahme wurden daher ausgewählte LRP1-Bindungspartner mit ^{125}I radioaktiv markiert.

Wie bereits beschrieben, ließ sich für RAP-Cy3 an d28- eine vermehrte Aufnahme unter dem Einfluss von Insulin am ehesten vermuten, weshalb dieser LRP1-Ligand auch im Rahmen dieser experimentellen Serie verwendet wurde. Daneben wurden ^{125}I-CR/ApoE verwendet, deren LRP1-vermittelte Aufnahme aus dem zirkulierenden Blutstrom eine hohe Bedeutung zugeschrieben wird (Laatsch et al. 2008). Durch die rezeptorvermittelte Endozytose dieser TRL wirkt LRP1 in der postprandialen Phase entscheidend einer Lipidakkumulation entgegen.

Analog zu den fluorochromassoziierten Aufnahmeassays wurden HepaRG-Zellen mit physiologischen Insulinkonzentrationen (50 nM) vorinkubiert. Danach erfolgte die Aufnahme der radioaktiv markierten Liganden. Das quantitative Ergebnis dieser Aufnahme wurde anschließend in einem Gamma-Counter gemessen. In Abbildung 4-17 ist die Aufnahme von radioaktiv markiertem RAP in HepaRG- und HuH7-Zellen graphisch dargestellt.

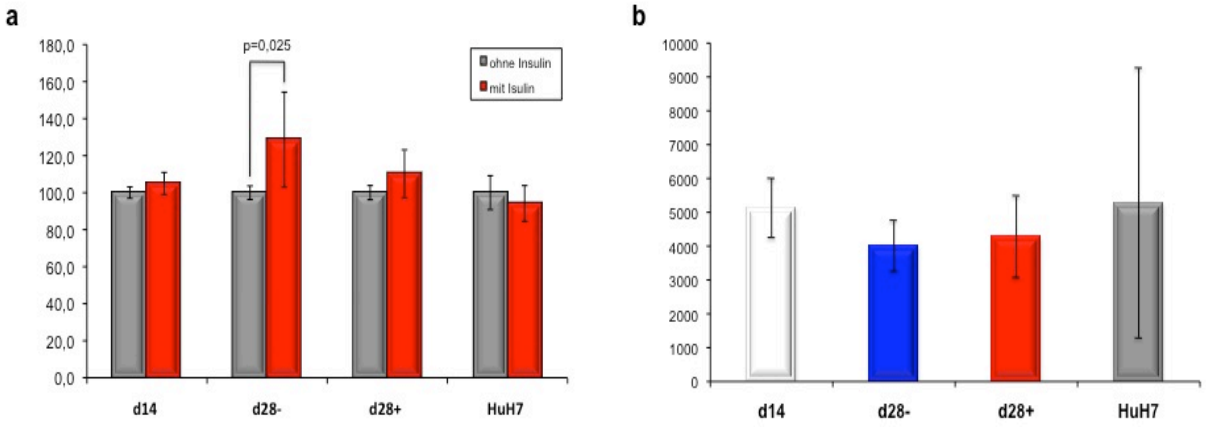

Abb. 4-17: Quantitative Analyse der insulinstimulierten Aufnahme von radioaktiv markiertem RAP in HepaRG- und HuH7-Zellen

Die Zellen wurden 120 Minuten gehungert und 10 Minuten mit 50 nM Insulin vorinkubiert. Die anschließende Aufnahme der radioaktiv markierten Liganden erfolgte für exakt 20 Minuten. Die Konzentration von ^{125}I-RAP im Aufnahmeansatz betrug dabei 10 µg/ml. Nach dem Lysieren der Zellen wurde die quantitative Aufnahme als Counts/Minute in einem Gamma-Counter gemessen, wobei die Aufnahme ohne den Einfluss von Insulin als 100% festgelegt wurde (a).
In (b) sind die gemessenen Counts/Minute als Absolutwerte gegeneinander dargestellt.
Unter dem Einfluss von Insulin zeigt sich bezüglich RAP eine signifikante Mehraufnahme an d28-.
Die in dieser Abbildung dargestellten Ergebnisse ergeben sich aus drei unabhängigen Experimenten.

Die bereits in Kap. 4.4.2 in der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung vermutete insulininduzierte Mehraufnahme von RAP an d28- zeigte sich auch in dieser experimentellen Serie. Für die übrigen Differenzierungsstadien von HepaRG-Zellen ließ sich dieser Insulineffekt bezüglich RAP jedoch nicht nachweisen. Eine insulininduzierte Mehraufnahme für HuH7-Zellen konnte in den jeweiligen Experimenten nicht beobachtet werden. Stattdessen zeigte sich teilweise eine negative Korrelation zwischen dem Einfluss von Insulin und der RAP-Aufnahmefähigkeit für HuH7-Zellen.

Die absolute Aufnahme der radioaktiv markierten Partikel variierte zwischen den verschiedenen Differenzierungsstadien der HepaRG-Zellen geringfügig, wohingegen für HuH7-Zellen z.T. größere Unterschiede in den einzelnen Experimenten messbar waren.

Dass die Verwendung von DMSO einen Einfluss auf die insulinstimulierte Aufnahmefähigkeit von LRP1-Liganden hat, beweist Abbildung 4-18. Zu sehen ist das Ergebnis der Aufnahme radioaktiv markierter CR/ApoE.

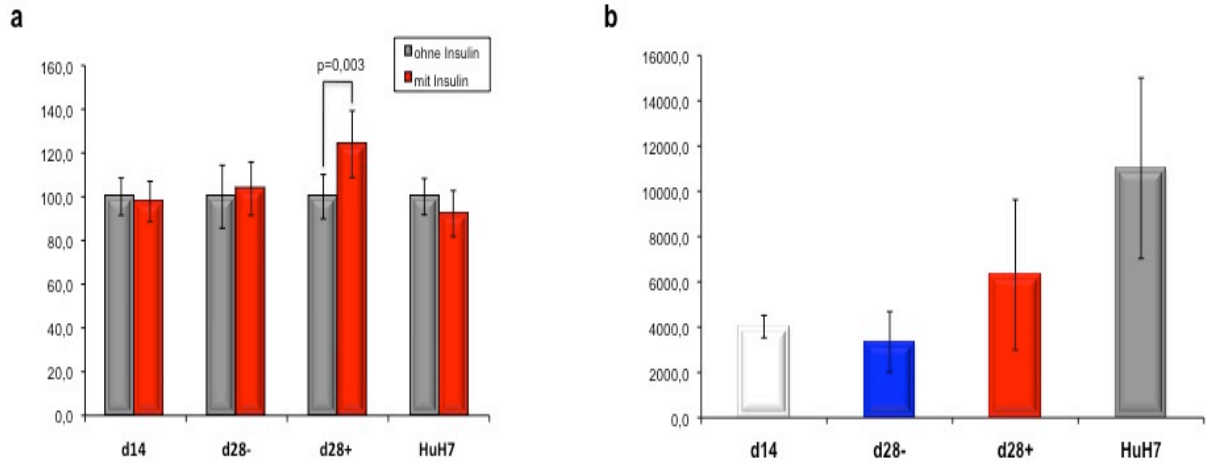

Abb. 4-18: Quantitative Analyse der insulinstimulierten Aufnahme von radioaktiv markierten CR/ApoE in HepaRG- und Huh7-Zellen

Die Zellen wurden 120 Minuten gehungert und 10 Minuten mit 50 nM Insulin vorinkubiert. Die anschließende Aufnahme der radioaktiv markierten Liganden erfolgte für exakt 20 Minuten. Die Konzentration von ^{125}I-CR/ApoE im Aufnahmeansatz betrug dabei 5 µg/ml. Nach dem Lysieren der Zellen wurde die quantitative Aufnahme als Counts/Minute in einem Gamma-Counter gemessen, wobei die Aufnahme ohne den Einfluss von Insulin als 100% festgelegt wurde (a).
In (b) sind die gemessenen Counts/Minute als Absolutwerte gegeneinander dargestellt.
Unter dem Einfluss von Insulin zeigt sich bezüglich CR/ApoE eine signifikante Mehraufnahme an d28+.
Die in dieser Abbildung dargestellten Ergebnisse ergeben sich aus drei unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz zu RAP, für das ein insulinabhängiger Effekt an d28- (Abb. 4-17) zu beobachten war, ist für CR/ApoE eine insulininduzierte Mehraufnahme an d28+ erkennbar. Alle übrigen Differenzierungsstadien zeigten indes keinen insulininduzierten Effekt. Auch für HuH7-Zellen konnte keine Mehraufnahme registriert werden. Hier zeigte sich - analog der Beobachtung bei der RAP-Aufnahme - ein tendenziell negativer Einfluss von Insulin auf die Aufnahmefähigkeit.
Bezüglich der absoluten Aufnahme lagen auch hier die Messergebnisse für HepaRG-Zellen nah beieinander, die für HuH7 ermittelten Werte waren etwas höher, zeigten jedoch erneut größere interexperimentelle Unterschiede.

5 Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollen einen Beitrag dazu liefern, die Verwendbarkeit des humanen Leberzellmodels HepaRG im Bereich des Lipoproteinstoffwechsels zu erforschen.
Neben einer morphologischen Grundcharakterisierung sind die Expressionsprofile wichtiger, am Lipoproteinstoffwechsel beteiligter Proteine, Bestandteile der vorliegenden Arbeit. Des Weiteren stellen damit zusammenhängende zellbiologische Eigenschaften des HepaRG-Zellmodells zentrale Bereiche dar.
Im Folgenden werden sowohl die methodischen Aspekte, als auch die Bedeutung der daraus gewonnen Ergebnisse diskutiert.

5.1 Interpretation der Zellmorphologie

Anhand der Beobachtungen während des 28-tägigen Differenzierungsprotokolls wird eine Zelllinie beschrieben, die nach dem Aussetzen in einer Dichte von ca. 60.000 Zellen/cm^2 eine zunächst unspezifische Morphologie zeigt. Dieses Bild ändert sich während des einige Tage dauernden Proliferationsprozesses nur wenig, bis sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hat. Durch die anhaltende Kultivierung des mittlerweile superkonfluenten Zellrasens und unter dem Einfluss von 1,5% DMSO, beginnend mit dem 15. Differenzierungstag, bietet das HepaRG Zellmodell dem Betrachter ein heterogenes Bild, das zwei unterschiedliche Zellpopulationen voneinander unterscheiden lässt. Zum einen zeigen sich granuläre, hepatozytenähnliche Zellen mit vielen kanalikulären Strukturen, die dem Bild einer primären Hepatozytenkultur stark ähneln. Diese Zellen werden von abgeflachten, etwas größeren Zellen umgeben. Die von Gripon et al. 2002 durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchung der hepatozytenähnlichen Zellen zeigte dabei über Desmosomen fest miteinander verbundene Zellen, mit gallengangsähnlichen Strukturen und einigen Mikrovilli. Zudem konnten zahlreiche Glykogengranula nachgewiesen werden.
Zum Nachweis von tight junctions verwendeten Parent et al. 2004 einen Marker (Zona Occludens Marker 1; ZO-1), mit dessen Hilfe die interzellulären Verbindungen dargestellt und von gallengangsähnlichen Strukturen klar abgegrenzt werden konnten. Eine intensivere Betrachtung dieser Strukturen erfolgte durch Le Vee et al

2006. So konnten im Vergleich zu HepG2-Zellen sowohl die Expression zahlreicher sinusoidaler, als auch canaliculärer Transportproteine nachgewiesen werden. Dabei war die beobachtete Funktionalität nahezu identisch mit der, die für primäre Hepatozyten gemessen wurde. Eine induzierbare Expressionssteigerung lässt zudem vermuten, dass regulatorische Signalwege im HepaRG-Zellmodell diesbezüglich funktionsfähig sind.

Der Verlust des hepatozytären Phänotyps nach Passagieren der Zellen - also während der Proliferationsphase - deckt sich mit den morphologischen Veränderungen, die für primäre Hepatozytenkulturen beobachtet wurden. Hier konnte gezeigt werden, dass sich plötzlich ändernde Kulturbedingungen, bzw. der Verlust bestimmter Mediatoren, zu einem Übertritt in die G1-Phase des Zellzyklus führt und zahlreiche, für Hepatozyten spezifische Charakteristika, verloren gehen (Isom et al. 1987; Corlu et al. 1991; Loyer et al. 1996). Trotz vorübergehender funktioneller Einbußen bleibt auch während dieser Zeit eine gewisse hepatozytäre Restfunktion von HepaRG erhalten, was die anhaltende Expression von Albumin in dieser Phase zeigt (Gripon et al. 2002).

Die Beobachtung, dass HepaRG-Zellen initial die Fähigkeit besitzen sich in zwei verschiedene Richtungen zu differenzieren, wurde in einem Experiment von Parent et al. 2004 überprüft. 24 Stunden nach dem Passagieren einer HepaRG-Kultur wurden Kulturflaschen, die lediglich eine HepaRG-Zelle enthielten, markiert und für zehn Wochen kultiviert. Nach diesem Zeitraum konnte in jeder der Kulturflaschen die charakteristische Morphologie mit zwei unterschiedlichen Populationen von Zellen nachgewiesen werden. Unter der Verwendung von *epidermal growth factor* (EGF), einem primären Mitogen für Hepatozyten unter Kulturbedingungen (Block et al. 1996) zeigte sich anschließend eine deutliche Differenzierungstendenz in Richtung der hepatozytenähnlichen Zellen mit Ausbildung von mehr gallengangsähnlichen Strukturen.

Die morphologische Präsentation der HepaRG-Zellen im Rahmen der durchgeführten Experimente deckt sich weitestgehend mit der in der Literatur beschriebenen. Anlass für die Erstellung verschiedener Expressionsprofile (Kap. 4.2) von Proteinen des Lipoproteinstoffwechsels waren zudem Daten, die Rückschlüsse über die funktionalen Eigenschaften dieses Zellmodells erlauben. Bereits mehrfach konnten dabei Vorteile des HepaRG-Zellmodells gegenüber anderen Hepatomzelllinien

aufgezeigt werden. Gripon et al. untersuchten 2002 leberspezifische mRNA Levels für Albumin, dem glykolytischen Enzym Aldolase B und einiger Cytochrom P450-Enzyme und verglichen diese Werte mit denen von humanen Leberbiopsien und der humanen Hepatomzelle HepG2. Insbesondere unter dem Einfluss von DMSO zeigten sich für HepaRG-Zellen Expressionslevel, die quantitativ an die der Leberbiopsien heranreichten. Auch die für andere Hepatomzelllinien beschriebene Unfähigkeit Phase 1- und Phase 2-Metabolisierungsenzyme in befriedigender Menge zu exprimieren trifft für HepaRG nicht zu. Die quantitative Analyse von Gripon et al. zeigte, dass bis auf wenige Ausnahmen die Enzymaktivitäten der mit DMSO differenzierten HepaRG-Zellen im Bereich derer von primären, humanen Hepatozyten lagen und damit im Vergleich zu HepG2-Zellen signifikant höher waren.
Zusammenfassend lässt sich das morphologische Bild einer Zelllinie präsentieren, dass einer primären Hepatozytenkultur stark ähnelt. Zusammen mit der funktionalen Expression vieler Proteine sowie erhaltenen Regulationsmechanismen ergeben sich mögliche Vorteile gegenüber anderen, teilweise dedifferenzierten Zellen.

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin und wird häufig zur labordiagnostischen Markierung von proliferierenden Zellen verwendet. Der *BrdU labeling index* dient dabei als Marker für die Proliferationsquote von Zellen. Für HepaRG-Zellen wurde von Parent et al. 2004 ein *BrdU labeling index* von ungefähr 90% an Tag 2, und noch immerhin 20% an Tag 14 festgestellt. Dieses führt zu der Annahme, dass auch nach dem Erreichen vollständiger Konfluenz geringgradige proliferative Aktivität vorliegt. Am 28. Tag der Differenzierung betrug dieser *labeling index* schließlich nahezu 0%, was Parent et al. zu der Vermutung kommen ließ, dass am Ende des Differenzierungsprotokolls keine Proliferation mehr stattfindet. Das Proliferationsverhalten der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HepaRG-Zellen schien sich dementsprechend zu verhalten, die von Parent et al. gemachten Beobachtungen wurden allerdings nicht experimentell bestätigt.
Das morphologische Erscheinungsbild ausdifferenzierter HepaRG-Zellen ließ das für Hepatozyten typische Vorliegen mehrerer Zellkerne in einigen Zellen vermuten. Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Differenzierungsstadien mit einem DNA-Farbstoff (Acridine Orange) markiert und zytome-

trisch analysiert. Als repräsentative Probe für die Proliferationsphase von HepaRG wurde d4 gewählt. Um einen etwaigen Einfluss von DMSO zu beobachten wurden zusätzlich die Differenzierungsstadien d28- und d28+ vermessen. Als Vergleich diente eine konfluente HuH7-Zellpopulation. Unter der Annahme, dass eine Verdopplung des DNA-Gehalts einer Zelle analog zu einer Verdopplung des im Fluoreszenzkanal gemessenen Intensitätssignals führt, lassen sich an dieser Stelle Vermutungen über das Vorliegen mehrer Zellkerne in den jeweiligen Differenzierungsstadien formulieren.

Unter der Verwendung des Lebendzellfarbstoffs Acridine Orange wurden bei der zytometrischen Messung der HepaRG-Zellen in den Messbereichen, in denen ungefärbte Zellen vermutet wurden (Gate A), keine Signale detektiert (siehe Abb. 4-7). Dieses entspricht den Erwartungen und bedeutet, dass der Lebendzellfarbstoff vermutlich mit allen zu untersuchenden Zellen interagiert. Während sich die Messergebnisse von HuH7 (siehe Abb. 4-6, (c)) und d28- (siehe Abb. 4-7, (b)) als nahezu identisch erweisen, sind Besonderheiten für die Differenzierungsstadien d4 und d28+ zu beobachten. Die gemessenen Intensitätssignale an d4 zeigen zwar analog zu den übrigen fluorochromgekoppelten Messungen einen Doppelpeak, die beobachteten „Zwischenpeaks“ finden sich jedoch nur hier. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich bei d4 um die Einzige nichtkonfluente Zellpopulation handelt, könnte man vermuten, dass es sich bei den „Zwischenpeaks“ um Zellen handelt, die sich in der S-Phase ihres Zellzyklus befinden. Während HuH7, d4 und d28- in etwa 1/3 der Fälle ein doppeltes Intensitätssignal aufweisen, liegen an d28+ lediglich 11% der Messereignisse in diesem Bereich (Gate C). Möglich wäre eine apoptoseinduzierende Wirkung von DMSO auf polyploide Zellen, hierfür sind in der Literatur allerdings bislang keine Anhaltspunkte beschrieben worden.

Neben anderen humanen Zellen (z.B. Kardiomyozyt, Megakaryozyt) ist auch für Hepatozyten eine Mehrkernigkeit bzw. Polyploidie beschrieben worden und prinzipiell als nicht ungewöhnlich anzusehen. Die Tatsache, dass Polyploidisation in den Lebern der meisten Säuger bereits ab einem sehr frühen Zeitpunkt zu beobachten ist, lässt auf eine protektive Funktion schließen (Medvedev 1986). Verschiedenste Hypothesen bezüglich protektiver Mechanismen, die eine Polyploidisierung mit sich bringt, wurden dabei aufgestellt (Medvedev 1972; Evans 1976; Gahan 1977; Benedict und Jones 1979). Auffällig sind an dieser Stelle jedoch die unterschiedli-

chen Ergebnisse bezüglich der Verwendung von DMSO, was auf einen direkten Einfluss des Differenzierungszusatzes schließen lässt.
Das Differenzierungspotential von DMSO gegenüber HepaRG ist - nicht nur durch die HBV-Infektionsversuche von Gripon et al. - bekannt. Dass DMSO zusätzlich zu einer Inhibierung der Zellproliferation führt, konnte sowohl *in vivo* (Bucher und Weir 1976; Bucher et al. 1977), als auch in Primärkulturen (Richman et al. 1976; Friedman et al. 1981; McGowan et al. 1981; Marceau et al. 1982; McGowan und Bucher 1983; Baribault et al. 1985), gezeigt werden. Dieses entspricht der 1980 gemachten Beobachtung von Higgins und Borenfreund, dass DMSO zu einem Verlust von proliferativer Aktivität in Hepatomzellen führt. Die molekularen Mechanismen hierfür sind allerdings bis heute unklar.

5.2 Proteinexpressionsprofil

Ziel der durchgeführten Experimente war es, die Zelllinie HepaRG auf die Expression essenzieller, am Lipoproteinstoffwechsel beteiligter Apolipoproteine sowie Oberflächenproteine zu untersuchen. Als Membranrezeptoren übernehmen der LDLR sowie LRP1 zentrale Aufgaben. Während der LDLR als ApoB100- und ApoE-bindender Endozytoserezeptor maßgeblich an der Klärung im Blut zirkulierender Lipoproteine beteiligt ist, gilt LRP1 als entscheidender Lipoproteinrezeptor in der postprandialen Phase (Rohlmann et al., 1998).
Bezüglich der Expressionslevel von LDLR und LRP1 zeigen HepaRG-Zellen sowie die zusätzlich präparierten HuH7-Zellen deutliche Unterschiede. Vor dem Hintergrund der fehlenden Reproduzierbarkeit der Expressionsprofile für den LDLR in dieser Arbeit scheinen HuH7- eine höhere Menge an LDLR zu exprimieren als HepaRG-Zellen. Einige Faktoren erschweren an dieser Stelle einen Vergleich zwischen HuH7- und HepaRG-Zellen: Zur Reduktion individueller Messfehler wurde die Quantifizierung der Expressionslevel für den LDLR (ImageQuant, Version 5.2) zwar mehrfach durchgeführt, Grundlage war dabei jedoch stets der gleiche Röntgenfilm. Für eine Aussage über quantitative Unterschiede zwischen beiden Zelllinien wären mehrere, unabhängig voneinander durchgeführte Experimente wünschenswert.

Zudem erschwert die Verwendung unterschiedlicher Kälberseren (siehe Kap. 3.3.1) während der Kultivierung beider Zelllinien eine Interpretation der quantitativen Messergebnisse. Fragestellungen rund um den LDLR sind schon lange Gegenstand der Lipoproteinforschung und es ist bekannt, dass der LDLR einer negativen Regulation durch den zellulären Cholesterolgehalt unterliegt. Der Gebrauch unterschiedlicher Zellkulturmedien könnte dabei Einfluss auf die LDLR-Expression haben. Zwar unterscheiden sich die verwendeten Zellkulturmedien auch bezüglich des Zusatzes von Insulin und Hydrocortison, es konnte aber für HuH7-Zellen gezeigt werden, dass Insulin keinen direkten Einfluss auf die LDLR-Expression zu haben scheint (Bartelt, unveröffentlichte Daten). Um eine vergleichende Aussage über die Expressionslevel des LDLR in HuH7- und HepaRG-Zellen treffen zu können, wäre bei ausreichender Detektierbarkeit des LDLR die Verwendung gleicher Kulturmedien ein möglicher methodischer Ansatz.

Bezüglich LRP1 ließ sich für die Differenzierungsstadien d14 und d28- eine Mehrexpression gegenüber HuH7-Zellen nachweisen (siehe Abb. 4-9). Der Einfluss von DMSO zeigte allerdings eine Minderung der Expression um ca. 50%. Eine ausführlichere Diskussion der LRP1-Expression zu den jeweiligen Differenzierungsstadien findet zusammen mit den insulinabhängigen Aufnahmeexperimenten in Kap. 5.3.3 statt.

ApoE ist das zentrale Apolipoprotein des TRL-Stoffwechsels und das Verhältnis seiner Expressionslevel in HuH7- und HepaRG-Zellen (siehe Abb. 4-9) deckt sich weitestgehend mit der Beobachtung für die übrigen, untersuchten Apolipoproteine (siehe Abb. 4-10). Während in FAO-Zellen lediglich ApoCI eine eindeutige Bande zugewiesen werden kann, präsentieren sich die Expressionslevel der HuH7-Zellen - mit Ausnahme von ApoCIII - gegenüber HepaRG-Lysaten als stark erhöht. Zelluläre Expressionslevel einiger Apolipoproteine scheinen dabei jedoch von der Zusammensetzung der jeweiligen Kulturmedien abhängig zu sein, weshalb für einen Vergleich der Expressionslevel zwischen den einzelnen Zelllinien Gleiches gilt wie für den LDLR.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Apolipoproteine, abhängig vom jeweiligen Differenzierungsstatus, in HepaRG-Zellen exprimiert werden. Diese Tatsache trifft, wie man am Beispiel der FAO-Zellen sieht, nicht auf alle Hepatomzelllinien zu.

Die Bedeutung von HepaRG auf dem Gebiet der Apolipoproteinforschung wurde erst kürzlich von der Forschergruppe um Nagasawa et al. (2007) belegt. Im HepaRG-Zellmodell konnten sie das ApoAIV-Gen als sensitiv für *peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR)-α-Agonisten identifizieren. PPAR gehören zur Gruppe der ligandenaktivierten Kernrezeptoren und übernehmen eine wichtige Rolle in der Lipid- und Glukosehomöostase (Keller und Wahli 1993). Bislang sind drei PPAR-Subtypen bekannt: PPARα, PPARγ und PPARδ. Während die Bedeutung von PPARδ für den Stoffwechsel noch weitestgehend unerforscht ist, wird PPARγ vorwiegend im Fettgewebe exprimiert (Kersten et al. 2000). PPARα wird überwiegend in den Geweben gefunden, die bezüglich Lipiden eine katabole Stoffwechsellage zeigen. Hierzu zählen v.a. Leber, Herz, Niere und die Muskulatur (Beck et al. 1992; Braissant et al. 1996; Auboeuf et al. 1997). Dabei reguliert PPARα Gene, die für eine vielzahl von Proteinen, die im Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus stehen, kodieren (Schoonjans et al. 1996a). So können z.B. einige der therapeutischen Effekte von Fibraten durch eine hepatische PPARα-Aktivierung erklärt werden (Catapano 1992; Shepherd 1993; Staels et al. 1998; Fruchart und Duriez 2006). Der in diesem Zusammenhang beobachtete vermehrte TRL-Katabolismus wird dabei zum einen auf die vermehrte Expression der LpL (Schoonjans et al. 1996b) sowie von ApoAV (Vu-Dac et al. 2003) zurückgeführt. Zum anderen wird hierfür eine verminderte Expression von ApoCIII (Malmendier et al. 1989; Hertz et al. 1995; Staels et al. 1995) verantwortlich gemacht. Die fibratinduzierte HDL-Erhöhung scheint dabei mit einem Anstieg der Serumspiegel von ApoAI und ApoAII assoziiert zu sein (Vu-Dac et al. 1995 und 1998; Berthou et al. 1996; Staels et al. 1998).

Als verwendetes Zellmodell lieferte HepaRG einen Beitrag zu der Entdeckung dieser komplexen Zusammenhänge. Vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, stellt die Expression zahlreicher weiterer Apolipoproteine in Aussicht, dass sich HepaRG-Zellen auch in anderen Bereichen des Apolipoproteinstoffwechsels als nützliches Zellsystem erweisen könnten.

5.3 Zellbiologische Eigenschaften von HepaRG

5.3.1 Intrazelluläre Lokalisation von LRP1

LRP1 kommt im postprandialen, hepatischen Lipoproteinstoffwechsel eine entscheidende Rolle zu: Zum einen fungiert es als regulierbarer Endozytoserezeptor für postprandial akkumulierende CR, zum anderen sorgt es über das Recycling von ApoE für eine Regeneration des HDL-assoziierten ApoE-Pools (Heeren et al. 2001). Aus diesem Grund wurde die intrazelluläre LRP1-Lokalisation in HepaRG-Zellen näher untersucht. Mit Hilfe der in Abb. 4-12 dargestellten Ergebnisse konnte für HepaRG-Zellen ein typisches, intrazelluläres Verteilungsmuster von LRP1 gezeigt werden. Wie bereits für andere Hepatomzelllinien beschrieben, stellt sich LRP1 auch in HepaRG-Zellen in perinukleären, vesikulären Strukturen dar. Dabei lässt sich eine Kolokalisation mit frühen Endosomen beobachten. Dieses erbringt zwar noch keinen Beweis für seine Funktionalität, lässt jedoch aufgrund der Übereinstimmung mit bekannten Modellen ein physiologisches LRP1 vermuten.

Es wurde bereits demonstriert, dass LRP1 in der postprandialen Phase insulinstimuliert aus seinen perinukleären Vesikeln an die Plasmamembran transloziert (Laatsch et al. 2008). Hier ist es zum einen als Endozytoserezeptor an der Klärung der hoch atherogenen CR beteiligt, die postprandial vermehrt im Blut zirkulieren. Zum anderen kommt es bei einer vermehrten Aufnahme von CR/ApoE über LRP1 zu einer schnelleren Regeneration (Recycling) des HDL-assoziierten ApoE-Plasmapools (Heeren et al. 2003), was eine weitere Aufnahme von CR verbessert, bis die postprandiale Lipidakkumulation vorüber ist.

Durch die Präsentation des LRP1-Kompartiments in HepaRG-Zellen ergeben sich bezüglich einer Verwendbarkeit dieses Zellmodells im Lipoproteinstoffwechsel zwei wesentliche Überlegungen: Aufgrund des sehr schönen endosomalen Verteilungsmusters, könnte HepaRG als Zellmodell für weitere Recycling-Assays dienen. Voraussetzung hierfür ist allerdings eine ausreichende LRP1-Funktionalität, die im Rahmen dieser Arbeit in LRP1-abhängigen Aufnahme-Assays untersucht wurde (s.u.). Zusätzlich stellt sich in diesem Zusammenhang vor dem Hintergrund einer insulininduzierten LRP1-Translokation die Frage einer möglichen Insulinsensitivität von HepaRG. Da bis dato kein humanes, insulinsensitives Leberzellmodell bekannt

ist, wäre eine Sensitivität gegenüber diesem zentralen Stoffwechselregulator für ein Leberzellmodell wünschenswert.

5.3.2 Phosphorylierungszustände in der IR-Signaltransduktionskaskade

Um HepaRG-Zellen auf eine mögliche Insulinsensitivität hin näher zu untersuchen, wurden neben einer Analyse der insulinabhängigen Phosphorylierungszustände in der IR-Signaltransduktionskaskade v.a. LRP1-abhängige Aufnahmeassays mit insulinstimulierten HepaRG-Zellen durchgeführt.

Nach der Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor kommt es zu einer Phosphorylierungskaskade verschiedener Proteine, von denen bestimmte Schlüsselenzyme, wie PI3K, Akt/PKB oder auch das ribosomale Protein S6 hervorzuheben sind. Dabei sind die involvierten Proteine in vielfältige zelluläre Prozesse eingebunden, die weit über die Glukosehomöostase hinausreichen. So begünstigen Mutationen in den Proteinen der Insulinsignalkaskade häufig eine onkogene Zelltransformation, da sie u.a. in Prozessen wie Zellwachstum und Zellteilung eine regulierende Funktion übernehmen. Im Umkehrschluss könnte man vermuten, dass sich aus unphysiologischen Phosphorylierungszuständen dieser Schlüsselenzyme der Transformationsgrad einer Zelle ableiten ließe.

Verschiedene Differenzierungszustände von HepaRG-Zellen wurden nach 120-minütigem Fasten in einer 6-well-Multidishplatte mit verschiedenen Insulinkonzentrationen für genau 15 Minuten stimuliert. Die in den Insulinsignalweg involvierten Proteine wurden anschließend mit einem Ak-Cocktail und semiquantitativem Western-Blot detektiert. Zum Vergleich dienten HuH7-Zellen, die ohne bzw. mit 50 nM Insulin unter gleichen Bedingungen stimuliert wurden.

Für HepaRG-Zellen ist ein in physiologischen Bereichen insulininduzierter, gradueller, dosisabhängiger Effekt auf Ebene des Phospho-Akt/PKB zu erkennen. Im Gegensatz dazu folgt die Phosphorylierung dieses Proteins in HuH7-Zellen einem An/Aus-Prinzip, wobei bereits geringe Insulinkonzentrationen eine massive Phosphorylierungsantwort hervorrufen. Zwischen den verschiedenen Differenzierungsstadien unterscheiden sich HepaRG-Zellen kaum, jedoch scheint die Inkubation mit DMSO die Grundphosphorylierung aller Proteine zu senken.

Die überschießende Phosphorylierungsreaktion in HuH7-Zellen lässt sich möglicherweise durch eine Diskrepanz zu physiologischen Regulationsprozessen erklären. Nach Stimulation mit 50 nM Insulin fällt diese bereits immens aus. Die Reaktion der HepaRG-Zellen zeigt sich hier etwas abgestufter, da in Bereichen physiologischer Insulinkonzentrationen die Phosphorylierung graduell ansteigt, bis sie ein Maximum erreicht hat.
Da die Zusammensetzung der Zellmembran, abhängig von der jeweils zur Verfügung stehenden Lipidkonzentration, die Insulinsignalwirkung modulieren kann (Müller 2002), wäre es auch hier sinnvoll, die Verwendung von zwei verschiedenen Zellkulturmedien experimentell als Ursache auszuschließen. Ebenso beeinflusst die Glukose- sowie Glucosaminkonzentration verwendeter Differenzierungsmedien die Insulinsensitivität von 3T3-L1-Adipozyten *in vitro* (Nelson et al. 2000).
Der beobachtete DMSO-Effekt scheint hier in einer generellen Verminderung der Phosphorylierungszustände aller involvierten Proteine zu liegen (Abb. 4-14). Am deutlichsten ist dieses auf der Ebene von Phospho-Akt/PKB zu sehen. Eine verminderte Grundphosphorylierung könnte sich dabei in einigen Bereichen positiv auf die insulinstimulierte LRP1-Translokation ausüben (s.u.). Vor diesem Hintergrund könnte die Phosphorylierungsantwort auf einen Insulinstimulus nicht nur Anhaltspunkt für die physiologischen Regulationsprozesse einer Zelle sein. Ebenso geben diese Ergebnisse Anlass zu der Vermutung, dass der basale Phosphorylierungsgrad in HepaRG-Zellen invers mit ihrem Differenzierungsgrad korreliert.
Weder in HuH7-, noch in HepaRG-Zellen ließen sich insulinabhängige Änderungen im Phosphorylierungszustand des ribosomalen Proteins S6 darstellen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass S6 nicht in allen Zelltypen entscheidend in den Translationsprozess involviert ist (Stolovich et al. 2002). Diese Ergebnisse relativieren die Wichtigkeit von S6 für das generelle Wachstum aller Zellen und geben Raum für die Vermutung, dass eine insulinunabhängige S6-Aktivität nicht zwangsläufig mit dem Transformationsgrad einer Zelle korrelieren muss.
Ob diese Regulationsmechanismen auch für die verwendeten Zellmodelle zutreffen, kann dabei an dieser Stelle nur vermutet werden.

Zusammenfassend lässt sich aus den Experimenten zu den insulinabhängigen Phosphorylierungszuständen ableiten, dass Akt/PKB - als ein zentraler Regulator

im Stoffwechsel - einem graduelleren, dosisabhängigerem Verlauf zu folgen scheint, als das in HuH7-Zellen der Fall ist. Auch wenn bis heute kein umfassendes Verständnis der stattfindenden Regulationsmechanismen vorliegt, so scheinen einige Mechanismen in HepaRG-Zellen differenzierter zu funktionieren. Zumindest in Bezug auf Phospho-Akt/PKB lässt sich eine solche Vermutung aus den Ergebnissen dieser Arbeit ableiten. Unter Umständen könnte dies als ein Indikator für physiologischere, intrazelluläre Regulationsmechanismen in HepaRG-Zellen aufgefasst werden. Ob sich hieraus Vorteile des HepaRG-Zellmodells gegenüber anderen Zellsystemen ergeben, bleibt abzuwarten. Es ist jedoch festzuhalten, dass die differenzierten Eigenschaften von HepaRG großes Potential besitzen einen Beitrag zur weiteren Erforschung dieser komplexen Mechanismen zu leisten.
Dass die beschriebene Reaktion auf eine Insulinstimulation tatsächliche Auswirkungen auf das LRP1-Kompartiment zu haben scheint, war ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

5.3.3 Insulinabhängige Aufnahme über LRP1

Mittels immunzytochemisch angefärbter Liganden wurde die Aufnahme über LRP1 zunächst fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Durch die Verwendung von α2M* und RAP war die Aufnahme über LRP1 dabei gewährleistet. LRP1 ist identisch mit dem Rezeptor für α2M*, weshalb die Bindung und Internalisation der fluorochromassoziierten α2M*-Partikel spezifisch über LRP1 stattfand.
RAP fungiert als Chaperon für LRP1 und ist für ein funktionales LRP1 notwenig (Willnow et al. 1995). Zudem ist es experimentell als LRP1-spezifischer Ligand beschrieben worden (Willnow et al. 1995). Zwar ist bekannt, dass RAP zusätzlich an LRP2/Megalin bindet (Kounnas et al. 1992), da es in der Literatur aber keine Hinweise auf eine Expression von LRP2/Megalin in der Leber gibt, ist die detektierte Aufnahme von RAP nur über eine Interaktion mit LRP1 erklärbar.

Die Beobachtungen im Rahmen dieser Experimente ließen einen insulininduzierten Effekt sowohl für RAP (Abb. 4-15), als auch für α2M* (Abb. 4-16) erahnen . An d28- scheint die Stimulation der Zellen mit Insulin bezüglich RAP zu einer Mehraufnahme zu führen, wobei die Größe der internalisierten Partikel deutlich zunahm.

Der für α2M* optisch nachweisbare Insulineffekt zeigte sich analog zu RAP auch an d28-, sowie an d28+ mit einer angedeuteten Mehraufnahme. Die Vesikelgröße scheint demgegenüber an d28+ insulinabhängig geringgradig zuzunehmen (Abb. 4-16).
Da sich aus diesen Ergebnissen keine quantitativen Aussagen über den beobachteten Insulineffekt formulieren lassen, wurde in einer weiteren Reihe von Experimenten die Aufnahme mit radioaktiv markierten Liganden untersucht. Zusätzlich zu RAP wurden nun ApoE-angereicherte CR verwendet, deren Aufnahme aus dem Blut eine der zentralen Aufgaben von LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel darstellt.
In drei unabhängigen Experimenten wurde die quantitative Aufnahme im Vergleich zu HuH7-Zellen analysiert.
Identisch zu den fluorochromassoziierten Aufnahmeassays ließ sich unter dem Einfluss von Insulin eine signifikante Mehraufnahme von RAP an d28- demonstriere (Abb. 4-17). Geht man davon aus, dass RAP spezifisch an LRP1 bindet, wäre diese Beobachtung erklärbar durch eine insulinstimulierte Translokation von LRP1 an die Zellmembran, was die vermehrte Aufnahme zur Folge haben könnte.

Bezüglich der CR/ApoE war eine insulininduzierte Mehraufnahme an d28+ zu beobachten (Abb. 4-18 (a)). Im Gegensatz zu RAP lässt sich bezüglich der CR/ApoE-Aufnahme auch in den Absolutwerten ein Unterschied zugunsten von d28+ deutlich erkennen (4-18 (b)). Durch die niedrigeren Expressionslevel von LRP1 an d28+ (Abb. 4-9) scheint diese Beobachtung zunächst ungewöhnlich zu sein, ist doch LRP1 entscheidend für die Aufnahme von CR in der postprandialen Phase verantwortlich. Die absolut gemessene Zerfallszunahme könnte in diesem Falle dadurch erklärt werden, dass an d28+ ein größerer Anteil der CR/ApoE über den LDLR aufgenommen wird, der unter dem Einfluss von DMSO vermutlich vermehrt exprimiert wird (Abb. 4-8). Der insulinabhängige Unterschied ist wiederum durch die nun vermehrte LRP1-Translokation erklärbar.

Interessanterweise führt die Differenzierung von HepaRG-Zellen mit DMSO zu einer Abnahme der LRP1-Expressionslevel. Gleichzeitig ist zu diesem Zeitpunkt die intrazelluläre Aufnahme von CR/ApoE am größten. Neben der Erklärung dieser

Tatsache durch die vermehrte Aufnahme über den LDLR könnte DMSO allerdings auch dazu führen, dass LRP1 wesentlich effektiver der Rolle als Endozytoserezeptor nachkommt. Wie bereits beschrieben, äußert sich eine Differenzierung mit DMSO in einer Abnahme der Grundphosphorylierung aller in die Insulinkaskade eingebundener Proteine (siehe Abb.4-14). Zusammen mit den funktionellen Unterschieden ließe sich hieraus tatsächlich ableiten, dass durch die Differenzierung mit DMSO HepaRG-Zellen wesentlich effektiver ihrer physiologischen Bedeutung im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel nachkommen und eine verminderte Grundphosphorylierung zu einer intensiveren Insulinantwort mit konsekutiver Ligandenaufnahme führt.

Laut Gripon et al. (2002) ist für eine Differenzierung von HepaRG-Zellen die Supplementierung des Zellkulturmediums mit Insulin und Hydrocortison sowie DMSO ab dem 15. Differenzierungstag notwendig (Abb. 3-4). Hieraus lässt sich spekulieren, ob sich ein Fehlen von Insulin im Differenzierungsmedium zusätzlich positiv auf die beobachtete Insulinsensitivität auswirken würde. Einer vermehrten insulininduzierten Degradation des IR könnte somit entgegengewirkt werden, wie sie Kasuga et al. 1981 in IM-9 Lymphozyten zeigen konnte. Auch in FAO-Zellen wurden Hinweise darauf gefunden, dass Insulin eine Verminderung von IR-Oligomeren auf der Zelloberfläche bewirkt, was mit einer Desensibilisierung gegenüber Insulin einhergeht (Crettaz et al. 1984). Ein Fehlen dieses Differenzierungszusatzes könnte so eventuell eine gesteigerte Präsentation des IR an der Zelloberfläche zur Folge haben bzw. Einfluss auf die Insulinantwort nehmen. Vor diesem Hintergrund sollten experimentelle Ansätze erarbeitet werden, die die Notwendigkeit einer Insulinsupplementation des Zellkulturmediums überprüfen.

6 Zusammenfassung

Neben primären humanen sowie murinen Hepatozyten dienen heutzutage verschiedene immortalisierte Zellkulturen wie HepG2, FAO oder HuH7 als Grundlage zur Untersuchung wissenschaftlicher Fragestellungen zur Funktion und Bedeutung von Hepatozyten. Bei diesen Zelllinien gehen jedoch häufig physiologische Zustände im Rahmen einer Dedifferenzierung verloren, was die Verwendung dieser Zelllinien limitieren kann. Kürzlich wurde die humane Hepatomzelllinie HepaRG etabliert, die bislang alle Vorraussetzungen erfüllt, um ein Zellmodell für primäre humane Hepatozyten zu sein. So sind HepaRG-Zellen nach Differenzierung z.B. mit dem Hepatitis-B-Virus infizierbar, eine Eigenschaft, die bislang nur bei primären Hepatozyten beobachtet wurde. In dieser Arbeit sollte diese Zelllinie bezüglich des Lipoproteinstoffwechsels charakterisiert und insbesondere die Bedeutung des Lipoproteinrezeptors LRP1 für die Aufnahme von Lipoproteinen untersucht werden.
Zu diesem Zweck wurde zunächst das Differenzierungsprotokoll für HepaRG etabliert. Wie in der Arbeit zur Erstbeschreibung der Zellinie gezeigt, konnte nach einer 28-tägigen Differenzierung mittels DMSO ein hepatozytärer Phänotyp beobachtet werden. Im Durchflusszytometer konnte zudem gezeigt werden, dass DMSO einen Einfluss auf den DNA-Gehalt von HepaRG-Zellen besitzt. Die Expression wichtiger Apolipoproteine sowie der für den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel bedeutsamen Rezeptoren wurden im Vergleich mit etablierten Leberzellmodellen mittels Western-Blot untersucht. Im Gegensatz zu FAO-Zellen werden von HepaRG-Zellen alle untersuchten Proteine exprimiert. Die Expressionslevel von HepaRG- und HuH7-Zellen unterschieden sich in Bezug auf Expression der Apolipoproteine und Lipoproteinrezeptoren nur geringfügig. Desweiteren wurde die häufig in Hepatomzellen verlorene Insulinsensitivität in HepaRG-Zellen untersucht. Nach Insulinstimulation konnte in HepaRG-Zellen ein gradueller, dosisabhängiger Phosphorylierungseffekt von den wichtigen Signalmediatoren Akt/PKB gezeigt werden. Die Insulingabe führte ebenso zu einer Aktivierung der endozytotischen LRP1-Aktivität, so dass Insulin die Aufnahme verschiedener LRP1-Liganden stimulierte. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass HepaRG-Zellen ein vielversprechendes Modell zur Analyse des Lipoproteinstoffwechsels sind.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Lipoproteinpartikel (LDL) 7
Abb. 2-2: Übersicht über den Lipoproteinstoffwechsel 18
Abb. 2-3: Mitglieder der LDL-Rezeptor Gen-Familie 19
Abb. 3-4: Differenzierungsprotokoll von HepaRG-Zellen 42
Abb. 4-5: Morphologisches Erscheinungsbild von HepaRG 52
Abb. 4-6: Zytometrische Vermessung von HuH7-Zellen mit Acridine Orange als DNA-Farbstoff 54
Abb. 4-7: Zytometrische Messung von HepaRG-Zellen mit Acridine Orange als DNA-Farbstoff 55
Abb. 4-8: Quantifizierung der Expression des LDL-Rezeptors in HepaRG- und HuH7-Zellen 57
Abb. 4-9: Quantifizierung der Expression von LRP1 und ApoE in HepaRG- und HuH7-Zellen 58
Abb. 4-10: Expressionsprofil wichtiger Apolipoproteine in HuH7-, FAO- und HepaRG-Zellen 59
Abb. 4-11: Intrazelluläre Lokalisation von LRP1 im Vergleich zum LDLR in HuH7-Zellen 60
Abb. 4-12: Intrazelluläre Lokalisation von LRP1 sowie Kolokalisation mit EEA1 in HepaRG-Zellen 61
Abb. 4-13: Übersicht der in den Signaltransduktionsweg des IR eingebundenen Proteine 63
Abb. 4-14: Insulinabhängige Phosphorylierung der IR-Signaltrans-duktionskaskade in HepaRG- und HuH7-Zellen 64
Abb. 4-15: Insulinabhängige Aufnahme von RAP-Cy3 in HepaRG-Zellen 66
Abb. 4-16: Insulinabhängige Aufnahme von α2M*-Cy3 in HepaRG-Zellen 67
Abb. 4-17: Quantitative Analyse der insulinstimulierten Aufnahme von radioaktiv markiertem RAP in HepaRG- und HuH7-Zellen 69
Abb. 4-18: Quantitative Analyse der insulinstimulierten Aufnahme von radioaktiv markierten CR/ApoE in HepaRG- und Huh7-Zellen 70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der verschiedenen Lipoproteinklassen 7
Tabelle 2: Übersicht über die Liganden der extrazellulären Bindungsstellen von LRP1 23
Tabelle 3: Geräte 31
Tabelle 4: Verbrauchsmittel 32
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien 33
Tabelle 6: Lösungen und Puffer 35
Tabelle 7: Primärantikörper 36
Tabelle 8: Sekundärantikörper 37
Tabelle 9: Zellkulturmedien 41
Tabelle 10: Im Rahmen der Zellkultur verwendete Reagenzien und Verbrauchsmittel 41
Tabelle 11: Fluorophore, deren Anregungsbereiche sowie Detektionsfenster 48

Literaturverzeichnis

1. Albers JJ, Lin J, Roberts GP, Effect of human plasma apolipoproteins on the activity of purified lecithin: cholesterol acyltransferase, Artery. 1979, 5(1):61-75
2. Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A, Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells, Drug Metab Dispos. 2006, 34(1):75-83
3. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H, Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients, Diabetes., 1997, 46(8):1319-27
4. Baribault H, Leroux-Nicollet I, Marceau N, Differential responsiveness of cultured suckling and adult rat hepatocytes to growth-promoting factors: entry into S phase and mitosis, J Cell Physiol., 1985, 122(1):105-12
5. Barmina OY, Walling HW, Fiacco GJ, Freije JM, López-Otín C, Jeffrey JJ, Partridge NC, Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization, J Biol Chem. 1999, 274(42):30087-93
6. Beamand JA, Price RJ, Cunninghame ME, Lake BG, Culture of precision-cut liver slices: effect of some peroxisome proliferators, Food Chem Toxicol. 1993, 31(2):137-47
7. Beck F, Plummer S, Senior PV, Byrne S, Green S, Brammar WJ, The ontogeny of peroxisome-proliferator-activated receptor gene expression in the mouse and rat, Proc Biol Sci., 1992, 247(1319):83-7
8. Beckstead JA, Oda MN, Martin DD, Forte TM, Bielicki JK, Berger T, Luty R, Kay CM, Ryan RO, Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis, Biochemistry. 2003, 12;42(31):9416-23

9. Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G, Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein, Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88, 8342-46
10. Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK, The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein, Nature. 1989, 341(6238):162-4
11. Benedict WF, Jones PA, Mutagenic clastogenic and oncogenic effects of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine, Mutat Res., 1979, 65(1):1-20
12. Bengtsson G, Olivecrona T, Heparin-bound lipoprotein lipase is catalytically active and can be stimulated by apolipoprotein CII, FEBS Lett. 1981, 1;128(1):9-12
13. Berthou L, Duverger N, Emmanuel F, Langouët S, Auwerx J, Guillouzo A, Fruchart JC, Rubin E, Denèfle P, Staels B, Branellec D, Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice, J Clin Invest., 1996, 97(11):2408-16
14. Biggerstaff KD, Wooten JS, Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids, Adv Physiol Educ., 2004, 28(1-4):105-6
15. Block GD, Locker J, Bowen WC, Petersen BE, Katyal S, Strom SC, Riley T, Howard TA, Michalopoulos GK, Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium, J Cell Biol., 1996, 132(6):1133-49
16. Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J, LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis, Science 2003, 300, 329-32
17. Boucher P, Liu P, Gotthardt M, Hiesberger T, Anderson RGW, Herz J, Platelet-derived Growth Factor Mediates Tyrosine Phosphorylation of the Cytoplasmic Domain of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) in Caveolae, J Biol Chem 2002, 277, 15507-13
18. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W, Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat, Endocrinology., 1996, 137(1):354-66

19. Brown MS, Goldstein JL, Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic, J Clin Invest. 1983, 72(3):743-7
20. Brown MS, Goldstein JL, A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis, Science. 1986, 232(4746):34-47
21. Brown MS, Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, The low-density-lipoprotein receptor-related protein: double agent or decoy?, Curr Opin Lipidol 1991, 2, 65-72
22. Brown,W.V, Baginsky,M.L, Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein, Biochem Biophys Res Commun. 1972, 46(2):375-82
23. Bu G, Maksymovitch EA, Nerbonne JM, Schwartz AL, Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons, J Biol Chem. 1994, 269(28):18521-8
24. Bu G, Geuze HJ, Strous GJ, Schwartz AL, 39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein, EMBO J 1995, 14, 2269-80
25. Bu G, Rennke S, Receptor-associated protein is a folding chaperone for low density lipoprotein receptor-related protein, J Biol Chem. 1996, 271(36):22218-24
26. Bucher NL, Weir GC, Insulin, glucagon, liver regeneration, and DNA synthesis, Metabolism., 1976, 25(11 Suppl 1):1423-5
27. Bucher NL, Patel U, Cohen S, Hormonal factors and liver growth, Adv Enzyme Regul., 1977, 16:205-13
28. Catapano AL, Mode of action of fibrates, Pharmacol Res., 1992, 26(4):331-40
29. Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, Gripon P, Kremsdorf D, Guguen-Guillouzo C, Corlu A, Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor, Hepatology. 2007, 45(4):957-67
30. Cheng JQ, Lindsley CW, Cheng GZ, Yang H, Nicosia SV, The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery, Oncogene. 2005, 24(50):7482-92

31. Christensen EI, Birn H, Verroust P, Moestrup SK, Megalin-mediated endocytosis in renal proximal tubule, Ren Fail. 1998, (2):191-9
32. Cohen P, The twentieth century struggle to decipher insulin signalling, Nat Rev Mol Cell Biol. 2006, 7(11):867-73
33. Conway JG, Popp JA, Ji S, Thurman RG, Effect of size on portal circulation of hepatic nodules from carcinogen-treated rats, Cancer Res. 1983, 43(7):3374-8
34. Corlu A, Kneip B, Lhadi C, Leray G, Glaise D, Baffet G, Bourel D, Guguen-Guillouzo C, A plasma membrane protein is involved in cell contact-mediated regulation of tissue-specific genes in adult hepatocytes, J Cell Biol. 1991, 115(2):505-15
35. Crettaz M, Jialal I, Kasuga M, Kahn CR, Insulin receptor regulation and desensitization in rat hepatoma cells. The loss of the oligomeric forms of the receptor correlates with the change in receptor affinity, J Biol Chem., 1984, 259(18):11543-9
36. Depboylu C, Lohmüller F, Du Y, Riemenschneider M, Kurz A, Gasser T, Müller U, Dodel RC, α2-Macroglobulin, lipoprotein receptor-related protein and lipoprotein receptor-associated protein and the genetic risk for developing Alzheimer's disease, Neurosci.Lett., 2006, 400: 187-190
37. Deschatrette J, Moore EE, Dubois M, Cassio D, Weiss MC, Dedifferentiated variants of a rat hepatoma: analysis by cell hybridization, Somatic Cell Genet. 1979, 5(6):697-718
38. Durstine JL, Haskell WL, Effects of exercise training on plasma lipids and lipoproteins, Exerc Sport Sci Rev 1994, 22:477-521
39. Evans IH, Polyploidization in rat liver: the role of binucleate cells, Cytobios., 1976, 16(62):115-24
40. Farquhar MG, Kerjaschki D, Lundstrom M, Orlando RA, gp330 and RAP: the Heymann nephritis antigenic complex, Ann N Y Acad Sci. 1994, 737:96-113
41. Felts JM, Itakura H, Crane RT, The mechanism of assimilation of constituents of chylomicrons, very low density lipoproteins and remnants - a new theory, Biochem Biophys Res Commun. 1975, 66(4):1467-75
42. Fielding PE, Fielding CJ, A cholesteryl ester transfer complex in human plasma, Proc Natl Acad Sci U S A. 1980, 77(6):3327-30

43. Fitzgerald ML, Morris AL, Chroni A, Mendez AJ, Zannis VI, Freeman MW, ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux, J Lipid Res. 2004, 45(2):287-94
44. Florén CH, Albers JJ, Kudchodkar BJ, Bierman EL, Receptor-dependent uptake of human chylomicron remnants by cultured skin fibroblasts, J Biol Chem. 1981, 256(1):425-33
45. Friedman DL, Claus TH, Pilkis SJ, Pine GE, Hormonal regulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes: action of glucagon, Exp Cell Res., 1981, 135(2):283-90
46. Fruchart JC, Duriez P, Mode of action of fibrates in the regulation of triglyceride and HDL-cholesterol metabolism, Drugs Today (Barc)., 2006, 42(1):39-64
47. Fruchart-Najib J, Baugé E, Niculescu LS, Pham T, Thomas B, Rommens C, Majd Z, Brewer B, Pennacchio LA, Fruchart JC, Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5, Biochem Biophys Res Commun. 2004, 25;319(2):397-404
48. Gahan PB, Increased levels of euploidy as a strategy against rapid ageing in diploid mammalian systems: an hypothesis, Exp Gerontol., 1977, 12(3-4):113-6
49. Gardai SJ, Hoontrakoon R, Goddard CD, Day BJ, Chang LY, Henson PM, Bratton DL, Oxidant-mediated mitochondrial injury in eosinophil apoptosis: enhancement by glucocorticoids and inhibition by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, J Immunol. 2003, 170(1):556-66
50. Gaultier A, Salicioni AM, Arandjelovic S, Gonias SL, Regulation of the composition of the extracellular matrix by low density lipoprotein receptor-related protein-1: activities based on regulation of mRNA expression, J Biol Chem. 2006, 281(11):7332-40
51. Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, Shelton J, Richardson JA, Stockinger W, Nimpf J, Herz J, Interactions of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family with Cytosolic Adaptorand Scaffold Proteins Suggest Diverse Biological Functions in Cellular Communication andSignal Transduction, J Biol Chem 2000, 275, 25616-24

52. Gripon P, Diot C, Thézé N, Fourel I, Loreal O, Brechot C, Guguen-Guillouzo C, Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide, J Virol. 1988, 62(11):4136-43
53. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C, Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus, Proc Natl Acad Sci U S A 2002, 26;99(24):15655-60
54. Guillouzo A, Liver cell models in in vitro toxicology, Environ Health Perspect. 1998, 106 Suppl 2:511-32
55. Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P, Strickland DK, The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism, J Biol Chem. 2001, 276(18):15498-503
56. Hamilton RL, Wong JS, Guo LS, Krisans S, Havel RJ, Apolipoprotein E localization in rat hepatocytes by immunogold labeling of cryothin sections, J Lipid Res. 1990, 31(9):1589-603
57. Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, Raila J, Hubner N, Schulz H, Metzger J, Schweigert FJ, Luppa PB, Nykjaer A, Willnow TE, Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids, Cell. 2005, 122(5):751-62
58. Havel RJ, Fielding CJ, Olivecrona T, Shore VG, Fielding PE, Egelrud T, Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoproteins lipase from different sources, Biochemistry. 1973, 12(9):1828-33
59. Heeren J, Weber W, Beisiegel U, Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation, J Cell Sci. 1999, 112 (Pt 3):349-59
60. Heeren J, Grewal T, Jäckle S, Beisiegel U, Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo, J Biol Chem., 2001, 276(45):42333-8
61. Heeren J, Niemeier A, Merkel M, Beisiegel U, Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo, J Mol Med. 2002, 80(9):576-84

62. Heeren J, Grewal T, Laatsch A, Rottke D, Rinninger F, Enrich C, Beisiegel U, Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization, J Biol Chem. 2003, 278(16):14370-8
63. Heeren J, Beisiegel U, Grewal T, Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006, 26(3):442-8
64. Hertz R, Bishara-Shieban J, Bar-Tana J, Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III, J Biol Chem., 1995, 270(22):13470-5
65. Herz J, Clouthier DE, Hammer RE, LDL Receptor-Related Protein Internalizes and Degrades uPAPAI-Complexes and Is Essential for Embryo Implantation, Cell 1992, 71, 411-21
66. Herz J, Strickland DK, LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor, J Clin Invest 2001, 108, 779-84
67. Higgins PJ, Borenfreund E, Enhanced albumin production by malignantly transformed hepatocytes during in vitro exposure to dimethylsulfoxide, Biochim Biophys Acta., 1980, 610(1):174-80
68. Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y, Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression, J Biol Chem. 2006, 281(4):2120-7
69. Huang SS, Ling TY, Tseng WF, Huang YH, Tang FM, Leal SM, Huang JS, Cellular growth inhibition by IGFBP-3 and TGF-beta1 requires LRP-1, FASEB J. 2003, 17(14):2068-81
70. Ingram MF, Shelness GS, Folding of the amino-terminal domain of apolipoprotein B initiates microsomal triglyceride transfer protein-dependent lipid transfer to nascent very low density lipoprotein, J Biol Chem. 1997, 272(15):10279-86
71. Ishiguro M, Imai Y, Kohsaka S, Expression and distribution of low density lipoprotein receptor-related protein mRNA in the rat central nervous system, Brain Res Mol Brain Res. 1995, 33(1):37-46

72. Isom I, Georgoff I, Salditt-Georgieff M, Darnell JE Jr, Persistence of liver-specific messenger RNA in cultured hepatocytes: different regulatory events for different genes, J Cell Biol. 1987, 105(6 Pt 2):2877-85
73. Kancha RK, Stearns ME, Hussain MM, Decreased expression of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in invasive cell clones derived from human prostate and breast tumor cells, Oncol Res. 1994, 6(8):365-72
74. Kane JP, Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity, Annu Rev Physiol. 1983, 45:637-50
75. Kasuga M, Kahn CR, Hedo JA, Van Obberghen E, Yamada KM, Insulin-induced receptor loss in cultured human lymphocytes is due to accelerated receptor degradation, Proc Natl Acad Sci U S A., 1981, 78(11):6917-21
76. Keller H, Wahli W, Peroxisome proliferator-activated receptors A link between endocrinology and nutrition?, Trends Endocrinol Metab., 1993, 4(9):291-6
77. Kerjaschki D, Neale TJ, Molecular mechanisms of glomerular injury in rat experimental membranous nephropathy (Heymann nephritis), J Am Soc Nephrol. 1996, (12):2518-26
78. Kersten S, Desvergne B, Wahli W, Roles of PPARs in health and disease, Nature., 2000, 405(6785):421-4
79. Kounnas MZ, Argraves WS, Strickland DK, The 39-kDa receptor-associated protein interacts with two members of the low density lipoprotein receptor family, alpha 2-macroglobulin receptor and glycoprotein 330, J Biol Chem., 1992, 267(29):21162-6
80. Kowal RC, Herz J, Weisgraber KH, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL, Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein, J Biol Chem. 1990, 265(18):10771-9
81. Krieger M, Herz J, Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP), Annu Rev Biochem. 1994;63:601-37

82. Krieger M, Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems, J Clin Invest. 2001, 108(6):793-7
83. Krul ES, Tikkanen MJ, Cole TG, Davie JM, Schonfeld G, Roles of apolipoproteins B and E in the cellular binding of very low density lipoproteins, J Clin Invest. 1985, 75(2):361-9
84. Laatsch A, Die Rolle des low density lipoprotein receptor-related protein 1 im humanen Lipoproteinstoffwechsel, 2005, http://www.sub.uni-hamburg.de/opus/volltexte/2005/2745/, (10.05.2009)
85. Laatsch A, Merkel M, Talmud PJ, Grewal T, Beisiegel U, Heeren J, Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance, Atherosclerosis., 2009, 204(1):112-3
86. Landis BA, Rotolo FS, Meyers WC, Clark AB, Quarfordt SH, Influence of apolipoprotein E on soluble and heparin-immobilized hepatic lipase, Am J Physiol. 1987, 252(6 Pt 1):G805-10
87. Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P, Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity, J Virol. 1998, 72(7):5573-8
88. Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P, Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain, J Virol. 1999, 73(3):2052-7
89. Le Vee M, Jigorel E, Glaise D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Fardel O, Functional expression of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporters in the differentiated human hepatoma HepaRG cell line, Eur J Pharm Sci. 2006, 28(1-2):109-17
90. Leake DS, Peters TJ, Lipid accumulation in arterial smooth muscle cells in culture. Morphological and biochemical changes caused by low density lipoproteins and chloroquine, Atherosclerosis. 1982, 44(3):275-91
91. Lee JH, Ilic Z, Sell S, Cell kinetics of repair after allyl alcohol-induced liver necrosis in mice, Int J Exp Pathol. 1996, 77(2):63-72
92. Li Y, Marzolo MP, van Kerkhof P, Strous GJ, Bu G, 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. 2000, 275(22):17187-94

93. Lillis AP, Mikhailenko I, Strickland DK, Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability, J Thromb Haemost. 2005, 3(8):1884-93
94. Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, Gorlatova N, Migliorini MM, Loukinov D, Ulery PG, Mikhailenko I, Lawrence DA, Strickland DK, Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-induced Tyrosine Phosphorylation of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP), J Biol Chem 2002, 277, 15499-506
95. Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK, Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity, Am J Pathol 1999, 154:537-541
96. Loyer P, Ilyin G, Cariou S, Glaise D, Corlu A, Guguen-Guillouzo C, Progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes, Prog Cell Cycle Res. 1996, 2:37-47
97. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC, Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways, Circulation., 2004, 110(13):1868-73
98. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH, Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function, J Lipid Res. 1984 1;25(12):1277-94
99. Mahley RW, Heparan sulfate proteoglycan/low density lipoprotein receptor-related protein pathway involved in type III hyperlipoproteinemia and Alzheimer's disease, Isr J Med Sci. 1996, 32(6):414-29
100. Mahley RW, Ji ZS, Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E, J Lipid Res. 1999, 40(1):1-16
101. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y, Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease, Proc Natl Acad Sci U S A. 2006, 103(15):5644-51
102. Makarova A, Mikhailenko I, Bugge TH, List K, Lawrence DA, Strickland DK, The low density lipoprotein receptor-related protein modulates protease activity in the brain by mediating the cellular internalization of both neuroserpin

and neuroserpin-tissue-type plasminogen activator complexes, J Biol Chem. 2003, 278(50):50250-8

103. Malmendier CL, Lontie JF, Delcroix C, Dubois DY, Magot T, De Roy L, Apolipoproteins C-II and C-III metabolism in hypertriglyceridemic patients. Effect of a drastic triglyceride reduction by combined diet restriction and fenofibrate administration, Atherosclerosis., 1989, 77(2-3):139-49
104. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N, mTOR, translation initiation and cancer, Oncogene. 2006, 25(48):6416-22
105. Marçais C, Verges B, Charrière S, Pruneta V, Merlin M, Billon S, Perrot L, Drai J, Sassolas A, Pennacchio LA, Fruchart-Najib J, Fruchart JC, Durlach V, Moulin P, Apoa5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment, J Clin Invest 2005, 115(10):2694-6
106. Marceau N, Goyette R, Guidoin R, Antakly T, Hormonally induced formation of extracellular biomatrix in cultured normal and neoplastic liver cells. Effect of dexamethasone, Scan Electron Microsc., 1982, (Pt 2):815-23
107. Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, Jaeger S, Waldron E, Roebroek A, Luhmann HJ, Laatsch A, Weggen S, Lessmann V, Pietrzik CU, The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 beta-chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors, J Biol Chem. 2008, 283(18):12004-13
108. May P, Herz J, Bock HH, Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling, Cell Mol Life Sci. 2005, 62(19-20):2325-38
109. May P, Neue Funktionen von Lipoproteinrezeptoren, Dtsch Med Wochenschr 2006, 131:1328-1331
110. May P, Woldt E, Matz RL, Boucher P, The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions, Ann Med. 2007, 39(3):219-28
111. McGowan JA, Bucher NL, Pyruvate promotion of DNA synthesis in serum-free primary cultures of adult rat hepatocytes, In Vitro., 1983, 19(3 Pt 1):159-66

112. McGowan JA, Strain AJ, Bucher NL, DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP, J Cell Physiol., 1981, 108(3):353-63
113. McKern NM, Lawrence MC, Streltsov VA, Lou MZ, Adams TE, Lovrecz GO, Elleman TC, Richards KM, Bentley JD, Pilling PA, Hoyne PA, Cartledge KA, Pham TM, Lewis JL, Sankovich SE, Stoichevska V, Da Silva E, Robinson CP, Frenkel MJ, Sparrow LG, Fernley RT, Epa VC, Ward CW, Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation, Nature. 2006, 443(7108):218-21
114. Medvedev ZA, Possible role of repeated nucleotide sequences in DNA in the evolution of life spans of differentiated cells, Nature., 1972, 237(5356):453-4
115. Medvedev ZA, Age-related polyploidization of hepatocytes: the cause and possible role. A mini-review, Exp Gerontol., 1986, 21(4-5):277-82
116. Merkel M, Heeren J, Give me A5 for lipoprotein hydrolysis!, J Clin Invest. 2005, 115(10):2694-6
117. Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, Laatsch A, Heeren J, Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase, J Biol Chem. 2005, 3;280(22):21553-60
118. Millar JS, Packard CJ, Heterogeneity of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins: what we have learnt from kinetic studies, Curr Opin Lipidol. 1998, 9(3):197-202
119. Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G, Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues, Cell Tissue Res. 1992, 269(3):375-82
120. Müller G, Dynamics of plasma membrane microdomains and cross-talk to the insulin signalling cascade, FEBS Lett., 2002, 531(1):81-7
121. Muoio DM, Newgard CB, Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes, Nat Rev Mol Cell Biol. 2008, 9(3):193-205
122. Nagasawa M, Akasaka Y, Ide T, Hara T, Kobayashi N, Utsumi M, Murakami K, Highly sensitive upregulation of apolipoprotein A-IV by peroxisome proli-

ferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonist in human hepatoma cells, Biochem Pharmacol., 2007, 74(12):1738-46

123. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J, Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium, Cancer Res 1982, 42, 3858-63
124. Nelson BA, Robinson KA, Buse MG, High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes, Diabetes., 2000, 49(6):981-91
125. Olofsson SO, ApoA-V: the regulation of a regulator of plasma triglycerides, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005, 25(6):1097-9
126. Packard CJ, Shepherd J, Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997, 17(12):3542-56
127. Parent R, Marion MJ, Furio L, Trépo C, Petit MA, Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line, Gastroenterology. 2004, 126(4):1147-56
128. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM, An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing, Science 2001, 294, 169-73
129. Phillips MC, Gillotte KL, Haynes MP, Johnson WJ, Lund-Katz S, Rothblat GH, Mechanisms of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes, Atherosclerosis. 1998, 137 Suppl:S13-7
130. Plaa CL. Mecanismes des atteintes hepatiques d'origine chimique. In: Foie isole perfusd (Ballet F, Thurman RG, eds). Paris:Les Editions INSERM and John Libbey, Eurotext, 1993, 411-426.
131. Richman RA, Claus TH, Pilkis SJ, Friedman DL, Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes, Proc Natl Acad Sci U S A., 1976, 73(10):3589-93
132. Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J, Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants, J Clin Invest., 1998, 101(3):689-95
133. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C, Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects, Biochem Pharmacol. 2003, 65(7):1035-41

134. Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vrins C, van der Vliet HN, Chamuleau RA, Havekes LM, Groen AK, van Dijk KW, ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis, J Biol Chem. 2004, 2;279(27):27941-7
135. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J, The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation, Biochim Biophys Acta., 1996a, 1302(2):93-109
136. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J, PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene, EMBO J., 1996b, 15(19):5336-48
137. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N, Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins, J Lipid Res. 2001, 42(9):1346-67
138. Sevanian A, Peterson AR, The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products, Food Chem Toxicol. 1986, 24(10-11):1103-10
139. Shachter NS, Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism, Curr Opin Lipidol. 2001, 12(3):297-304
140. Shelness GS, Sellers JA, Very-low-density lipoprotein assembly and secretion, Curr Opin Lipidol. 2001, 12(2):151-7
141. Shepherd J, Mechanism of action of fibrates, Postgrad Med J., 1993, 69 Suppl 1:S34-41
142. Sparks DL, Pritchard PH, Transfer of cholesteryl ester into high density lipoprotein by cholesteryl ester transfer protein: effect of HDL lipid and apoprotein content, J Lipid Res. 1989, (10):1491-8
143. Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, Dallongeville J, Auwerx J, Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates, J Clin Invest., 1995, 95(2):705-12
144. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC, Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism, Circulation., 1998, 98(19):2088-93

145. Stolovich M, Tang H, Hornstein E, Levy G, Cohen R, Bae SS, Birnbaum MJ, Meyuhas O, Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation, Mol Cell Biol., 2002, 22(23):8101-13
146. Stow JL, Kjéllen L, Unger E, Höök M, Farquhar MG, Heparan sulfate proteoglycans are concentrated on the sinusoidal plasmalemmal domain and in intracellular organelles of hepatocytes, J Cell Biol. 1985, 100(3):975-80
147. Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS, 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., 1990, 265(29):17401-4
148. Takayama Y, May P, Anderson RG, Herz J, Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) controls endocytosis and c-CBL-mediated ubiquitination of the platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR beta), J Biol Chem. 2005, 280(18):18504-10
149. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR, Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action, Nat Rev Mol Cell Biol. 2006, 7(2):85-96
150. Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM, The canals of Hering and hepatic stem cells in humans, Hepatology, 1999, 30(6):1425-33
151. Thorgeirsson SS, Grisham JW, Overview of recent experimental studies on liver stem cells, Semin Liver Dis., 2003, 23(4):303-12
152. van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, Chamuleau RA, Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration, J Biol Chem. 2001, 276, 44512-20
153. Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Saito H, Rothblat GH, Lund-Katz S, Phillips MC, Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles, J Biol Chem. 2007, 282(34):25123-30.

154. Véniant MM, Zlot CH, Walzem RL, Pierotti V, Driscoll R, Dichek D, Herz J, Young SG, Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice, J Clin Invest. 1998, 102(8):1559-68
155. Vickers AE, Use of human organ slices to evaluate the biotransformation and drug-induced side-effects of pharmaceuticals, Cell Biol Toxicol. 1994, 10(5-6):407-14
156. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, Auwerx J, Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor, J Clin Invest., 1995, 96(2):741-50
157. Vu-Dac N, Chopin-Delannoy S, Gervois P, Bonnelye E, Martin G, Fruchart JC, Laudet V, Staels B, The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates, J Biol Chem., 1998, 273(40):25713-20
158. Vu-Dac N, Gervois P, Jakel H, Nowak M, Bauge E, Dehondt H, Staels B, Pennacchio LA, Rubin EM, Fruchart-Najib J, Fruchart JC, Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators, J Biol Chem., 2003, 278(20):17982-5
159. Walldius G, Jungner I, The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy--a review of the evidence, J Intern Med. 2006, 259(5):493-519
160. Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, Martin DD, Gallagher JW, Shelness GS, Ryan RO, Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V, J Biol Chem. 2003, 5;278(36):34438-44
161. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW, Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms, J Biol Chem. 1981, 256(17):9077-83
162. Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS, Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of

beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein, J Biol Chem. 1990, 265(36):22453-9

163. Westermarck J, Kähäri VM, Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion, FASEB J. 1999 May, (8):781-92
164. White MF, Maron R, Kahn CR, Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells, Nature. 1985, 318(6042):183-6
165. Willnow TE, Armstrong SA, Hammer RE, Herz J, Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo, Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92, 4537-41
166. Willnow TE, Moehring JM, Inocencio NM, Moehring TJ, Herz J, The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro, Biochem J 1996a, 313,71-6
167. Willnow TE, Rohlmann A, Horton J, Otani H, Braun JR, Hammer RE, Herz J, RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors, EMBO J 1996b, 15, 2632-9
168. Xia W, Amyloid inhibitors and Alzheimer's disease, Curr Opin Investig Drugs. 2003, 4(1):55-9
169. Yang Z, Strickland DK, Bornstein P, Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2, J Biol Chem. 2001, 276(11):8403-8
170. Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA, Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein, J Clin Invest. 2003, 112(10):1533-40
171. Zambon A, Schmidt I, Beisiegel U, Brunzell JD, Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins, J Lipid Res. 1996, 37(11):2394-404
172. Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS, Schonfeld G, Hazzard WR, Blum C, Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes, J Lipid Res. 1982, 23(6):911-4

173. Zhuo M, Holtzman DM, Li Y, Osaka H, DeMaro J, Jacquin M, Bu G, Role of Tissue Plasminogen Activator Receptor LRP in Hippocampal Long-Term Potentiation, J Neurosci 2000, 20, 542-9

Danksagung

Ich möchte Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel und PD Dr. Jörg Heeren danken, die mir die Bearbeitung eines so spannenden und vielfältigen Themas ermöglicht haben.

PD Dr. Jörg Heeren und Dr. Alexander Laatsch danke ich für die herzliche Betreuung und hilfreichen Tips, für Ihre Anregungen im Hinblick auf dieses Thema sowie Ihr offenes Ohr bei all meinen Fragen.

Ein besonderer Dank gilt außerdem:

Sandra Ehret, Dorte Wendt, Birgit Henkel und Dolores, die mir beim Erlernen der methodischen Grundlagen geholfen haben. Ohne Euch wäre ich oft verzweifelt.

Rukiye Secer, Nina Sauer, Kjell Stütze (und seinen Fähigkeiten am Kickertisch), Alexander Bartelt, Oliver Bruns, Dorothee Lasrich, Niklas Schreiber, Sebastian Meisner, Barbara Heese sowie der Firma Jura® und Ihren Kaffeemaschinen, die die Zeit abseits von Zellkultur und Reagenzglas so angenehm gemacht haben.

Meinen Eltern, meiner Familie, meiner Freundin Jana und allen anderen Freunden für die enorme Unterstützung während dieser ganzen Zeit, ohne die diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen wäre.

Zuletzt möchte ich mich bei Dr. Brigitte Feldmann und allen anderen bedanken, die mir auf der Suche nach Tipp-, Komma-, und Satzbaufehler behilflich waren und sich diese so hoffentlich in Grenzen halten.

Tobias Hesper
Friedrich-Ebert-Straße 35b • 22459 Hamburg • Tel: 0174/340 17 58
E-Mail: tobias_hesper@yahoo.de

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	21.10.1983
Geburtsort	Bad Pyrmont, Niedersachsen
Familienstand	ledig
Konfession	keine

Schulische Ausbildung

08/1990 - 07/1994	Grundschule Sethweg, Hamburg
08/1994 - 07/2000	Gymnasium Ohmoor, Hamburg
08/2000 - 06/2001	Granger Highschool, Texas, USA
09/2001 - 06/2003	Klenze Gymnasium, München
	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife (Durchschnittsnote: 2,5)

Akademischer Werdegang

10/2003 - 10/2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
09/2005	Bestehen des 1. Abschnitts der ärztlichen Prüfung
10/2010	Bestehen des 2. Abschnitts der ärztlichen Prüfung
	Abschluss des Medizinstudiums (Gesamtnote: 1,66)

Famulaturen

03/2006 - 04/2006	Dr. P. Kremer, Innere Medizin, Albertinen-Krankenhaus, Hamburg
02/2008 - 03/2008	Dres. Frey, Gehrckens, Röber, Diagn. Radiologie, Albertinen-Krankenhaus, Hamburg
08/2008 - 09/2008	Prof. Dr. J. Izbicki, Allg.-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
02/2009 - 03/2009	Gemeinschaftspraxis Dr. Buchholz & Partner, Orthopädie, Unfallchirurgie & Sportmedizin, Hamburg

Praktisches Jahr

08/2009 - 12/2009	Prof. Dr. H. Nötzli, Orthopädie/Traumatologie, Zieglerspital, Bern, Schweiz
12/2009 - 04/2010	Prof. Dr. M. Podvinec, Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde Kantonsspital Aarau, Schweiz
04/2010 - 07/2010	Prof. Dr. G. Scholz, Innere Medizin, St. Elisabeth-Krankenhaus, Leipzig

Promotion

10/2006 - 08/2007	Experimentelle Promotionsarbeit am Institut für Molekulare Zellbiologie und Biochemie (IBM II) der Universität Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel zum Thema: „Charakterisierung des Lipoproteinstoffwechsels der Zelllinie HepaRG“

weitere Tätigkeiten

04/2005 - 09/2005	Tutorat im Fach „Mikroskopische Anatomie“
10/2005 - 03/2006	Tutorat im Fach „Histologie“

Sonstiges

Sprachkenntnisse	Englisch: Fließend in Wort und Schrift Französisch: gute Schulkenntnisse Italienisch: Grundkenntnisse
EDV-Kenntnisse	MS-Office
Hobbys	Ausdauersport (Marathon), Tennis, Literatur, Kochen

Hamburg, den 05.10.2011

Tobias Hesper

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

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.

Tobias Hesper