

Aus der Medizinischen Kernklinik und Poliklinik des
Universitätskrankenhauses Eppendorf
Universität Hamburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Greten

**Der LDL-Rezeptor und das LDL-Rezeptor Related
Protein als Recyclingrezeptoren für triglyceridreiche
Lipoproteine**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Jens Höppner
aus Bremen

Hamburg, 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 02. März 2000

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. U. Beisiegel

Korreferent: Prof. Dr. H. Greten

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Der Lipoproteinstoffwechsel	1
1.1.1. Die Lipoproteine	1
1.1.2. Stoffwechselwege der Lipoproteine	2
1.2. Rezeptoren im Lipoproteinstoffwechsel	5
1.2.1. LDL-Rezeptor	7
1.2.2. LDL-Rezeptor Related Protein (LRP)	8
1.2.3. GP330	10
1.2.4. VLDL-Rezeptor	10
1.2.5. Weitere Mitglieder der LDL-Rezeptor-Gen-Familie	11
1.2.6. Heparansulphat Proteoglykane	11
1.3. Apolipoprotein E	12
1.4. Lipasen im Lipoproteinstoffwechsel	14
1.4.1. Lipoprotein Lipase (LpL)	14
1.4.2. Hepatische Lipase (HL)	15
1.5. Rezeptor-vermittelte Endozytose	15
1.6. Intrazelluläre Stoffwechselwege endozytierter Liganden	16
1.6.1. Intrazellulärer Stoffwechsel endozytierter Lipoproteine	17
1.7. Ziel der Arbeit	18
 2. Material und Methoden	 20
2.1. Material	20
2.1.1. Geräte	20
2.1.2. Verbrauchsmittel	20
2.1.3. Chemikalien	21
2.1.4. Zellkultur	21
2.1.5. Herstellung von LPDS	22
2.1.6. Isolierung der Zellproteine	22
2.1.7. Bestimmung der Zellproteinkonzentration	22
2.1.8. SDS-PAGE	23
2.1.9. Western Blot und Immunfärbung	24
2.1.10 Isolierung von humanen Chylomikronen	24

2.1.11. Isolierung von humanen LDL und HDL	25
2.1.12. Jodierung von Chylomikronen und LDL	25
2.1.13. Pulse Chase Experimente	25
2.2. Methoden	26
2.2.1. Zellkultur	26
2.2.2. Herstellung von LPDS	27
2.2.3. Isolierung der Zellproteine	27
2.2.4. Bestimmung der Zellproteinkonzentration	28
2.2.5. Auftrennung des Zellproteins mittels SDS-PAGE	28
2.2.6. Western Blot und Immunfärbung	29
2.2.7. Isolierung von humanen Chylomikronen	30
2.2.8. Isolierung von humanen LDL und HDL	31
2.2.9. Jodierung von Chylomikronen und LDL	31
2.2.10. Pulse Chase Experimente: Quantifizierung von Aufnahme Abbau und Recycling radioaktiv markierter Liganden	32
3. Ergebnisse	34
3.1. Charakterisierung der Zelllinien	34
3.1.1. Fibroblasten und FH-Fibroblasten	35
3.1.2. Mouse Embryonic Fibroblasts	36
3.2. Pulse Chase Experimente	38
3.2.1. Fibroblasten und FH-Fibroblasten	39
3.2.2. Mouse Embryonic Fibroblasts	52
4. Diskussion	57
	57
4.2. Einfluß der Lipoproteinrezeptoren LDL-R und LRP auf die intra- zelluläre Metabolisierung, insbesondere das Recycling von Chylomikronen	
Zusammenfassung	65
. Literaturverzeichnis	67

7. Anhang --- 75

7.1. Abkürzungsverzeichnis 75

7.2. Lebenslauf 76

7.3. Danksagung 77

7.4. Erklärung 78

1. Einleitung

In dieser Arbeit soll anhand eines in vitro Modells untersucht werden, in wie weit die Interaktion triglyzeridreicher Lipoproteine mit ihren Rezeptoren - den Lipoproteinrezeptoren Low Density Lipoprotein Rezeptor (LDL-R) und Low Density Lipoprotein Rezeptor Related Protein (LRP) - über ihr intrazelluläres Schicksal, insbesondere in Hinblick auf das Recycling entscheidet. Im folgenden soll zunächst einmal ein allgemeiner Überblick über die Lipoproteine, ihren Stoffwechsel, ihre Rezeptoren und ihre intrazellulären Wege gegeben werden.

1.1. Der Lipoproteinstoffwechsel

Lipide sind neben Kohlehydraten und Eiweiß die wichtigsten Energielieferanten des menschlichen Organismus. Sie sind Grundbestandteile von biologischen Membranen, Steroidhormonen und Gallensäuren. Lipide werden nach Aufnahme mit der Nahrung im Gastro-Intestinal-Trakt von Lipasen aus Speicheldrüsen, Magen und Pankreassekret aufgespalten, und zusammen mit den fettlöslichen Vitaminen E, D, K, und A resorbiert. Der weitere Transport der Lipide erfolgt durch den Blutkreislauf, wo sie aufgrund ihrer hydrophoben Natur in Form von Lipoproteinen zu den verschiedenen Organsystemen des Körpers transportiert werden.

1.1.1. Die Lipoproteine

Lipoproteine sind sphärische Partikel, deren hydrophile Hülle aus Phospholipiden, freiem polarem Cholesterol und Apolipoproteinen besteht und die den aus Triglyzeriden und Cholesterolestern bestehenden hydrophoben Kern umschließt. Die Einteilung der Lipoproteine erfolgt in 5 verschiedene Klassen, die sich in Dichte, Größe, elektrischer Ladung und Zusammensetzung aus verschiedenen Lipid- und Apolipoproteinanteilen unterscheiden (Gotto et al., 1986). Die größten und zugleich mit der geringsten Dichte ausgestatteten Lipoproteine sind die triglyzeridreichen Chylomikronen: Mit einem Durchmesser von 75-1200 nm und einer Dichte von $\delta < 0,96$ g/ml zeichnen sie sich durch einen sehr hohen Lipidanteil (98%) und einen sehr geringen Proteinanteil (2%) aus. Es folgen, in absteigender

Größe und im Verhältnis dazu reziprok ansteigender Dichte, die Very Low Density Lipoproteins (VLDL, $\varnothing = 30-80$ nm, $\delta = 0,96-1,006$ g/ml), die Intermediate Density Lipoproteins (IDL, $\varnothing = 25-35$ nm, $\delta = 1,006-1,019$ g/ml), die Low Density Lipoproteins (LDL, $\varnothing = 18-25$ nm, $\delta = 1,019-1,063$ g/ml) und die High Density Lipoproteins (HDL, $\varnothing = 5-12$ nm, $\delta = 1,063-1,21$ g/ml). Mit ansteigender Dichte der Lipoproteine verschiebt sich auch das Lipid/Protein-Verhältnis zugunsten des Proteinanteils, der bei den HDL schließlich bis zu 55 % beträgt. Diese sogenannten Apoproteine haben nicht nur die Funktion von Transportproteinen für Lipide im Blut, sondern sind auch Kofaktoren wichtiger Enzyme im Lipidstoffwechsel und sind an Bindung und Aufnahme der Lipoproteine über Oberflächenproteine und Rezeptoren beteiligt.

1.1.2. Stoffwechselwege der Lipoproteine

Im menschlichen Lipoproteinmetabolismus sind die Stoffwechselwege der mit der Nahrung zugeführten Lipide (exogen) und der vom Organismus selber synthetisierten Lipide (endogen) zu unterscheiden. Man differenziert somit zwischen einem endogenen und einem exogenen Stoffwechselweg.

Aus den mit der Nahrung zugeführten Triglyzeriden werden in Magen-Darmtrakt durch Lipasen aus Speicheldrüsen, Magen und Pankreassekret die Fettsäuren abgespalten. Die so entstandenen freien Fettsäuren assoziieren nun - genau wie die ebenfalls bei der Fettverdauung entstandenen 2-Monoglyzeride - mit Gallensalzen, und bilden sogenannte Mizellen. Die Fette dieser Mizellen werden durch einen passiven, energieunabhängigen Prozeß in die Enterozyten des Jejunums aufgenommen. Die bei diesem Prozeß abdissoziierenden Gallensalze werden im Ileum absorbiert und über den enterohepatischen Kreislauf zur Leber zurücktransportiert. In der Nahrung enthaltene Cholesterinester werden durch die Cholesterolesterase in Cholesterol umgewandelt und ebenfalls von den Enterozyten internalisiert. Während die relativ gut wasserlöslichen, kurzkettigen Fettsäuren über die Vena Porta zur Leber gelangen, werden die langkettigen Fettsäuren und die 2-Monoglyceride am Endoplasmatischen Retikulum der Enterozyten zu Triglyzeriden resynthetisiert, und nach Assoziation mit Cholesterin, Phospholipiden und den Apolipoproteinen (Apo) ApoB48, ApoA-I, ApoAII und ApoA-IV in Chylomikronen weitertransportiert. Nach Exozytose in den interstitiellen

Raum gelangen die Chylomikronen über Lymphgefäße und Ductus thoracicus in den Blutkreislauf, wo sie die aus den HDL stammenden Apolipoproteine ApoE, ApoC-I, ApoC-II und ApoC-III aufnehmen. Die Assoziation mit diesen Apolipoproteinen beeinflusst die Eigenschaften der Chylomikronen nachhaltig: So ist das ApoC-II ein essentieller Kofaktor für die endothelständige Lipoproteinlipase (LpL), die im allgemeinen Blutkreislauf für die Hydrolyse der Triglyzeride aus den Chylomikronen sorgt (Olivecrona und Bengtsson-Olivecrona, 1993). Die Assoziation mit ApoE erhöht die Affinität der Aufnahme der Chylomikronen-Remnants durch Lipoproteinrezeptoren der Leber (Kowal et al., 1989; Beisiegel, 1992).

Intravaskulär werden die Triglyzeride der Chylomikronen durch die an den Heparansulfat Proteoglykanen (HSPG) der Endothelzellen gebundene LpL gespalten. Die entstandenen freien Fettsäuren werden entweder vom Fettgewebe aufgenommen oder aber direkt der Energiegewinnung von Herz- und Skelettmuskulatur zugeführt. Die LpL verbleibt an den nun Chylomikronen Remnants genannten Partikeln und vermittelt über die Bindung an HSPG die Aufnahme der Chylomikronen Remnants durch das LRP in die Leberzellen (Beisiegel et al., 1991). Durch die ebenfalls an der Leberoberfläche lokalisierte Hepatische Lipase werden die Chylomikronen Remnants schließlich final prozessiert. Das Apo E der Chylomikronen Remnants stellt den zweiten wichtigen Liganden für die Aufnahme der in die Leber dar: Über die ApoE-vermittelte Aufnahme und Bindung der Chylomikronen Remnants an LDL-R und LRP werden sie von den Hepatozyten endozytiert (Beisiegel et al., 1995; Beisiegel et al., 1989; Kowal et al., 1989; Bradley und Gianturco, 1986; Willmow et al., 1994).

Wie oben schon erwähnt, ist der Körper aber auch in der Lage, selber Triglyzeride und Cholesterin zu synthetisieren und kann so in Zeiten von Nahrungskarenz und Hunger die Versorgung mit Lipiden sicherstellen. Die Produktion dieser endogenen Lipide erfolgt v.a. in der Leber, welche sie in Form von VLDL sekretiert. Im Gegensatz zu den ebenfalls sehr triglyzeridreichen Chylomikronen enthalten sie aber, zumindest bei den Primaten, statt des ApoB48, das ApoB100 (Ginsberg, 1995). Darüber hinaus sind die VLDL mit ApoE und den ApoC's I-III ausgestattet. Intravaskulär werden die VLDL durch die endothelständige LpL erst zu kleineren

VLDL und dann zu IDL hydrolysiert. Diese kleineren VLDL und IDL binden nun entweder über ihr ApoE an hepatische LDL-Rezeptoren und werden wieder von der Leber aufgenommen, oder sie werden von Hepatischer Lipase (HL) und LpL in einer hydrolytischen Kaskade weiter zu LDL metabolisiert. Die LDL sind sehr cholesterinreiche Lipoproteine, die als einziges Apolipoprotein das ApoB100 enthalten. Zusätzlich nehmen die LDL im intravasalen Raum noch Cholesterolester aus den HDL auf. Die LDL werden über die Bindung des ApoB100 an den LDL Rezeptor in hepatische und extrahepatische Gewebe aufgenommen (Brown und Goldstein , 1986), und stellen damit die Versorgung der extrahepatischen Zellverbände und Organsysteme mit Cholesterol sicher, das als Grundbaustein biologischer Membranen und Ausgangsstoff für die Steroidhormonsynthese dient. Die extrahepatischen Zellen regulieren ihre Cholesterolhomöostase sowohl über die Expression des LDL-Rezeptors, als auch über die Induktion von Schlüsselenzymen der zellulären de novo Synthese von Cholesterin sehr genau, da hohe Cholesterolkonzentrationen im Intrazellulärraum toxisch wirken. Zur Ausscheidung des Cholesterols ist ausschließlich die Leber fähig: Sie verstoffwechselt das Cholesterol zu Gallensäuren und scheidet diese über den enterohepatischen Kreislauf aus. Erhöhte Serum LDL-Spiegel, wie sie z.B. bei LDL-Rezeptor- oder ApoB100-Gendefekten auftreten, stellen einen wesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung von Atherosklerose dar.

Im Gegensatz zur Leber sind periphere Zellen nicht in der Lage, freies Cholesterol abzubauen und müssen deshalb ihr überschüssiges Cholesterol an extrazelluläre Akzeptoren abgeben, um den toxischen Wirkungen einer intrazellulären Cholesterolakkumulation zu entgehen. Die Aufgabe des extrazellulären Akzeptors erfüllt die Lipoproteinfraktion der HDL. Der Proteinanteil, der in Leber und Dünndarm produzierten HDL wird von den Apolipoproteinen ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoE und den drei ApoC's gebildet. Das von den HDL aufgenommene freie Cholesterol wird von dem Enzym Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT), unter Beteiligung des ApoAI als Kofaktor, verestert. Die entstandenen Cholesterolester können nun durch das Cholesterinestertransferprotein (CETP) auf andere Lipoproteine übertragen und mittels LDL-Rezeptor-vermittelter Endozytose aus der Zirkulation entfernt werden.

Dies kann durch extrahepatische Gewebe im Sinne eines „Cholesterinester-Recyclings“ oder durch die Leber zum Zwecke des Abbaus geschehen. Allerdings sind die HDL auch direkt in der Lage Cholesterolester, vermittelt durch den Scavenger Rezeptor SR-B1, an die Leber abzugeben (Acton et al., 1996).

1.2. Rezeptoren in Lipoproteinstoffwechsel

Die Lipoproteinrezeptoren sind Plasmamembranrezeptoren, die für die spezifische Bindung und Aufnahme der im Blutkreislauf zirkulierenden Lipoproteine in hepatische und extrahepatische Gewebe verantwortlich sind. In der nach ihrem Prototyp, dem LDL-Rezeptor, benannten LDL-Rezeptor-Gen-Familie sind mittlerweile 7 verschiedene Rezeptoren bekannt. Nach dem in den siebziger Jahren von Goldstein und Brown entdeckten LDL-Rezeptor wurden LRP (Herz et al., 1988), GP 330 (Raychowdhury et al., 1989), VLDL-Rezeptor (Takahashi et al., 1992), LR 11 (Yamazaki et al. 1996), LR8B (Novak et al., 1996) und Apo E Rezeptor 2 (Kim et al., 1996) entdeckt, und der LDL-Rezeptor Familie zugeordnet. Die Mitglieder der LDL-Rezeptor-Gen-Familie lassen sich strukturell in in fünf verschiedene Domänen unterteilen:

Das aminoterminal Ende stellt die ligandenbindende Domäne der Rezeptoren dar (Russel et al., 1989). Es besteht aus Wiederholungen einer cysteinreichen Sequenz von jeweils 40 Aminosäuren (AS). Zwischen den durch intramolekulare Disulfidbrücken verbundenen Cysteinen sind negativ geladene AS-Reste mit der hoch konservierten Sequenz Ser-Asp-Glu vorhanden, welche aufgrund ihrer Homologie mit einigen Komplementfaktoren auch als „Complement Type Repeat“ bezeichnet wird.

Die zweite Domäne setzt sich aus einer weiteren Sequenz cysteinreicher Wiederholungen zusammen, die eine Homologie zur Vorstufe des Epidermalen Wachstumsfaktors aufweisen. Diese sogenannten „Growth Faktor Repeats“ werden durch Spacerregionen, die jeweils die AS-Sequenz Try-Trp-Thr-Asp (YWTD) in fünffacher Wiederholung beinhalten, getrennt. Die Bedeutung dieser

Domäne besteht in der Beteiligung an der intrazellulären pH-abhängigen Dissoziation von Rezeptor und Ligand (Davis et al.,1987).

Die dritte Domäne, der eine Stützfunktion innerhalb des Moleküls zugesprochen wird, beinhaltet 18 Serin- und Threoninreste die mit O-gebundenen Zuckerresten verbunden sind.

Die vierte Domäne wird durch das Transmembransegment des Moleküls gebildet. Sie dient der Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran.

Die fünfte, intrazellulär liegende Domäne wird durch das C-terminale Ende des Rezeptormoleküls gebildet. Sie besteht aus 50 AS welche die Sequenz Asp-Pro-Val-Tyr (NPXY) beinhalten, und ist für das Clustering des Rezeptors in bestimmten Membranbereichen, den sogenannten „Coated Pits“ verantwortlich. Auch das Rezeptorrecycling wird von der NPXY-Sequenz wesentlich mitbestimmt (Chen et al., 1990).

Die Abbildung 1 stellt Struktur und Anordnung der Domänen in den am besten charakterisierten Lipoprotein-Rezeptoren dar.

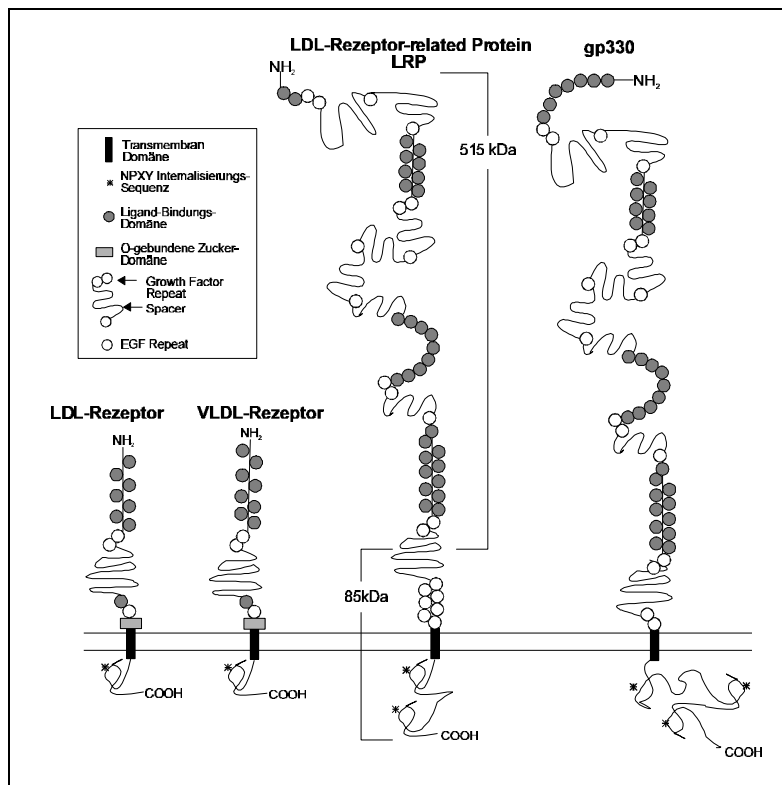


Abb.1: Schematische Darstellung der LDL-R Familie: LDL-R, LRP, GP330, VLDL-R und ihre Domänen

1.2.1. LDL-Rezeptor (LDL-R)

Der LDL-R stellt den am frühesten entdeckten und bis heute am besten charakterisierten Lipoprotein-Rezeptor dar. Er ist auf fast allen Zellen präsent und vermittelt Bindung, Aufnahme und Abbau von LDL.

Die ribosomale Synthese des LDL-R erfolgt zunächst als 120 kDa Vorläuferprotein, das dann im Golgi-Apparat der Zelle durch Verlängerung der O-gebunden Zuckerreste zum funktionsfähigen Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 160 kDa modifiziert wird (Cummings et al.,1983; Schneider et al., 1982). Auf Grund seiner molekularen Struktur wandert der LDL-R in der SDS-PAGE langsamer, als es seinem wahren Molekulargewicht entspricht und ist bei ungefähr 115 kDa zu detektieren (Goldstein et al.,1985).

Die N-terminale Domäne des LDL-R besteht aus sieben Wiederholungen eines cysteinreichen Abschnitts von 40 AS und wird als „Complement Type Repeat“ bezeichnet. Die Ligandenbindung ApoB- und ApoE- haltiger Lipoproteine erfolgt an der dieser Domäne des Rezeptors durch Interaktion einer Sequenz negativ geladener AS auf Seiten des Rezeptors mit einer komplementären Sequenz positiv geladener AS der Apolipoproteine (Weisgraber et al., 1983; Hospattankar et al., 1986; Milne et al., 1989). Die sich in Größe, Struktur und Sequenz der Bindungsregionen unterscheidenden ApoE und ApoB100 weisen deutliche Affinitätsunterschiede zum LDL-R auf: Die Affinität von ApoE zum Rezeptor ungefähr zehnfach höher ist als die von ApoB100 (Innerarity und Mahley,1978).

Der LDL-Rezeptor nimmt bei der Regulation der Cholesterolumöostase sowohl im Intrazellularraum der Zellen, als auch im Plasma eine zentrale Stellung ein (Brown und Goldstein,1986). Dies wird durch verschiedene Mutationen im LDL-Rezeptor Gen eindrucksvoll verdeutlicht, die die Ursache für die familiäre Hypercholesterinämie (FH) darstellen: Patienten mit entsprechenden Erbdefekten akkumulieren ApoB100-haltige Lipoproteine in ihrem Plasma und sind hierdurch frühzeitig von erheblichen atherosklerotischen Läsionen der Gefäßwände betroffen. Durch die Folgen der atherosklerotischen Gefäßveränderungen ist die Lebenserwartung dieser Patienten erheblich verkürzt.

Der LDL-R spielt aber auch bei der Aufnahme von Chylomikronen, Chylomikronen Remnants und VLDL eine wichtige Rolle. Im Tiermodell wurde gezeigt, daß bei Mäusen, bzw. Kaninchen, die keinen funktionellen LDL-R exprimieren, die Aufnahme von VLDL (Yamada et al., 1988) und Chylomikronen Remnants (Ishibashi et al., 1993; Ishibashi et al., 1994; Ishibashi et al., 1996) deutlich verlangsamt ist. Allerdings ist noch ein weiterer LDL-R-unabhängiger Aufnahmemechanismus in die Leber für Chylomikronen und VLDL Remnants anzunehmen, da es weder im Tiermodell (Choi und Cooper, 1993; Ishibashi et al., 1994; Ishibashi et al., 1996; Kita et al., 1981; Kita et al., 1982) noch beim Menschen (Rubinsztein et al., 1990) bei LDL-R-Gendefekten zur Akkumulation der Remnants kommt.

1.2.2. LDL-Rezeptor Related Protein (LRP)

Das dem LDL-R strukturell ähnliche LRP wurde erstmals 1988 von Herz et al. kloniert. Es wird als 600 kDa Vorläufermolekül synthetisiert und im trans-Golgi-Kompartiment proteolytisch in eine 85 kDa und eine 515 kDa Untereinheit gespalten. Auf der Zelloberfläche bildet das 85 kDa Fragment die transmembranösen und cytosolischen Domänen, während das 515 kDa Fragment mit seinen Domänen ausschließlich extrazellulär liegt. Beide Untereinheiten sind nicht-kovalent miteinander assoziiert (Abb.1).

Die N-terminale Domäne des LRP enthält 31 „Complement Type Repeats“, die in vier Clustern organisiert sind und den cysteinreichen Abschnitten der ligandenbindenden aminoterminalen Domäne des LDL-R entsprechen. Des Weiteren findet man 22 „Growth Factor Repeats“, die durch acht Spacerregionen mit jeweils mehreren „YWTD“-Sequenzen getrennt sind. Das cytoplasmatische Ende des LRP ist 100 AS lang, und damit doppelt so lang wie beim LDL-R. Es enthält zwei Kopien der „NPXY“-Sequenz, die den Rezeptor in den „coated pits“ lokalisiert. Im Unterschied zum LDL-R, liegen beim LRP statt der O-gebundenen Zuckerdomäne sechs „Epidermal Growth Factor Repeats“ vor. Diese

unterscheiden sich durch eine abweichende Abfolge der Cysteinreste von den „Growth Factor Repeats“(Krieger und Herz, 1994).

LRP konnte bisher auf Parenchymzellen der Leber (Herz et al., 1988), Neuronalzellen des ZNS (Wolf et al., 1992), Syncytiotrophoblasten der Plazenta (Jensen et al., 1988) und auf mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und Makrophagen (Moestrup et al., 1992) nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde auch die Synthese von LRP bei der Monozytendifferenzierung nachgewiesen, was eventuell eine pathogenetische Rolle bei Entwicklung artherosklerotischer Läsionen spielt (Watanabe et al., 1994; St. Clair und Beisiegel, 1997).

Das LRP spielt nicht nur eine Rolle im Lipoproteinstoffwechsel, sondern bindet noch eine ganze Reihe anderer Liganden und stellt somit einen multifunktionellen Rezeptor dar. Als weitere Liganden wurden bisher beschrieben: α 2-Makroglobulin-Protease Komplex (Kristensen et al., 1990), Tissue-Plasminogen-Activator (Bu et al., 1992), Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor (Warshawsky et al., 1994), Pregnancy-Zone Protein (Gliemann et al., 1986), Urokinase (Kounnas et al., 1993), und deren Komplexe mit Plasminogen Aktivator-Inhibitor (Herz et al., 1992; Herz et al., 1993; Nykjaer et al., 1992; Orth et al., 1992), Thrombospondin 1 (Goyna et al., 1995; Mikhailenko et al., 1995), Laktoferrin (Willnow et al., 1992; Meilinger et al., 1995), humane Rhinoviren (Hofer et al., 1994) und Pseudomonas Exotoxin A (Kounnas et al., 1992).

Liganden im Lipoproteinstoffwechsel stellen dar: ApoE (Beisiegel et al., 1989), LpL (Krapp et al., 1995; Beisiegel et al., 1991; Chapell et al., 1992; Nykjaer et al., 1993), Hepatische Lipase (Shafi et al. 1994; Ji et al., 1994; Krapp et al., 1996), β -VLDL (Nykjaer et al., 1993; Krapp et al., 1995), mit ApoE angereicherte β -VLDL (Kowal et al., 1989) und LpL assoziierte VLDL (Chapell et al., 1994). Ein weiterer Ligand, das sogenannte „Receptor Associated Protein“ (RAP) ist in der Lage, die Bindung aller anderen Liganden an das LRP zu inhibieren und scheint damit die Funktion eines Regulators der Ligandenbindung zu haben (Herz et al., 1991).

Mittlerweile ist es auch in vivo gelungen, das LRP eindeutig als hepatischen Chylomikronen-Remnant Rezeptor zu identifizieren (Rohlmann et al., 1998). Die

Konzentration der Remnants im Plasma stieg nach leberspezifischer Inaktivierung des LRP in LDL-R negativen Mäusen deutlich an. Diese Mäuse waren nicht in der Lage die Remnants abzubauen, sondern akkumulierten sie statt dessen im Plasma. Mäuse mit normaler LDL-R Expression waren durch kompensatorische Hochregulation des LDL-R in der Lage, die Remnant Partikel suffizient aus dem Plasma aufzunehmen. So wurde in vivo gezeigt, daß LRP eine wichtige Rolle im Metabolismus der Chylomikronen Remnants spielt, obwohl es für die ausreichende Aufnahme der triglyzeridreichen Lipoproteine aus dem Plasma nicht essentiell ist.

1.2.3. Glykoprotein 330 (GP330)

Das GP330 wurde Anfang der achtziger Jahre zunächst als verantwortliches Antigen für die Entstehung einer autoimmunologisch bedingten membranösen Glomerulonephritis, der sogenannten „Heymanns Nephritis“, in Ratten beschrieben (Kerjaschki und Farquhar, 1982). Später wurde die Strukturhomologie des GP330 zur LDL-Rezeptor-Gen-Familie, insbesondere zum LRP, erkannt und es wurde eine Zuordnung zu den Lipoprotein-Rezeptoren möglich (Raychowdhury et al., 1989). Das Ligandenspektrum des GP330 ist dem des LRP sehr ähnlich. Darüber hinaus wird allerdings noch ApoB100 gebunden (Stefansson et al., 1995). Im proximalen Tubulus der Niere vermittelt GP330 die Aufnahme des Vitamin B₁₂-Transkobalamin Komplexes und erfüllt damit wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der Vitamin B₁₂ Homöostase und der B₁₂-Speicherung in der Niere (Gliemann, 1998). Die Expression dieses Rezeptors erfolgt vor allem in Ependymzellen und Plexus choroideus der Hirnventrikel und in den proximalen Tubuli der Niere. Der Rezeptor konnte aber auch in Nervenzellen, Typ II Pneumozyten, Thyroidalen Zellen und in den Epithelien des Labyrinths im Innenohr gefunden werden (LaFerla et al., 1997; Gliemann, 1998). Die Leber exprimiert kein GP330. Auf Grund dieser Gewebeverteilung spielt GP330 mit hoher Wahrscheinlichkeit keine wichtige Rolle im Chylomikronen Stoffwechsel.

1.2.4. VLDL-Rezeptor (VLDL-R)

1992 gelang es Takahashi und Mitarbeitern, eine cDNA aus dem Kaninchenherzen zu klonieren, die ein Protein kodierte, das eine sehr hohe Sequenz- und Strukturhomologie gegenüber dem LDL-R aufwies. Da dieses

Protein zwar in der Lage war VLDL zu binden, nicht aber LDL, wurde der neue Rezeptor als „VLDL-Rezeptor“ (VLDL-R) bezeichnet. Der strukturelle Unterschied dieses Rezeptors, im Vergleich zum LDL-R, besteht im Vorhandensein von acht, anstatt von sieben Wiederholungen der 40 cysteinreichen AS in der für die Ligandenbindung verantwortlichen aminoterminalen Domäne. Im Lipoproteinstoffwechsel bindet der VLDL-R β -VLDL, VLDL, IDL (Takahashi et al., 1992; Takahashi et al., 1995), Chylomikronen Remnants (Niemeier et al., 1996) und LpL (Argraves et al., 1995). Wie beim LRP ist die Bindung dieser Liganden durch RAP inhibierbar. Hinsichtlich der Gewebeverteilung konnte die mRNA dieses Rezeptors in Herzmuskelzellen, Muskelzellen und Fettgewebszellen nachgewiesen werden, wohingegen in Dünndarm und Leber nur geringste Mengen detektierbar waren (Oka et al., 1994). Ligandenspezifität und Gewebeverteilung legen nahe, daß der VLDL-Rezeptor seine Funktion hauptsächlich im Sinne der Speicherung und Gewinnung von Energie aus triglyzeridreichen Lipoproteinen in stoffwechselaktiven Geweben erfüllt (Yamamoto et al., 1995).

1.2.5. Weitere Mitglieder der LDL-R-Familie

Der 1996 von Kim et al. entdeckte ApoE Rezeptor 2 (ApoER2) wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, kommt aber auch in Plazenta und Hoden vor. Die einzigen bisher bekannten Liganden stellen ApoE-haltige Lipoproteine dar. Wie der ApoER2 ist auch LR11 (Yamazaki et al., 1996) hauptsächlich im Gehirn zu finden und kommt in der Leber nicht vor. Hier stellen ApoE-haltige Lipoproteine und RAP die bisher einzigen bekannten Liganden dar.

1.2.6. Heparansuphat Proteoglykane (HSPG)

Proteoglykane sind anionische, polymere Strukturen, die an der Oberfläche der Zelle lokalisiert sind. Sie sind aus einem Kernprotein als Grundgerüst und Glykoaminoglykanen, im Falle von HSPG, Heparansulphaten aufgebaut.

Es konnte nachgewiesen werden, daß sowohl ApoE (Ji et al., 1993; Ji et al., 1994a; Ji et al., 1994b) als auch LpL und HL die Bindung von Chylomikronen Remnants an HSPG vermitteln (Eisenberg et al., 1992; Ji et al., 1994c). Die Mechanismen der HSPG Beteiligung an der Chylomikronen Remnants Aufnahme erläutert das sogenannte „Secretion-Recapture“ Modell (Ji et al., 1994a): Die in

den Disse'schen Raum hineinreichenden HSPG der Hepatozyten, binden hier zunächst die mit LpL angereicherten Chylomikronen Remnants (Fraser et al., 1995). Während die Remnants nun durch die HL final prozessiert werden, reichern sie gleichzeitig von der Leber sekretiertes ApoE an und werden schließlich über LDL-R und LRP von den Hepatozyten endozytiert. Die Beteiligung von HSPG an der Aufnahme von Chylomikronen Remnants konnte in vitro und in vivo beobachtet werden (Ji et al., 1995).

Des weiteren konnte gezeigt werden, daß einige HSPG, sogenannte Sydecane als Transmembranproteine direkt in der Lage sind, die zelluläre Aufnahme Lipase-assoziiierter Lipoproteine zu vermitteln (Fuki et al., 1997).

1.3. Apolipoprotein E

Das Apolipoprotein E ist ein sehr bedeutsames Apolipoprotein, das auf Chylomikronen, VLDL, IDL und HDL vorkommt, und deren Interaktion mit den Lipoproteinrezeptoren wesentlich mitbestimmt. In der Leber werden ca. 90% des ApoE gebildet. Es wird im wesentlichen in Assoziation mit VLDL oder kleinen diskoidalen Partikeln sekretiert (Elshourbagy et al., 1985). Einen weiteren wichtigen Syntheseort für ApoE stellen die Astrozyten des Gehirns dar (Elshourbagy et al., 1985).

Das aus 299 AS bestehende ApoE hat ein Molekulargewicht von 34 kDa und läßt sich in zwei funktionelle Domänen untergliedern (Wetterau et al., 1988): Die C-terminale Domäne ist für die Bindung an die Lipoproteine verantwortlich, während die N-terminale Domäne mit ihren vorwiegend positiv geladenen AS die Bindung an die Lipoproteinrezeptoren vermittelt (Aggerbeck et al., 1988; Mahley, 1988).

Im Lipoproteinstoffwechsel erfüllt ApoE mehrere Funktionen: Es vermittelt die Aufnahme von VLDL und IDL via LDL-R und LRP und sorgt damit für ihren Abbau, bzw. ihre Umwandlung zu LDL und vermittelt die Aufnahme von Chylomikronen Remnants via LRP in die Leber. Dies konnte sowohl durch die direkte Interaktion des ApoE mit dem LRP (Beisiegel et al., 1989), als auch durch Experimente an LDL-R-defizienten Fibroblasten, die eine nicht cholesterolregulierte LRP-vermittelte Aufnahme von ApoE angereicherter β -VLDL zeigten (Kowal et al., 1989), bewiesen werden.

Das genetisch polymorphe ApoE kommt in verschiedenen Isoformen vor, von denen an dieser Stelle aber nur die drei häufigsten Allele besprochen werden sollen. Die unterschiedlichen Isoformen besitzen zum Teil einen deutlichen Einfluß auf die Konzentration des LDL-Cholesterins im Serum und den Abbau der Chylomikronen Remnants. Durch kodominante Expression der drei Allele E2, E3 und E4 lassen sich sechs verschiedene Phänotypen unterscheiden: die homozygoten ApoE2/2, ApoE3/3, ApoE4/4 und die heterozygoten ApoE2/3, ApoE2/4, ApoE3/4. Mit einer Allelfrequenz von 70-85% in der Normalbevölkerung, kommt die Isoform ApoE3 am häufigsten vor und der ApoE Typ 3/3 wird deshalb als Normaltyp bezeichnet. Die Allele E2 und E4 kommen mit einer Frequenz von 3-12% (E2) bzw. 12-18% (E4) in der Bevölkerung vor (Zannis et al., 1982). Strukturell unterscheiden sich ApoE2 durch eine positive Ladung weniger, bedingt durch einen Austausch eines Arginins durch ein Cystein an Position 158, und ApoE4 durch eine positive Ladung mehr, bedingt durch einen Austausch eines Cysteins durch ein Arginin an Position 112, vom Normaltyp ApoE3 (Beisiegel, 1992). Im Falle des ApoE2 hat dieser Austausch eine erheblich verringerte Affinität des Apolipoproteins zum LDL-R zur Folge (Havel et al., 1980). Patienten mit einer homozygoten Ausprägung dieser Isoform entwickeln nur bei Vorhandensein weiterer genetischer Defekte eine Hyperlipidämie Typ III. So sind im Gegensatz zum völligen Fehlen von ApoE, wobei immer eine Hyperlipidämie auftritt (Schaefer et al., 1986), nur 5% der ApoE2/2-Träger von der Hyperlipidämie betroffen (Zannis et al., 1982).

Die Apolipoproteine CI, CII und CIII haben im Stoffwechsel von Chylomikronen Remnants einen inhibierenden Effekt auf die Aufnahme ApoE-tragender Remnants (Windler et al., 1980; Kowal et al., 1990). Im Gegensatz zu ApoB100 wird ApoE nach rezeptorvermittelter Aufnahme in die Zelle nicht lysosomal degradiert, sondern wird recycelt und kann so wieder mit anderen Lipoproteinen assoziiert werden (Chen et al., 1995; Beisiegel et al., 1995).

1.4. Lipasen im Lipoproteinstoffwechsel

Die Lipoprotein Lipase (LpL) bildet zusammen mit der Hepatischen Lipase (HL) und der Pankreatischen Lipase (PL) die Familie der neutralen Lipasen (Hide et al., 1992). Die drei Lipasen stammen wahrscheinlich von einem „Ur-Gen“ (Kirchgessner et al., 1989) ab, da in der AS-Sequenz zwischen den verschiedenen Lipasen stark homologe Bereiche existieren (Hide et al., 1992). An dieser Stelle sollen allerdings nur die im Lipoproteinstoffwechsel wirksamen Lipasen LpL und HL kurz vorgestellt werden.

1.4.1 Lipoprotein Lipase (LpL)

Die endothelständige LpL hydrolysiert vor allem die in den Plasmalipoproteinen enthaltenen Triglyceride und Phospholipide unter Freisetzung von Monoglyceriden, freien Fettsäuren und Lysophospholipiden. Die LpL ist ein Homodimer, das sich aus zwei gleich großen glykosilierten Proteinketten zusammensetzt. Die Molekularmasse der humanen LpL beträgt, in der SDS-Gelchromatographie ermittelt, 62 bis 64 kDa (Egerlund und Olivecrona, 1972). Das Protein besteht aus zwei Domänen: Einer größeren N-terminalen Domäne, die sowohl die für die Hydrolyse von Lipoproteinen verantwortliche „katalytische Triade“, als auch die Bindungsregion für den Kofaktor ApoCII enthält, und einer kleineren C-terminalen Domäne die für die Bindungen an die HSPG der kapillären Endothelien, an die Lipoproteinrezeptoren und die Interaktion des Enzyms mit den Lipoproteinen verantwortlich ist (Davis et al., 1992). Eine zweite wichtige Funktion der LpL ist, neben der oben erwähnten Hydrolyse der Lipoproteine, die Bindungsvermittlung zwischen den Lipoproteinen und ihren Rezeptoren. Diese Funktion ist unabhängig von der hydrolytischen Funktion (Beisiegel et al., 1991). Es konnten bisher die direkte Bindung der LpL an den LDL-R (Salinelli et al., 1996;

Medh et al.,1996), den VLDL-R (Argaves et al., 1995) und das LRP (Beisiegel et al., 1991) gezeigt werden. So konnte auch bewiesen werden, daß die durch ihre Bindung an die HSPG an der Zelloberfläche konzentriert vorkommende LpL die LRP-vermittelte Bindung und Aufnahme von Chylomikronen in die Zelle verstärkt (Beisiegel et al.,1991). Grund hierfür ist wahrscheinlich eine durch die Lipase verstärkte Verknüpfung zwischen Lipoprotein und Rezeptor.

1.4.2. Hepatische Lipase (HL)

Die HL wird überwiegend in der Leber exprimiert (Semenkovich et al., 1989) und prozessiert hier durch ihre hydrolytische Aktivität Chylomikronen Remnants zu finalen Chylomikronen Remnants. Im Vergleich zur LpL hat die HL allerdings eine zwei- bis dreifach stärkere Affinität gegenüber Phospholipiden (Deckelbaum et al., 1992). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß auch die HL, in einer der LpL ähnlichen Weise, die Aufnahme von Lipoproteinen in die Zelle vermittelt (Krapp et al.,1995; Dicheck et al., 1998).

1.5. Rezeptor-vermittelte Endozytose

Der Begriff Rezeptor-vermittelte Endozytose beschreibt einen der wichtigsten Mechanismen der Zelle, Makromoleküle über die physiologische Barriere der Plasmamembran aus dem Extrazellulärraum in ihr Zellinneres aufzunehmen. Mittels dieses Mechanismus werden von der Zelle z.B. Lipoproteine (LDL), Transportproteine (Transferrin), Hormone (EGF), Immunglobuline (IgA) aber auch Viren und Toxine internalisiert.

Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor erfolgt die Internalisierung des Ligand-Rezeptor Komplexes an den sogenannten „Coated Pits“. Einige Rezeptoren, wie z.B. der LDL-R sind schon vor Bindung des Liganden an diesen Stellen konzentriert, während sich andere, wie der EGF-Rezeptor oder der Insulin Rezeptor, erst nach Bindung des Liganden in die ca. 2% der Zelloberfläche ausmachenden Bereiche der Coated Pits (Anderson et al, 1977) bewegen. Coated Pits sind spezialisierte Bereiche der Plasmamembran, die an ihrer cytosolischen Seite eine dünne Schicht an die Membran bindende „Adaptor Proteins“ (AP) aufweisen. Die AP stellen eine Verbindung zwischen der Membran und den

Clathrin dar, welches mit seinen Untereinheiten eine Art Gitter um das coated pit, das nach seinem Einstülpen in die Zelle „Coated Vesicle“ genannt wird, bildet (Pryer et al., 1992). Clathrin ist aus drei leichten und drei schweren Ketten aufgebaut. Die schweren Ketten formieren eine wesentliche Strukturkomponente der Coated Pits und Vesicles, sogenannte Triskelionen (Brodsky, 1988). Diese Triskelionen bilden mit ihren hexa- und pentagonalen Strukturen ein korbartiges Gerüst an der cytoplasmatischen Seite der Membran (Kirchhausen, 1993; Schmid, 1992). Es wird vermutet daß, dieses Clathrin-Triskelionen-Gerüst in der Lage ist, sich zu krümmen und auf diesem Wege die Vesikelabschnürung aus der Plasmamembran bewirkt (Heuser, 1980).

Für das Clustering der Rezeptoren in den Coated Pits und ihre Internalisierung ist auf Seiten der Rezeptoren die cytoplasmatische Domäne verantwortlich. So konnte z.B. für den LDL-R die tyrosinhaltige Tetrapeptidsequenz NPXY der cytoplasmatischen Domäne für die Bindung des Rezeptors an die APs und damit für das Clustering in den Coated Pits verantwortlich gemacht werden (Pearse, 1988; Chen et al., 1990). Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen, in Coated Pits konzentriert vorkommenden Rezeptoren, wie z.B. dem Transferrin Rezeptor, gemacht (Jing et al., 1990).

1.6. Intrazelluläre Stoffwechselwege endozytierter Liganden

Nachdem die Rezeptoren mit ihren Liganden mittels Coated Pits in die Zelle gelangt sind, wird der Clathrin-Mantel der Vesikel durch das 70 kDa schwere ATP-abhängige „Uncoating Enzym“ entfernt (Rothman und Schmid, 1986). Die so entstandenen Endosomen verschmelzen rasch mit dem sogenannten „Sortierenden Endosom“ (Geuze et al., 1983). In diesem auch „Compartment of Uncoupling Receptor and Ligand“ (CURL) genannten Zellorganell, das sich morphologisch durch ein großes Vesikel mit tubulären Auswüchsen auszeichnet, findet nun eine durch ATP-abhängige Protonen-Pumpen gewährleistete Ansäuerung statt (Nelson et al., 1992). Der weitere intrazelluläre Weg der Rezeptoren und Liganden wird durch die strukturellen Eigenschaften des Rezeptor-Ligand-Komplexe bestimmt: Bei einigen Komplexen, wie EGF und seinem Rezeptor, werden sowohl der Ligand als auch der Rezeptor in die Lysosomen transportiert und dort vollständig degradiert (De Duve und Wattiaux,

1966). In den meisten Fällen wird aber zumindest der Rezeptor „recycled“, d.h. zur Plasmamembran zurückgeführt (Mukherjee et al., 1997). In diesem Falle, der unter anderem für LDL-R (Brown et al., 1983) und LRP (Dickson et al., 1981) beschrieben wurde, wird die Dissoziation des Liganden vom Rezeptor durch die Erniedrigung des pH-Werts (pH=5,9-6,0) im Sortierenden Endosom erreicht. Die Rezeptoren sammeln sich in den dreiviertel der Gesamtmembran des CURL ausmachenden, tubulären Ausläufern, während sich die Liganden im voluminösen vesikulären Teil befinden. Die tubulären Ausläufer schnüren sich nun zu Vesikeln ab und transportieren die Rezeptoren zurück zur Zelloberfläche (Hopkins et al., 1990; Ghosh et al., 1994). Der verbliebene vesikuläre Teil des Endosoms mit dem Liganden reift unter weiterer Ansäuerung (pH=5,0-6,0) zum sogenannten „späten Endosom“ (Dunn und Maxfield, 1992), welches später mit den Lysosomen fusioniert. Hier werden die Liganden final degradiert.

Eine weitere Möglichkeit stellt das Recycling von Rezeptor und Ligand dar, wie es erstmals 1983 von Octave et al. für den Transferrin-Rezeptor beschrieben wurde. Hier dissoziiert im Sortierenden Endosom lediglich das zweiwertige Eisen vom Apotransferrin, welches selber aber weiter am Transferrin Rezeptor gebunden bleibt. Der Komplex wird nicht lysosomal degradiert, sondern über das sogenannte „Recycling Endosom“ an die Zelloberfläche zurückgeführt. Im Extrazellulärraum dissoziiert unter den Bedingungen eines neutralen pH-Werts das Apotransferrin vom Rezeptor und steht nun wieder für den Transport von zweiwertigem Eisen in der Zirkulation zur Verfügung.

Von diesem Weg ist allerdings noch die sogenannte Retroendozytose abzugrenzen: Sie beschreibt ein durch fehlende Dissoziation im sauren Milieu des Sortierenden Endosom hervorgerufenes Recycling von Rezeptor und Ligand. Anstatt lysosomal degradiert zu werden, wird der Ligand mit seinem Rezeptor an die Zelloberfläche zurücktransportiert. Es konnte gezeigt werden, daß u.a. LDL diesen intrazellulären Weg beschreiten, endozytierte LDL wurden als intakte Partikel zu 20% wieder retroendozytiert (Greenspan und St.Clair, 1984; Magnusson et al., 1992). Die ebenfalls beschriebene Retroendozytose von HDL könnte eine Rolle im reversen Cholesteroltransport spielen (Rogler et al., 1991; Alam et al., 1989).

1.6.1. Intrazellulärer Stoffwechsel endozytierter Lipoproteine

Die zelluläre Aufnahme von LDL stellt eines der am besten charakterisierten Modelle rezeptorvermittelter Endozytose dar (Brown und Goldstein, 1986). Die im Serum Cholesterol und Cholesterolester transportierenden LDL binden über das an ihrer Oberfläche angelagerte ApoB100 an LDL-R der Zelloberfläche. Nach Aufnahme werden die vorrangig in LDL enthaltenen Cholesterolester zu Cholesterin hydrolysiert, welches sich in der Zelle in die Plasmamembran einlagert (Tabas, 1995). Die intrazelluläre Freisetzung von Cholesterol nach der Internalisierung und Degradation der LDL induziert verschiedene zelluläre Kontrollmechanismen zur Aufrechterhaltung der Cholesterolhomöostase: Die eigene Biosynthese von Cholesterol wird von der Zelle gedrosselt, die Expression von LDL-R wird reduziert und die Reveresterung von Cholesterol wird von der Zelle gesteigert. Diese durch Sterol-regulierte Bindungsproteine kontrollierten Mechanismen (Brown und Goldstein, 1997) verhindern wirkungsvoll eine für die Zelle toxisch wirkende Cholesterolakkumulation im Intrazellularraum.

1.7. Ziel der Arbeit

Die Lipoproteinrezeptoren LDL-R und LRP stellen die bis heute am besten charakterisierten Rezeptoren für triglyceridreiche Lipoproteine dar. Über die Interaktion dieser Rezeptoren mit Apolipoproteinen werden die Lipoproteine von Hepatozyten internalisiert und damit aus dem allgemeinen Blutkreislauf entfernt. Es konnte gezeigt werden, daß LDL-R und LRP für Bindung und Aufnahme der triglyceridreichen Lipoproteine verantwortlich sind. Die internalisierten Rezeptor-Ligand-Komplexe werden in den verschiedenen endosomalen Kompartimenten der Zelle weiter transportiert und metabolisiert. Im Gegensatz zu den von den Zellen auf dem Wege des Rezeptorrecyclings zur Zelloberfläche zurückgeführten LDL-R (Brown et al., 1983) und LRP (Dickson et al., 1981), werden die in diesem System von Apolipoproteinen gebildeten Liganden des Lipoproteinstoffwechsels auf unterschiedliche Weise intrazellulär metabolisiert. Abhängig von den strukturellen Eigenschaften des Rezeptor-Ligand-Komplexes werden die endozytierten Lipoproteine, bzw. deren Bestandteile, entweder lysosomal degradiert, als intaktes Lipoprotein retroendozytiert, oder im Sinne eines „Recyclings“ als Rezeptor-Apolipoprotein-Komplex resekretiert. Für die Apolipoproteine der Chylomikronen

und Chylomikronen Remnants konnte gezeigt werden, daß Apo B48 ausschließlich lysosomal degradiert, ApoC und ApoE aber zu einem großen Teil zur Oberfläche zurück transportiert werden (Heeren et al., 1999).

In dieser Arbeit soll nun, mittels Pulse Chase Experimenten an Fibroblasten und „Mouse Embryonic Fibroblasts“ (MEF) untersucht werden in wie weit das Recycling der Apolipoproteine der Chylomikronen von der Expression der Lipoproteinrezeptoren LDL-R und LRP abhängig ist. Die als Grundlage dieser Untersuchung dienenden Zelllinien der Fibroblasten und MEF sollen im ersten Teil dieser Arbeit hinsichtlich ihrer LDL-R und LRP Expression genau charakterisiert werden. Darauf folgend sollen die sich in ihrer Rezeptorexpression unterscheidenden Zellen in Pulse Chase Experimenten bezüglich der Aufnahme und der intrazellulären Metabolisierung von Chylomikronen, bzw. deren Apolipoproteinen, vergleichend untersucht werden. Die Anreicherung der in den Versuchen die Liganden darstellenden radioaktiv markierten Chylomikronen mit nicht markierter LpL, bzw. ApoE, erlaubt eine weitere Differenzierung der Einflüsse von LDL-R und LRP.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Geräte

- Brutschrank (Heraeus)
- Zellkultur-Werkbank (Gelaire)
- Blottingkammer (Biorad)
- Elektrophoresekammer (Desaga)
- Powersupply (LKB)
- Heizblock Thermostat 5320 (Eppendorf)
- Vortexer Reax 2000 (Heidolph)
- Personal Computer mit den Programmen MS Word und MS Excel
- Spektralphotometer 150-20 (Hitachi)
- Gammacounter (Packard)
- Ultrazentrifuge L7-55 mit Swing out rotor SW 41 (Beckmann)
- Ultrazentrifuge OTD65B mit Festwinkelrotor FW647 (Sorvall)
- Laborzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus)
- Laborzentrifuge Universal (Hettich)
- Laborzentrifuge Rotana/RP (Hettich)
- Eppendorf Zentrifuge 3200 (Eppendorf)
- Lichtmikroskop Olympus mit Objektiven Olympus Sp Plan 10x, CD Plan 20x und 40x

2.1.2. Verbrauchsmittel

Die Plastikartikel für die Zellkultur wurden von der Firma NUNC bezogen, Nitrocellulose Porengröße 0,45 μm lieferte die Firma Schleicher & Schuell. Sterilfilter (0,45 μm) kamen von der Firma Sarstedt, Dialyseschläuche VISKING dialysis tubing 8/32 Durchmesser 6mm und VISKING dialysis tubing 36/32 Durchmesser 27mm von Serva, PD-10 Gelchromatographiesäulen Sepadex G25 von Pharmacia und die Glasplatten für die Gelelektrophorese von Desaga.

2.1.3. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in p.a. Qualität bezogen und entsprechen, soweit nicht gesondert vermerkt, der folgenden Auflistung:

Acrylic (Roth), Ammoniumpersulfat (Serva), Beta-Mercaptoethanol (Merck), Bisacrylamid (Serva), Borsäure (Merck), Bromphenolblau (Merck), BSA Rinderserumalbumin Fraktion V (Sigma), Calciumchlorid (CaCl) (Merck), Ethanol (Merck), Foetal Bovine Serum (FBS) (Gibco), Glutaminlösung (Gibco), Glycerin (Merck), Glycin (Merck), Schwefelsäure (H₂SO₄) (Merck), Salzsäure (HCl) (Merck), Heparin (Roche), ¹²⁵J-Jodnatrium (Amersham), Kaliumbromid (Merck), Mercaptoethanol (Serva), Methanol (Merck), Natriumchlorid (Merck), Natriumdesoxycholat (Merck), Natronlauge (Merck), Phosphat Bufferd Saline (PBS) (Gibco), Penicillin/Streptomycin (Gibco), Ponceau S 0,2% in 3% TCA (Serva), Natronlauge (NaOH) (Merck), Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva), Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva), Trichloressigsäure 50% (TCA) (Sigma), Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (Roth), TritonX100 (Merck), 10x Trypanblaulösung (Gibco), Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco), Tween20 (Merck), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (Merck).

2.1.4. Zellkultur

■ Normalmedium aus:

- Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)
- 10% Foetales Kälberserum (FBS),
- 100IU/ml Penicillin / Streptomycin
- 1x Glutaminlösung

■ LPDS-Medium aus:

- Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)
- 10% Lipoproteindefizientes Serum aus FBS (LPDS),
- 100IU/ml Penicillin / Streptomycin
- 1x Glutaminlösung

■ PBS

■ Trypsin / EDTA-Lösung

■ 10x Trypanblaulösung

■ Zellen:

- FH-Fibroblasten aus humanen Hautbiopsien präpariert (UKE, Hamburg)
- Fibroblasten (aus humanen Hautbiopsien präpariert (UKE, Hamburg)
- Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF) (Department of Molekular Genetics and Internal Medicine, University of Texas, Dallas)

■ Plastikwaren: Kulturflaschen, „12-well“ Platten, Zentrifugationsröhrchen

2.1.5. Herstellung von Lipoproteindefizientem Serum (LPDS)

■ Fetal Bovine Serum (FBS)

■ Kaliumbromid (KBr)

■ PBS

■ Dialyseschlauch VISKING dialysis tubing 36/32 (Serva)

2.1.6. Isolierung der Zellproteine

■ Cell Lysis Buffer (CLB) aus:

- 80 mM NaCl
- 50 mM Tris
- 2mM CaCl
- 1% TritonX100
- in Aqua dest. ; pH=8,0

■ Protease Inhibitor Cocktail (PIC) aus:

- 10 mM Chymostatin (Calbiochem)
- 10 mM Leupeptin (Calbiochem)
- 10 mM Antipain (Calbiochem)
- 1 mM PepstatinA (Calbiochem), 1:1 mit Dimethylsulfoxid (Sigma)

■ Zellschaber (NUNC)

2.1.7. Bestimmung der Zellproteinkonzentration

■ BioRad Protein Assay (BioRad)

■ Albumin Standardlösung (Pierce)

2.1.8. SDS-PAGE

■ Trenngel (7,5%) aus:

- 10ml unterer Acrylamidlösung (30g Acrylamid ; 0,4g Bisacrylamid ad 100 ml Aqua dest.)
- 10ml Untergelpuffer (1,7 M Tris-HCl; pH=9,1 mit 18%iger HCl)
- 10ml TEMED Lösung (0,6 ml Tetramethylethyldiamin ad 100ml Aqua dest)
- 10ml Ammoniumpersulphat Lösung (200mg Ammoniumpersulphat ad 100ml Aqua dest)

■ Sammelgel aus

- 5ml oberer Acrylamidlösung (12g Acrylamid; 0,8g Bisacrylamid ad 100ml Aqua dest)
- 5ml Obergelpuffer (0,2 M Tris-HCl mit 1N H₂SO₄ auf pH=6,14)
- 2ml Ammoniumpersulphat Lösung (200mg Ammoniumpersulphat ad 100ml Aqua dest)
- 8ml Aqua dest
- 20µl TEMED

■ Unterer Elektrodenpuffer (0,42 M Tris mit 18%iger HCl auf pH=9,5)

■ Oberer Elektrodenpuffer (0,04 M Borsäure; 0,04 M Tris; 1‰ SDS; mit 18%iger HCl auf pH=8,64)

■ SDS Lösung (10% Natriumdodecylsulphat in 50mM Tris)

■ Bromphenolblaupuffer (Spatelspitze Bromphenolblau in Aqua dest lösen; 87%iges Glyzerin mit Bromphenolblaulösung auf 80% verdünnt)

■ Proteinstandard high molecular weight (BioRad)

■ Proteinstandard low molecular weight (BioRad)

■ β-Mercaptoethanol

■ Albumin-Lösung (Pierce)

2.1.9. Western Blot und Immunfärbung

- Ponceau 0.2 % in 3 % Trichloressigsäure
- Elektro-Blottingpuffer (20mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % Methanol)
- Blockingpuffer (5% BSA in Waschpuffer A)
- Waschpuffer A (10mM Tris, 86mM NaCl, 0,1% Tween 20 pH=7,4)
- Waschpuffer B (10mM Tris, 86mM NaCl, 0,1% Tween 20, 0,3mM SDS, 6mM Natriumdesoxycholat ; pH=7,4)
- Antikörper:
 - Polyklonale Antikörper aus dem Kanichen gegen LDL-R (Department of Molekular Genetics and Internal Medicine, University of Texas, Dallas)
 - Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen LRP (Department of Molekular Genetics and Internal Medicine, University of Texas, Dallas)
 - Ziege anti Kaninchen Immunoglobuline gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Dianova)
- Blockingpuffer (Chloronaphtol-Färbung) (5% BSA in Waschpuffer A)
- Substratlösung (Chloronaphtol-Färbung)
 - 1 Tablette 4-Chlor-1 Naphtol (30mg) (Sigma)
 - 10ml Methanol
 - ad 50ml mit PBS
 - 20µl H₂O₂ Lösung (30%)
- Milchpulver Glücksklee Magermilchpulver (Nestle)
- Blockingpuffer (ECL-Färbung) (10% Milchpulver in Waschpuffer A)
- ECLplus Western Blotting detection system (Amersham)
- Autoradiographie-Film BIOMAX MR 18x24 cm (Kodak)

2.1.10. Isolierung von humanen Chylomikronen

- Plasma von ApoCII-defizienten Patienten
- PBS

- 60% Sucroslösung (Sigma)
- PIC (s.o.)
- Na-Azid (Sigma)

2.1.11. Isolierung von humanen LDL und HDL

- Plasma von fettstoffwechselgesunden Patienten
- Kaliumbromiddichtelösungen:
 - Lösung A ($\delta=1,006$ g/ml): 0,9 Gew% NaCl, 10mM Tris; pH=8,6
 - Lösung B ($\delta=1,335$ g/ml): 282 g KBr und 500 ml Lösung A; pH=8,6
 - Lösung C ($\delta=1,019$ g/ml): 486,2 ml Lösung A und 20 ml Lösung B; pH=8,6
 - Lösung D ($\delta=1,063$ g/ml): 477,2 ml Lösung A und 100 ml Lösung B; pH=8,6
- PIC (s.o.)
- Na-Azid (Sigma)

2.1.12. Jodierung von Chylomikronen und LDL

- CM und LDL Lipoprotein Lösungen
- ^{125}J -Natrium (Amersham)
- Glycinpuffer (1M Glycin, mit 1N NaOH auf pH=10 eingestellt)
- Iodmonochlorid Lösung (3,3mM ICl, 2 M NaCl in 0,1 N HCl)
- PBS
- PD-10 Säule

2.1.13. Pulse Chase Experimente

- PBS
- Inkubationsmedium: 5% BSA in DMEM
- Lösungen der radioaktiv markierten Liganden: ^{125}J -CM und ^{125}J -LDL
- Lösungen der nicht radioaktiv markierten Liganden: CM und LDL
- bovine LpL (bLpL) Stammlösung 0,1 mg/ml (Dr. G. Olivecrona, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, University Umea, Schweden)
- THL Stammlösung (50mg Orlistat ®Roche (THL) pro ml Ethanol)
- ApoE (3/3) mittels präparativer SDS-PAGE isoliert (Labor Beisiegel)

- Heparinlösung (770 U/ml): 5ml Heparin (20000 U/ml) ad 130 ml PBS
- Chasemedium: 10% HDL in DMEM
- 10% TritonX100 in Aqua dest.
- 50% Trichloressigsäure (TCA)
- 0,1N NaOH

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Das Arbeiten mit Zellkulturen verlangt die unbedingte Vermeidung mikrobieller Kontamination. Zu diesem Zweck wurden alle Arbeiten mit sterilen Instrumenten in einer speziellen Werkbank durchgeführt.

Die in 2ml Röhrchen in flüssigem Stickstoff bei -198° C gelagerten Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut, unter Zugabe von 10ml Medium in 15ml Röhrchen überführt, und 5min bei 1000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, das Zellpellet in 5ml frischem Medium aufgenommen, und in 225ml Zellkulturflaschen, in die bereits 5ml Medium vorgelegt war, überführt. Bei 37°C im Brutschrank dauerte es ungefähr 1-6 Tage bis der Zellrasen konfluent gewachsen war.

Um die Zellen aufzuteilen und in andere Gefäßen zu überführen, war es notwendig, sie mittels Trypsinbehandlung vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Hierzu wurden die Zellen mit 5ml PBS gewaschen und anschließend ca. 3-5 Minuten mit 5ml Trypsinlösung bei 37°C inkubiert. Die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurde mikroskopisch kontrolliert. Zur Inhibition des Trypsins wurden die abgelösten Zellen in ein 15ml Röhrchen mit vorgelegten 5ml Medium übernommen und nun 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Für die Aussaat definierter Zellmengen wurde das Zellpellet in einem definierten Volumen Medium aufgenommen. Hiervon wurden 50µl zu Zählung der Zellen abgenommen. Diese wurden mit 50µl Trypanblaulösung angefärbt und in der Neubauer Zählkammer gezählt. Durch die Trypanblaufärbung war es möglich, ausschließlich lebende Zellen zu zählen. Nach Berechnung der Zellzahl (Zahl der Zellen in 16

Kleinstquadraten $\times$ Verdünnung $\times 10^4$ = Zellzahl/ml) konnten nun definierte Zellmengen ausgesät werden.

Für die Pulse Chase Experimente wurden die Fibroblasten, FH-Fibroblasten und die „Mouse Embryonic Fibroblasts“ (MEF) in 12 Lochplatten ausgesetzt. Die MEF wurden mit einer Dichte von ca. 50.000 pro „well“ (Loch auf der Platte), die Fibroblasten und FH-Fibroblasten mit ca. 100.000 Zellen pro „well“ ausgesetzt.

2.2.2. Herstellung von Lipoproteindefizientem Serum

Aus dem in der Zellkultur verwendeten FBS wurde durch Extraktion der Lipoproteine ein Lipoproteindefizientes Serum (LPDS) hergestellt. Hierbei wurde das FBS zunächst durch Zugabe von Kaliumbromid (KBr) auf eine Dichte von 1,21 g/ml eingestellt. Die dazu notwendige Menge KBr wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{XgKBr} = \frac{\text{y ml Plasma} \times (\text{gewünschte Dichte} - \text{vorhandene Dichte})}{1 - (0,312 \times \text{gewünschte Dichte})}$$

Das so behandelte FBS wurde nun bei 38000 rpm und 4°C über Nacht in einem Festwinkelrotor ultrazentrifugiert. Die sich nach der Zentrifugation am oberen Rand des Zentrifugationsröhrchens befindenden Lipoproteine wurden großzügig abgenommen und verworfen. Das Serum, das dann von einem Großteil seiner Lipoproteine befreit war, wurde anschließend über Nacht in PBS dialysiert und konnte nach Sterilfiltration in der Zellkultur verwendet werden.

2.2.3. Isolierung der Zellproteine

Um die Proteine der kultivierten Zellen zu isolieren, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit Normal-, bzw. LPDS-Medium ausgesetzt. Es dauerte ca. 1-6 Tage bis die Zellen konfluent gewachsen waren und geerntet werden konnten. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine Degradierung der Zellproteine zu vermeiden. Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen in den Kulturflaschen mit jeweils 5ml PBS gewaschen. Darauf folgend wurden die Zellen nach Zugabe von 5ml PBS mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflaschen abgekratzt, mit der Pipette im PBS suspendiert, als

Zellsuspension in ein 15ml Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet, in dem sich das Zellprotein nun befand in 200 µl CLB - zu dem zur Inhibition der lysosomalen Proteasen PIC gegeben wurde - gelöst. Nach 30minütiger Zentrifugation der Lösung bei 13000 U/min und 4° C befand sich das Zellprotein jetzt im Überstand, der abgenommen und aus dem die Proteinkonzentration bestimmt wurde.

2.2.4. Bestimmung der Zellproteinkonzentration

Für die SDS-PAGE ist es notwendig, vorher die Konzentration des Zellproteins zu bestimmen, um gleiche Proteinmengen in die Taschen des SDS-PAGE-Gels auftragen zu können. Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) durchgeführt.

Es wurden jeweils 10 µl einer Probe zu 790 µl Aqua dest. gegeben und anschließend mit 200µl des Bradford Farbreagens versetzt. Der so hergestellte Ansatz wurde gevortext und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde dann photometrisch bei 595nm Wellenlänge gemessen. Um aus der ermittelten Extinktion die Proteinkonzentration zu bestimmen wurde das Photometer mit einer Konzentrationsreihe (2 bis 0,0625 mg/ml) eines Albuminstandards geeicht. Mit einem hieraus ermittelten Faktor wurden die Extinktionen der Proben-Ansätze multipliziert und so deren Proteinkonzentrationen bestimmt.

2.2.5. Auftrennung des Zellproteins mittels SDS-Polyacrylamid-elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung des Zellproteins für das anschließende Western Blotting und die Immundetektion wurde mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach Neville (Neville 1971) durchgeführt. Das Sammelgel enthielt 3%, das Trenngel 7,5% Acrylamid. Die Proben wurden in einem definierten Volumen SDS-Puffer aufgenommen und mit einer Glycerin-Lösung beschwert. Zur Sichtbarmachung der Lauffront wurde Bromphenolblau zugesetzt.

Jetzt wurden die unreduzierten Proben für 10 Minuten bei 95°C gekocht. Die 200µl fassenden Taschen des Sammelgels wurde so beschickt, daß sie jeweils 40-80µg Zellprotein enthielten. In einer Tasche wurde stets ein reduziert aufgetragener Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für die ersten 30 Minuten bei konstanten 20mA, danach bei konstanten 30mA für ca. 3 Stunden.

2.2.6. Western Blot und Immunfärbung

Das durch die SDS-PAGE aufgetrennte Zellprotein der MEFs, Fibroblasten und FH-Fibroblasten wurde durch Western Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und durch Immunfärbung auf Vorhandensein, bzw. Ausprägung der LDL-Rezeptor- und LRP-Expression untersucht.

Nach der SDS-PAGE befinden sich die nun nach Molekulargewicht aufgetrennten Zellproteine auf dem Gel. Durch Elektroblothing wurden sie über Nacht bei einem Strom von 250mA auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierbei wurden zuerst die Proteine auf der Nitrozellulose mit Ponceau-Lösung gefärbt, die Nitrozellulose beschriftet, geschnitten und anschließend wieder mit PBS entfärbt. Für die folgende Immundetektion und Färbung wurden zwei unterschiedliche Methoden verwandt:

Die Immundetektion mit anschließender Chloronaphtol-Färbung erfolgte nach der Methode von Beisiegel (Beisiegel 1982). Die Nitrozellulosestreifen wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen für 1 Stunde in einem Blockingpuffer gelegt. Es folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper (Anti-LDL-R bzw. Anti-LRP): Die Nitrozellulosestreifen wurden über Nacht bei 4°C, unter leichtem Schwenken mit dem Antikörper, der im Verhältnis 1:1000 im Blockingpuffer gelöst war, inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Blots 1 Minute in Waschpuffer A, zweimal 10 Minuten in Waschpuffer B, und noch einmal 1 Minute in Waschpuffer B gewaschen. Jetzt konnte die Inkubation mit dem 2. Antikörper erfolgen. Dieser wurde wieder in einer Verdünnung von 1:3000 zu dem Blockingpuffer gegeben, und die Blots wurden darin für 1 Stunde unter

leichtem Schütteln inkubiert. Es wurde erneut nach oben beschriebenen Schema gewaschen und für 10 Minuten in Substratlösung entwickelt. Schließlich wurde die Farbreaktion mit Leitungswasser gestoppt und die Streifen zwischen Filterpapier getrocknet.

Bei der Immundetektion mit anschließender ECL-Färbung wurden bis zur Färbung der Membran alle Schritte wie bei der oben beschriebenen Immundetektion mit Chloronaphthol-Färbung durchgeführt. Der einzige Unterschied besteht bis hier hin in der Verwendung von 10% Milchpulver anstatt von 5% BSA im Blockingpuffer.

Die Färbung erfolgt nun mittels eines kommerziell erhältlichen „ECL“-Kits. Hierbei wurde der Blot 1 Minute lang in die kurz zuvor zusammengemischten ECL-Lösungen gelegt, anschließend getrocknet und zwischen Klarsichtfolie gelegt. Die Membran wurde anschließend im Dunkelraum auf einen Autoradiographiefilm gelegt, der durch die Chemolumineszenz der ECL-Färbung belichtet wurde. Die auf dem Film nun sichtbaren Banden wurden mittels Videoaufnahme dokumentiert.

2.2.7. Isolierung von humanen Chylomikronen

Aus dem Plasma von Patienten mit Typ-1 Hypertriglyzidämie wurden Chylomikronen isoliert. Durch das kongenitale Fehlen des ApoC-II ist hier die hydrolytische Aktivität der Lipoproteinlipase erheblich herabgesetzt, so daß es zu einer starken Akkumulation von Chylomikronen kommt. Das Plasma erscheint milchig weiß. Durch Ultrazentrifugation konnten die Chylomikronen vom restlichen Plasma und dessen Bestandteilen getrennt werden. Das Plasma wurde dazu zuerst in ein 12ml Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben und darin für 1h bei 38000rpm und 4°C in einem Swing out Rotor zentrifugiert. Die geringere Dichte der Chylomikronen ($\delta=0,996$ g/ml) führt dazu, daß sie sich nach der Zentrifugation am oberen Rand des Zentrifugationsröhrchens befinden. Sie konnten nun mittels eines Spatels und einer Kanüle abgenommen werden und in 3ml PBS gelöst werden. Um die Chylomikronen weiter zu reinigen, wurde die Lösung nun in Verhältnis 5:1 mit 60%iger Sucroslösung beschwert, und in Zentrifugationsröhrchen, in die bereits 8 ml PBS vorgelegt waren, überführt. Es wurde erneut für 1h bei 38000rpm zentrifugiert. Zur weiteren Reinigung wurde diese Prozedur und die Zentrifugation noch zwei weitere Male unter oben

genannten Bedingungen durchgeführt. Die so gereinigten Chylomikronen wurden mit PIC und Na-Azid versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.8. Isolierung von humanen LDL und HDL

Die LDL und HDL wurden aus dem Plasma gesunder Spender gewonnen. Um die Lipoproteine vom Plasma zu trennen, wurde das Plasma mit Kaliumbromid (KBr) auf eine Dichte von 1,21 g/ml eingestellt. Die Menge des KBr welche nötig war, um das Plasma auf diese Dichte zu bringen, wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{XgKBr} = \frac{\text{y ml Plasma} \times (\text{gewünschte Dichte} - \text{vorhandene Dichte})}{1 - (0,312 \times \text{gewünschte Dichte})}$$

Das nun auf $\delta=1,21\text{g/ml}$ eingestellte Plasma wurde über Nacht bei 38.000rpm und 4°C in einem Swing-Out Rotor zentrifugiert. Anschließend wurden die Lipoproteine abgenommen und unter einen Dichtegradienten geschichtet. Es wurden Lösungen mit den Dichten 1,006g/ml, 1,019g/ml, 1,063g/ml und die Probe ($\delta=1,21\text{g/ml}$) verwandt. Angefangen mit der Lösung der geringsten Dichte wurde mit der Lösung der jeweils nächst höheren Dichte unterschichtet. Der so hergestellte Dichtegradient wurde über Nacht bei 38.000rpm und 4°C in einem Swing-Out Rotor zentrifugiert. Die LDL befinden sich nun in der zweiten Schicht von oben ($\delta=1,019\text{g/ml}$), die HDL in der untersten Schicht ($\delta=1,063\text{g/ml}$). Die Lipoproteine konnten jetzt getrennt mit einer Spritze abgenommen werden. Nach Entfernung des KBr durch zwölfstündige Dialyse in PBS wurden sie sterilfiltriert, zur Lagerung im Verhältnis 1:1000 mit PIC und Na-Azid versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.9. Jodierung von Chylomikronen und LDL

Die radioaktive Markierung der Chylomikronen und LDL wurde von wissenschaftlichen Mitarbeitern der Labors nach der Jodmonochlorid Methode (McFarlane, 1958) durchgeführt.

2.2.10. Pulse Chase Experimente: Quantifizierung von Aufnahme, Abbau und Recycling radioaktiv markierter Liganten

Die MEF, Fibroblasten und FH-Fibroblasten wurden für die Pulse Chase Experimente auf „12-well“ Platten ausgesetzt und waren nach ca. 1-4 Tagen konfluent gewachsen. Für die Pulse Chase Versuche wurde der Zellrasen zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die entsprechenden Liganten pipettiert. Diese wurden abhängig von ihrer spezifischen Aktivität in Mengen von 5-10 µg/ml in das aus DMEM und 5% BSA bestehende Inkubationsmedium gegeben. In den Ansätzen mit den Chylomikronen wurden die ¹²⁵J-markierten Lipoproteine so eingesetzt, daß eine spezifische Aktivität von 500.000 cpm/ml Inkubationsmedium erreicht wurde. Die radioaktiv markierten LDL wurden mit 1.000.000 cpm/ml eingesetzt. Bei jedem Versuch wurden äquivalente Mengen der Liganden verwandt. Bei allen Versuchen wurden Doppelwerte bestimmt. Zur Bestimmung der unspezifischen Aufnahme der Liganden durch die Zellen wurde pro Doppelwert jeweils ein Ansatz, zu dem ein dreißigfacher Überschuß an nicht markiertem Liganden pipettiert wurde, mitgeführt. Ansätzen, in denen Chylomikronen als Ligand benutzt wurden, wurde zur Steigerung der Aufnahme entweder 0,2 µg/ml LpL, oder 2,5 µg/ml Apo E zugegeben. Im Falle der Zugabe von LpL, wurde deren hydrolytische Aktivität durch die Addition von 2,5 µg/ml THL

inhibiert. Die mit diesem „Pulse“-Medium versehenen Zellen wurden nun 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zur Entfernung der bis zu diesem Zeitpunkt nicht internalisierten radioaktiv markierten Lipoproteine - im Kühlraum und auf Eis - dreimal mit PBS gewaschen. Das erste Mal für 1 Minute, das zweite und dritte Mal für jeweils 5 Minuten. Zur Ablösung der an der Zelloberfläche gebundenen ^{125}J -markierten Liganden wurde 10 Minuten mit Heparin gewaschen, bevor der letzte Waschschrift noch einmal für 1 Minute mit PBS erfolgte. Pro „well“ wurden jetzt 0,5 ml Chasemedium pipettiert und hiermit für 90 bzw. 240 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Chasemedium abgenommen und in 1,5ml Eppendorf Tubes, in denen 150µl TritonX-100 vorgelegt war, pipettiert. In die „wells“ wurde jetzt einmal jeweils 500 PBS gegeben, wieder abgenommen und in das zugehörige Eppendorf Tube gegeben. Nach 30 Minuten auf Eis wurden jeweils 350µl TCA Lösung hinzugegeben, gevortext, noch ein mal für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann 30 Minuten bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Die durch das TCA präzipitierten Proteine, die das Apolipoprotein Recycling repräsentieren, befinden sich nun im Pellet. Im Überstand befindet sich das durch lysosomalen Abbau von Apolipoproteinen entstandene ^{125}I -Tyrosin. Der Überstand wurde in Counterröhrchen abpipettiert, das Pellet in 500µl Natronlauge gelöst und ebenfalls in Counterröhrchen überführt. Schließlich wurden die Zellen, die sich noch auf dem Boden der „wells“ befanden, in 500µl Natronlauge unter leichtem Schütteln lysiert, als Repräsentanten der zellulären Aufnahme der ^{125}J -markierten Lipoproteine in Counterröhrchen gegeben und zusammen mit den oben genannten Proben in einem Gammacounter auf die enthaltene Radioaktivität hin untersucht. Die Konzentration des Zellproteins wurde nun nach der bereits beschriebenen Methode von Bradford bestimmt und zu den Daten aus der Countbestimmung in Bezug gesetzt. So konnten Aufnahme, Abbau und Recycling der untersuchten Liganden pro mg Zellprotein bestimmt werden. Die nach 60 Minuten Inkubation von den Zellen erreichte spezifische Gesamtaufnahme der ^{125}J -markierten Lipoproteine konnte durch Addition der noch intrazellulär detektierbaren (Aufnahme), der TCA-präzipitierbaren (Recycling), und der nicht TCA-präzipitierbaren (Abbau), Radioaktivität bestimmt werden.

3. Ergebnisse

Die Untersuchung der Einflußnahme der Lipoproteinrezeptoren LDL-R und LRP auf das Recycling von Chylomikronen, bzw. deren Apolipoproteinen, wurde in dieser Arbeit in zwei Schritten durchgeführt.

Im ersten Teil dieser Arbeit werden die das Ausgangsmaterial der Untersuchung darstellenden, auf verschiedenen Medien kultivierten Zelllinien der Fibroblasten und embryonalen Mäusefibroblasten hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Rezeptorexpression genau charakterisiert. Die Expression der Lipoproteinrezeptoren LDL-R und LRP wird durch Western Blotting und daran anschließende Immundetektion des Rezeptorproteins dargestellt.

Darauf aufbauend folgt in einem zweiten Schritt die Untersuchung von Aufnahme und intrazellulärer Metabolisierung der Chylomikronen. Anhand von radioaktiven Pulse Chase Experimenten mit den verschiedenen Zelllinien wird der Einfluß der Rezeptorexpression auf die intrazellulären Transportwege, insbesondere in Hinblick auf das Recycling von Rezeptor und Ligand, untersucht.

3.1. Charakterisierung der Zelllinien

Die phänotypische Rezeptorexpression wurde durch Western Blotting des Zellproteins und anschließende Detektion der Rezeptorproteine mit spezifischen Antikörpern verifiziert. Es wurden die Rezeptoren LDL-R und LRP untersucht. Die in den Abbildungen angegebenen Molekulargewichte wurden mit Hilfe eines bei jedem Gel mitlaufenden, reduziert aufgetragenen Molekulargewichtsmarkers bestimmt. Um sicherzustellen, daß bei der Kultivierung der Zellen keine Kreuzkontamination stattgefunden hat, wurden die Phänotypen der Zelllinien im Verlauf der Versuche wiederholt überprüft

3.1.1. Fibroblasten und FH-Fibroblasten

Abbildung 2 zeigt das Ergebnis der Immundetektion des LDL-R und des LRP, auf von fettstoffwechselgesunden Spendern gewonnenen Fibroblasten und auf Fibroblasten von an Familiärer Hypercholesterinämie (FH) erkrankter Spender. Beide Zelllinien wurden jeweils auf Normalmedium und Lipoproteindefizientem Medium kultiviert.

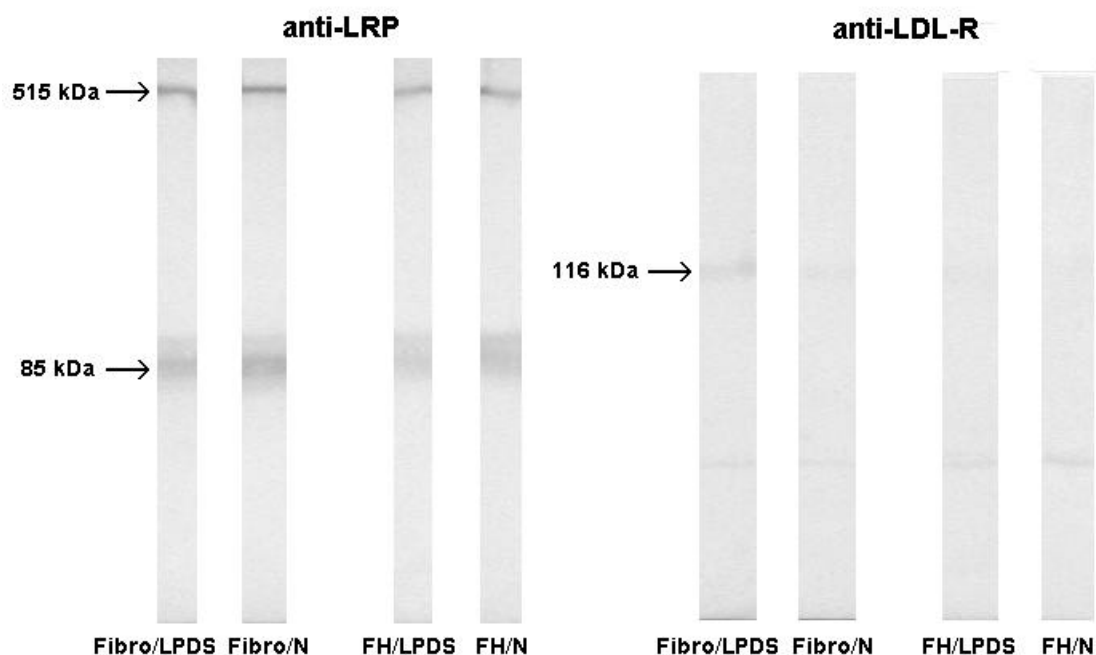


Abb. 2: Nachweis von LDL R und LRP auf Fibroblasten und FH-Fibroblasten

Pro Lane wurden 40 µg Zellprotein in jeweils unreduziertem Zustand auf ein 7,5 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurden die Blots mit polyklonalen Antikörpern gegen LDL R und LRP inkubiert. Die Abbildung zeigt die Immundetektion mit ECL-Färbung.

Die Abbildung zeigt, daß bei den auf LPDS-Medium gehaltenen Fibroblasten die Expression des 116 kDa schweren LDL-R, gegenüber den auf Normalmedium kultivierten Fibroblasten deutlich gesteigert ist. Die LDL-R-defizienten FH-Fibroblasten exprimieren, wie erwartet, weder auf Normal-, noch auf LPDS-Medium LDL-R auf ihrer Zelloberfläche. Trotz negativer Immundetektion konnte bei den FH-Fibroblasten eine LDL-R-Restaktivität von 5% festgestellt werden (Labor Beisiegel).

Das aus zwei Untereinheiten bestehende LRP konnte auf beiden Zelllinien und unter beiden Kulturbedingungen ungefähr gleich stark detektiert werden.

Es wurde sowohl bei den Fibroblasten, als auch bei den FH-Fibroblasten unter den Bedingungen der Kultur in LPDS-Medium eine diskret schwächere Expression des 515 kDa schweren größeren LRP Fragments beobachtet.

3.1.2. Mouse embryonic fibroblasts (MEF)

Die Zelllinien MEF1 und MEF4 wurden von Prof. J. Herz aus dem Department of Molecular Genetics and Internal Medicine der Universität von Texas in Dallas zur Verfügung gestellt. Bei den MEF handelt es sich um aus Mäuseembryonen gewonnene Fibroblasten, wobei die Zelllinie MEF1 sowohl LDL-R, als auch LRP auf ihrer Zelloberfläche normal exprimiert, und die Zelllinie MEF4 für keinen der beiden untersuchten Rezeptoren positiv ist.

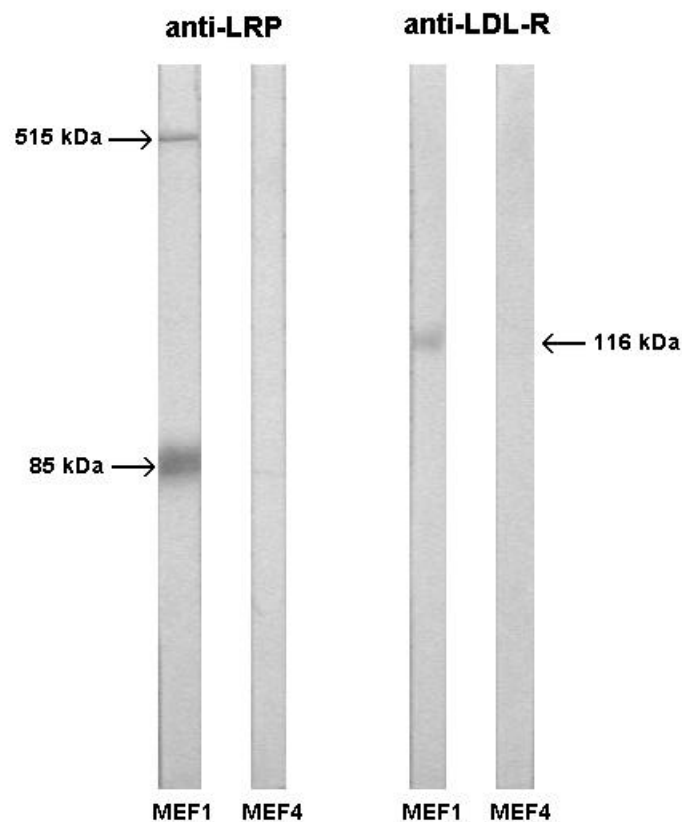


Abb. 3: Nachweis von LDL-R und LRP auf MEF 1 und MEF 4

Es wurden 40 µg Zellprotein pro Lane jeweils in unreduziertem Zustand auf ein 7,5 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurden die Blots mit polyklonalen Antikörpern gegen LDL-R und LRP inkubiert. Die Abbildung zeigt die Immundetektion mit 4-Chlor-1-Naphtol-Färbung.

Wie man in Abbildung 3 erkennen kann, wird der 116 kDa schwere LDL-R nur von den MEF1 exprimiert. Auf den MEF4 war keine LDL-R Expression detektierbar.

Das aus zwei Untereinheiten, mit Molekulargewichten von 85 und 515 kDa bestehende LRP konnte ebenfalls nur auf MEF1 detektiert werden. Bei den MEF 4 konnte lediglich eine sehr schwache Bande der 85 kDa Untereinheit detektiert werden. Es konnte für beide Zelllinien der erwartete Phänotyp in der Lipoproteinrezeptorexpression bestätigt werden.

3.2. Pulse Chase Experimente

Die Grundlage des Arbeitens in den Pulse Chase Experimenten stellen lebende Zellen und biologische Liganden dar, die in den an verschiedenen Versuchstagen durchgeführten Einzelexperimenten trotz identischer Rahmenbedingungen immer eine gewisse Variabilität aufwiesen. So sind in der Zellkultur mit steigender Passagenzahl immer Veränderungen der Zellen möglich. Des weiteren war es auch trotz Zellzählung nicht möglich, die Zellen in immer der exakt gleichen Dichte auszusäen. Die Präparationen der Lipoproteine fielen auf Grund ihrer Abhängigkeit vom Ernährungszustand des Spenders immer unterschiedlich aus. Darüber hinaus waren auch bei der radioaktiven Markierung der Lipoproteine immer gewisse Unterschiede in der spezifischen Aktivität und der relativen Verteilung der Radioaktivität zu registrieren. Schließlich muß bei den Lipoproteinen trotz Lagerung bei 4° C und Zugabe von Proteaseinhibitoren und Na-Azid mit biologischen Veränderungen im Sinne von Alterung und Zerfall gerechnet werden.

Um die Auswirkungen dieser genannten Variablen möglichst gering zu halten und eine gute Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten, wurden alle Versuche unter möglichst ähnlichen Rahmenbedingungen durchgeführt, nur Zellen in niedrigen Passagen verwendet, und die Liganden nach ihrer Isolation aus menschlichem Plasma und radioaktiver Markierung zügig und ohne lange Lagerung für die Experimente verwendet. In der Regel wurde jedes Experiment mehrfach wiederholt, um durch die oben genannten Variablen bedingte Artefakte zu relativieren und zu minimieren. Des weiteren wurden bei allen Versuchen Doppel- oder Vierfachwerte bestimmt.

Die Ergebnisse der Versuche wurden entweder in Form von Mittelwerten mehrerer unabhängig voneinander durchgeführter Experimente, oder durch das Ergebnis eines repräsentativen Einzelexperiments dargestellt. Im Falle der Darstellung von mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurde zusätzlich zu den Mittelwerten die Standardabweichung mit angegeben.

3.2.1. Fibroblasten und FH-Fibroblasten

In den hier dargestellten Experimenten wurden, die sich in ihrer LDL-R und LRP Expression unterscheidenden, auf Normal- bzw. LPDS-Medium kultivierten Fibroblasten und FH-Fibroblasten hinsichtlich Aufnahme, intrazellulären Abbaus und des Recyclings von Chylomikronen und LDL verglichen. Neben den die intrazellulären Stoffwechselwege beschreibenden Darstellungen wird auch die aus der Addition von intrazellulär detektierbarer und im Chasemedium enthaltener Radioaktivität ermittelte Gesamtaufnahme gezeigt.

Bei jedem der dargestellten Experimente betrug die Inkubationszeit der Zellen mit den radioaktiv markierten Lipoproteinen 60 Minuten. Für die Untersuchung von lysosomalen Abbau und Recycling wurden Chasezeiten von 90, bzw. 240 Minuten gewählt. Zur Steigerung der Aufnahme wurden, in mit ^{125}J -markierteten Chylomikronen als Ligand durchgeführten Experimenten, entweder LpL oder ApoE dem Inkubationsmedium als weiterer nichtmarkierter Ligand zugesetzt. In Versuchen mit ^{125}J -markierteten LDL wurde dem Inkubationsmedium kein weiterer Ligand zugegeben.

Im ersten Teil der Experimente soll zunächst vergleichend die Aufnahme der ^{125}J -markierteten Chylomikronen unter Zugabe von entweder ApoE oder LpL zum Inkubationsmedium untersucht werden. Darüber hinaus ist ein Vergleich mit der Aufnahme von LDL in die untersuchten Zelllinien dargestellt (Abb. 4.).

In Abbildung 4 (A) ist zu sehen, daß die LpL-vermittelte Internalisierung der Chylomikronen sowohl bei den Normal-Fibroblasten, als auch bei den LDL-R defizienten FH-Fibroblasten unter Kulturbedingungen mit Lipoproteindefizientem Medium deutlich gesteigert ist. Diese Steigerung der Aufnahme durch LPDS-Medium ist bei den Normal-Fibroblasten stärker ausgeprägt als bei den FH-Fibroblasten. Unter den Bedingungen einer Kultur auf Normalmedium ist zwischen den beiden Zelllinien kein signifikanter Unterschied in der Aufnahme der Chylomikronen zu erkennen.

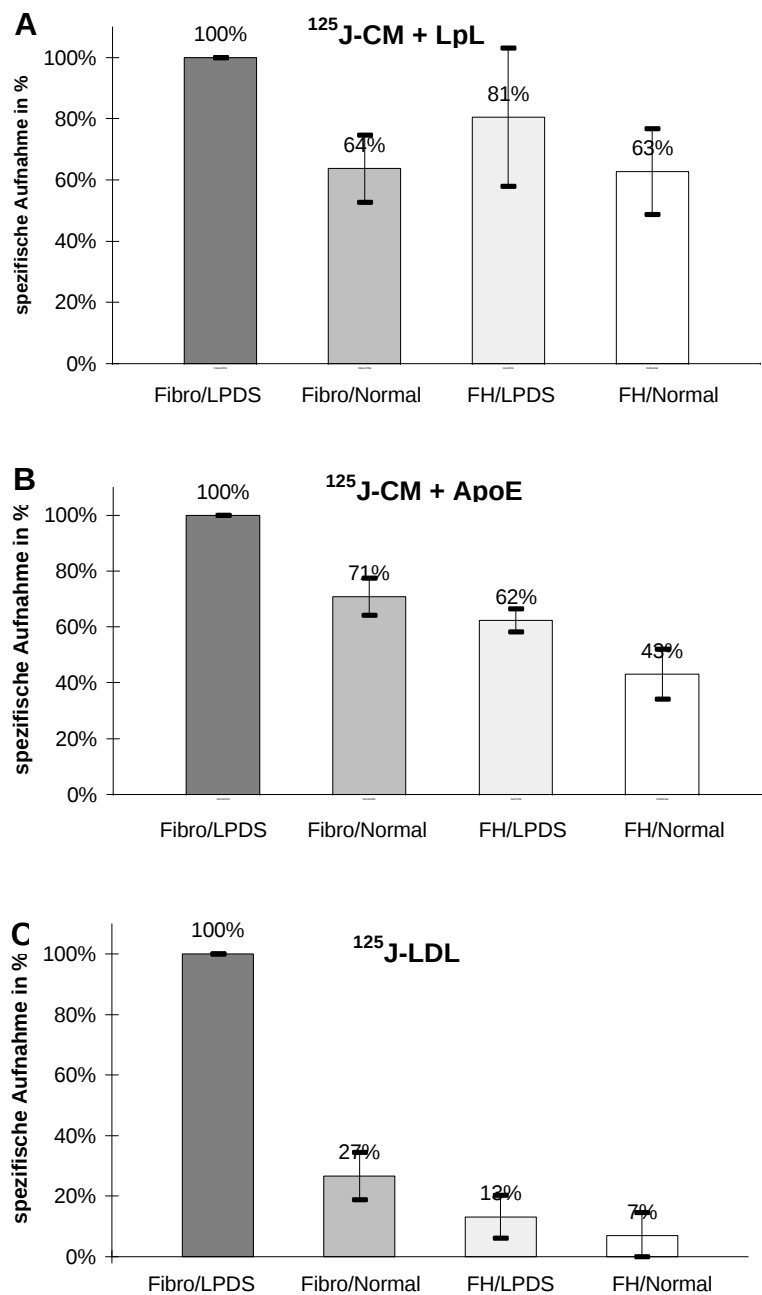


Abb. 4. Spezifische Aufnahme von ^{125}J -markierten Chylomikronen unter Zugabe von LpL oder ApoE und ^{125}J -LDL in Fibroblasten und FH-Fibroblasten nach 60 Minuten Inkubation

Die Werte entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen von mehreren ([A]n=6; [B]n=3; [C]n=12) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Aufnahme der auf LPDS-Medium kultivierten Fibroblasten wurde 100% gesetzt und vergleichend die prozentuale Aufnahme der auf Normalmedium kultivierten Fibroblasten und der auf LPDS- bzw. Normalmedium gehaltenen FH-Fibroblasten dargestellt. Bei den Abbildungen A und B erfolgte die Zugabe von 0,2µg/ml THL-inhibierter LpL [A], bzw. 2,5µg/ml ApoE [B] zum Inkubationsmedium.

Im Vergleich zu der LpL-vermittelten Aufnahme (A) sind bei der ApoE-vermittelten Aufnahme (B) der triglyceridreichen Lipoproteine deutliche Unterschiede zu erkennen: Obwohl beide Zelllinien weiterhin eine deutliche Stimulierbarkeit der Aufnahme radioaktiv markierter Chylomikronen durch das Lipoproteindefiziente Medium zeigen, nehmen die LPDS-stimulierten LDL-R-defizienten FH-Fibroblasten unter diesen Bedingungen nicht mehr Chylomikronen auf als die nicht stimulierten Normalfibroblasten. Die Abbildung zeigt, daß unter Zugabe von ApoE die Aufnahme der Chylomikronen mit abnehmender LDL-R Expression der Zellen geringer wird.

Die ausgeprägtesten Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien zeigen sich schließlich bei der rezeptorvermittelten Endozytose der LDL : Durch die LPDS-Stimulation läßt sich im Falle der gesunden Fibroblasten die Aufnahme von LDL um das 3,7fache, und im Falle der FH-Fibroblasten um ungefähr das doppelte steigern.

Da die in Abbildung 4 dargestellten Experimente an verschiedenen Versuchstagen, und zum Teil auch mit in verschiedenen Lipoproteinpräparationen gewonnenen Liganden durchgeführt wurden, beinhalten sie eine gewisse Variabilität, auf Grund derer sie untereinander nur bedingt vergleichbar sind. Um einen möglichst unmittelbaren Vergleich zu ermöglichen, wird in der folgenden Abbildung (Abb. 5.) ein mit gleichen Zellen und Liganden durchgeführtes repräsentatives Einzelexperiment gezeigt. Weiterhin ermöglicht die folgende Abbildung einen Vergleich zwischen der Aufnahme der radioaktiv markierten Chylomikronen mit Zusatz eines weiteren nicht-markierten Liganden (ApoE/LpL) zum Inkubationsmedium und der Aufnahme ohne Zugabe eines zweiten Liganden.

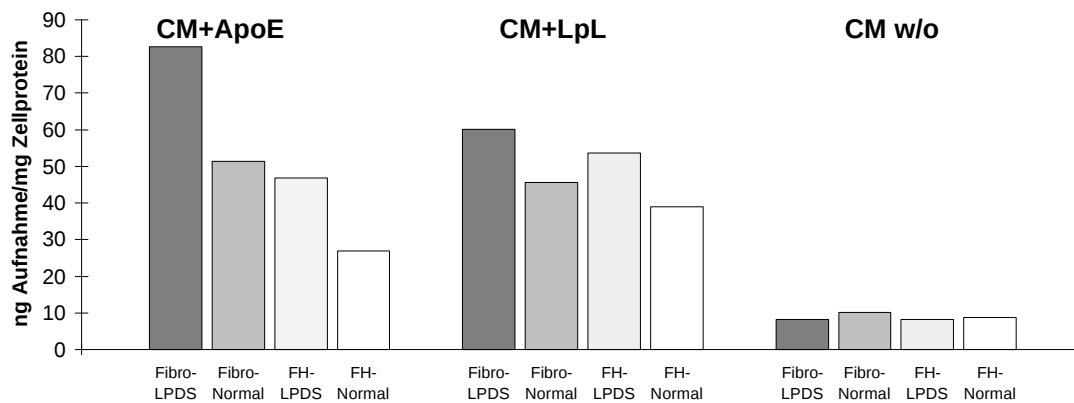


Abb. 5. Spezifische Aufnahme ^{125}J -markierten Chylomikronen unter Zugabe von ApoE, LpL oder ohne Zugabe (w/o) eines weiteren Liganden im direkten Vergleich.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Duplikate eines Einzelexperiments. Das Experiment ermöglicht eine weitgehend direkte Vergleichbarkeit der spezifischen Aufnahme der CM nach 60minütiger Inkubationszeit, da es mit gleichen Zellen und gleichen ^{125}J -markierten Chylomikronen am gleichen Zeitpunkt durchgeführt wurde. Es wurde mit Zugabe von entweder 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ApoE, 0,2 $\mu\text{g/ml}$ THL-inhibierter LpL oder ohne Zusatz eines weiteren Liganden zum Inkubationsmedium durchgeführt. Veränderungen der Zellen mit steigender Passagenzahl, sowie der Lipoproteine mit längerer Lagerung sind bei dieser Darstellung nicht von Bedeutung.

Es ist zu erkennen, daß die Internalisierung der Chylomikronen sowohl durch ApoE, als auch durch LpL um das drei- bis zehnfache gesteigert wird. Darüber hinaus sind die schon in der vorherigen Abbildung (Abb.4) beschriebenen Unterschiede zwischen LpL- und ApoE-Zugabe in der Stimulierbarkeit der Zelllinien durch Lipoproteindefizientes Medium zu sehen. Weiterhin wird deutlich, daß die LPDS-Stimulierbarkeit bei der spezifischen Aufnahme der Chylomikronen sowohl bei den Normalfibroblasten, als auch bei den FH-Fibroblasten bei Aufnahmevermittlung durch ApoE deutlich stärker ausgeprägt ist als bei LpL-vermittelter Aufnahme. Im Gegensatz zu den LDL-R-defizienten FH-Fibroblasten ist die Endozytose triglyceridreicher Lipoproteine bei gesunden Fibroblasten, unter Normalbedingungen und unter LPDS-Stimulation, bei ApoE-Zugabe stärker ausgeprägt als bei LpL-Zusatz. Die FH-Fibroblasten verhalten sich genau andersherum: sie nehmen bei Aufnahmevermittlung durch LpL gesteigert Chylomikronen auf.

Nach rezeptorvermittelter Endozytose werden die Lipoproteine im Intrazellularraum der Zellen weiter metabolisiert. Im folgenden sollen nun die intrazellulären Stoffwechsel- und Transportwege der Chylomikronen, in den sich durch ihre LDL-R und LRP Expression unterscheidenden Fibroblasten

vergleichend untersucht werden. Auch diese Experimente wurden mit Zugabe von entweder LpL oder ApoE zum Inkubationsmedium der ^{125}J -markierten Chylomikronen durchgeführt.

Das zunächst dargestellte Experiment zeigt die Verteilung der von den Fibroblasten nach 60 Minuten Inkubation und 90 Minuten Chasezeit metabolisierten Chylomikronen. Es erfolgte unter Zugabe von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ LpL. Mittels der im Abschnitt „Material und Methoden“ dargestellten Methodik konnte zwischen noch im Intrazellularraum zu detektierenden Chylomikronen, lysosomal degradierten Chylomikronen, und im Sinne des Recyclings metabolisierten Chylomikronen, differenziert werden.

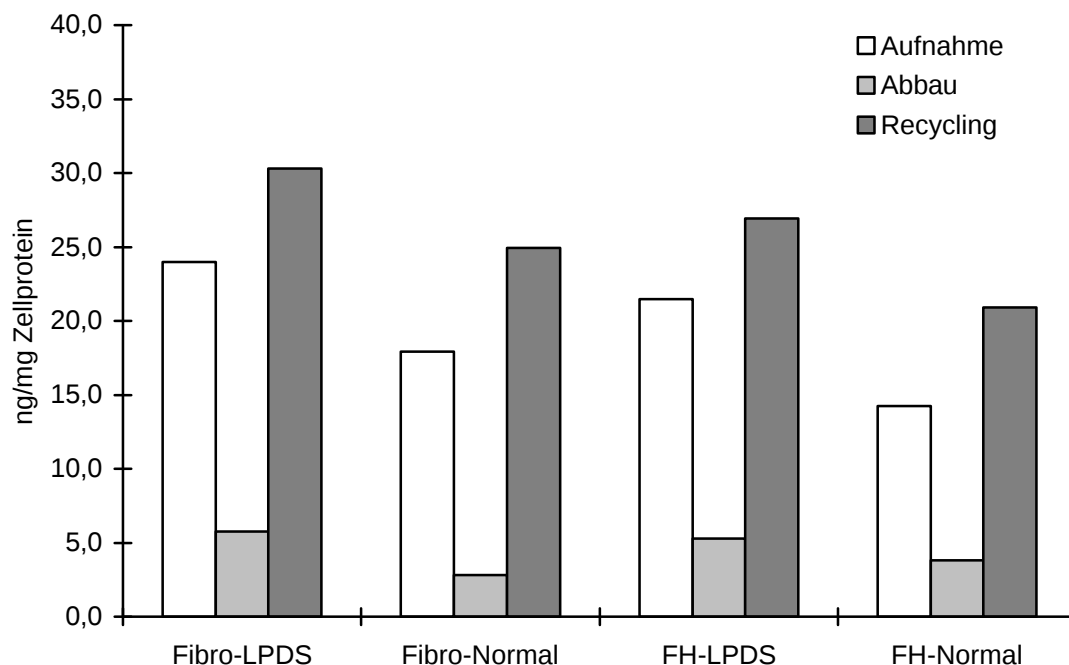


Abb. 6. Aufnahme, Abbau und Recycling von ^{125}J -markierten humanen Chylomikronen nach 90-minütiger Chasezeit unter Zugabe von LpL

Dargestellt sind die Mittelwerte der Duplikate eines repräsentativen Experiments aus sechs unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die ermittelten radioaktiven Aktivitäten wurden auf ng/mg Zellprotein berechnet. Die Experimente erfolgten unter Zugabe von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ LpL zur Bindungsvermittlung und Aufnahmesteigerung. Die lipolytische Aktivität der LpL wurde mit THL inhibiert. Während die weißen Balken die sich noch in der Zelle befindliche Radioaktivität beschreiben (Aufnahme), zeigen die grauen Balken die ins Chasemedium abgegebene Radioaktivität. Die hellgrauen Balken stellen dabei die den Abbau repräsentierenden nicht TCA-präzipitierbaren Anteile der gemessenen Strahlungsaktivität dar, die dunkelgrauen beschreiben den TCA-präzipitierbaren Recycling Anteil. Die Versuche wurden entsprechend der im Material und Methoden beschriebenen Angaben durchgeführt.

Beide Zelllinien zeigen nach Kultur auf LPDS-Medium unter Zugabe von LpL eine Stimulation von Aufnahme, Abbau und Recycling der ^{125}J -markierten Chylomikronen. Dieser Effekt tritt sowohl bei den LDL-R-defizienten FH-Fibroblasten, als auch bei den Normalfibroblasten auf. Bei LPDS-Stimulation nehmen die FH-Fibroblasten im Vergleich zu den Normalfibroblasten gesteigert Chylomikronen auf. Entsprechend verhalten sich Abbau und Recycling. Es ist zu sehen, daß nach 90 Minuten lediglich ein sehr kleiner Teil der aufgenommenen Chylomikronen lysosomal degradiert wurde, ein weitaus höherer Anteil war noch in der Zelle zu detektieren, und ein noch etwas größerer Teil wurde im Sinne des Recyclings in das Chasemedium resekretiert. Um mögliche zeitabhängige Unterschiede in der intrazellulären Metabolisierung der Chylomikronen zu ermitteln, wurde das in der vorherigen Abbildung beschriebene Experiment auch mit einer Chasezeit von 240 Minuten durchgeführt (Abb. 7.).

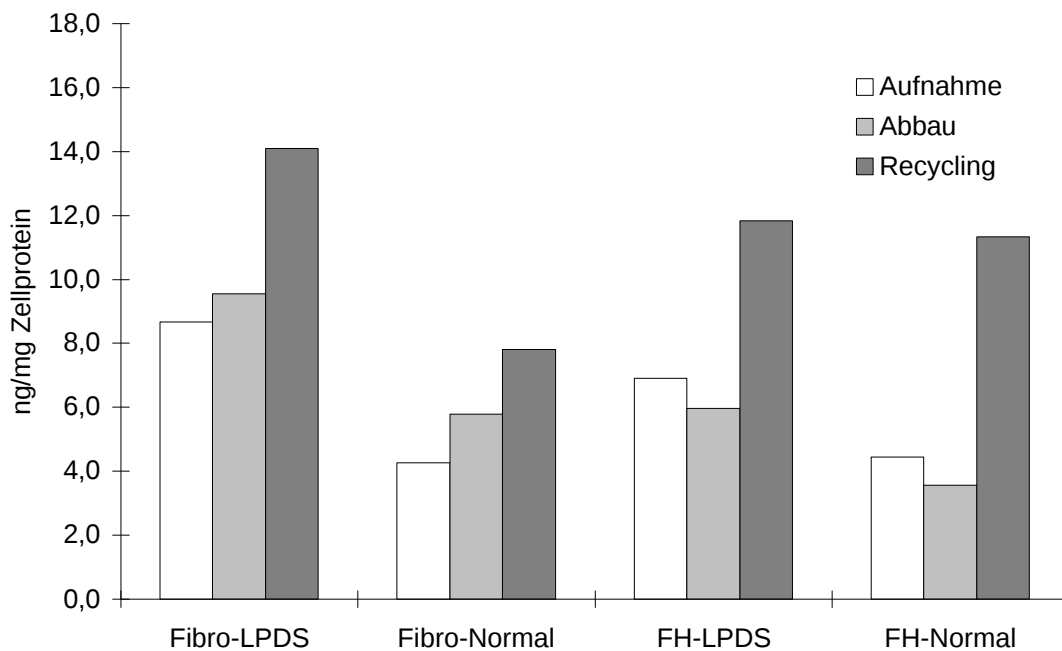


Abb. 7. Aufnahme, Abbau und Recycling von ^{125}J -markierten humanen Chylomikronen nach 240 Minuten Chasezeit unter Zugabe von LpL

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Duplikate eines repräsentativen Experiments aus fünf Versuchen. Die ermittelten radioaktiven Aktivitäten wurden auf ng/mg Zellprotein berechnet. Die Experimente erfolgten unter Zugabe von 0,2 µg/ml THL-inhibierter LpL. Während die weißen Balken die sich noch in der Zelle befindliche Radioaktivität beschreiben (Aufnahme), zeigen die grauen Balken die ins Chasemedium abgegebene Radioaktivität. Die hellgrauen Balken stellen dabei die lysosomal degradierten, nicht TCA-präzipitierbaren Anteile der gemessenen Strahlungsaktivität dar (Abbau), und die dunkelgrauen beschreiben den TCA-präzipitierbaren Recycling Anteil. Die Versuche wurden entsprechend der im Material und Methoden beschriebenen Angaben durchgeführt.

Die zwischen den verschiedenen intrazellulären Transportwegen differenzierende Abbildung 7 zeigt, daß nach 240 Minuten Chasezeit der Abbau und das Recycling der Chylomikronen im Verhältnis zu den noch in der Zelle befindlichen Chylomikronen bei beiden Zelllinien zunimmt. Nach 240 Minuten ist das Verhältnis von lysosomalen Abbau zum Recycling der Chylomikronen bei den LDL-R-defizienten FH-Fibroblasten deutlicher zugunsten des Recyclings verschoben als bei den Fibroblasten fettstoffwechselgesunder Spender. Diese scheinen einen etwas größeren Anteil der aufgenommenen Chylomikronen abzubauen, während die FH-Fibroblasten einen größeren Anteil resekretieren.

Zur weiteren Differenzierung des Einflusses der Lipoproteinrezeptoren LDL-R und LRP wurden die in Abbildung 6 und 7 beschriebenen Experimente auch unter der Zugabe von ApoE, anstatt von LpL, als zusätzlichem nicht-markierten Liganden durchgeführt.

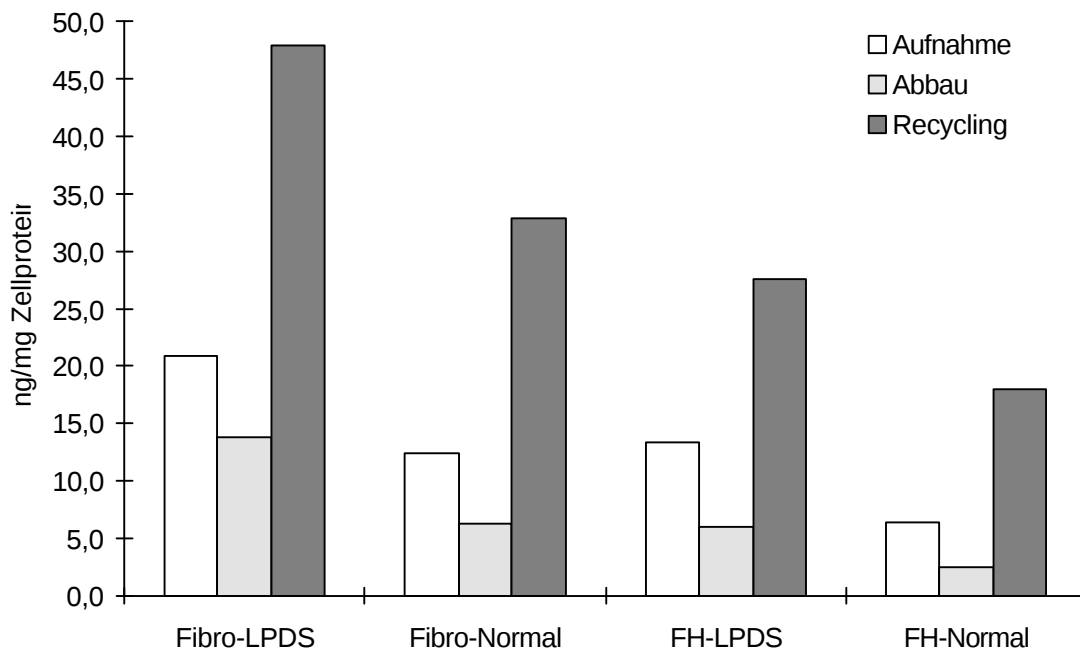


Abb. 8. Aufnahme, Abbau und Recycling von ^{125}J -markierten humanen Chylomikronen nach 90-minütiger Chasezeit unter Zugabe von ApoE

Dargestellt sind die Mittelwerte der Duplikate von einem repräsentativen Experiment aus drei Versuchen. Die ermittelten radioaktiven Aktivitäten wurden auf ng/mg Zellprotein berechnet. Die Experimente erfolgten unter Zugabe von 2,5 µg/ml ApoE zur Bindungsvermittlung und Steigerung der Aufnahme. Während die weißen Balken die sich noch in der Zelle befindliche Radioaktivität beschreiben (Aufnahme), zeigen die grauen Balken die ins Chasemedium abgegebene Radioaktivität. Die hellgrauen Balken stellen dabei die den Abbau repräsentierenden nicht TCA-präzipitierbaren Anteile der gemessenen Strahlungsaktivität dar, und die dunkelgrauen beschreiben den TCA-präzipitierbaren Recycling Anteil. Die Versuche wurden entsprechen der im Material und Methoden beschriebenen Angaben durchgeführt.

Die Zugabe von ApoE als Ligand hat, wie Abbildung 8 zeigt, einen deutlichen Einfluß bei der intrazellulären Metabolisierung der Chylomikronen: So sind bei gleicher Inkubations- und Chasezeit die Anteile der im Chasemedium detektierbaren Fraktionen des lysosomalen Abbaus und des Recyclings im Verhältnis zu den noch in der Zelle befindlichen radioaktiv markierten Chylomikronen deutlich höher als bei der Zugabe von LpL als zusätzlichem Ligand (Abb.6).

Zur Untersuchung von Veränderungen der intrazellulären Metabolisierung von Chylomikronen bei längerer Chasezeit, wurde der in Abbildung 8 dargestellte Versuch unter sonst gleichen Bedingungen mit einer Chasezeit von 240 Minuten durchgeführt (Abb.9) .

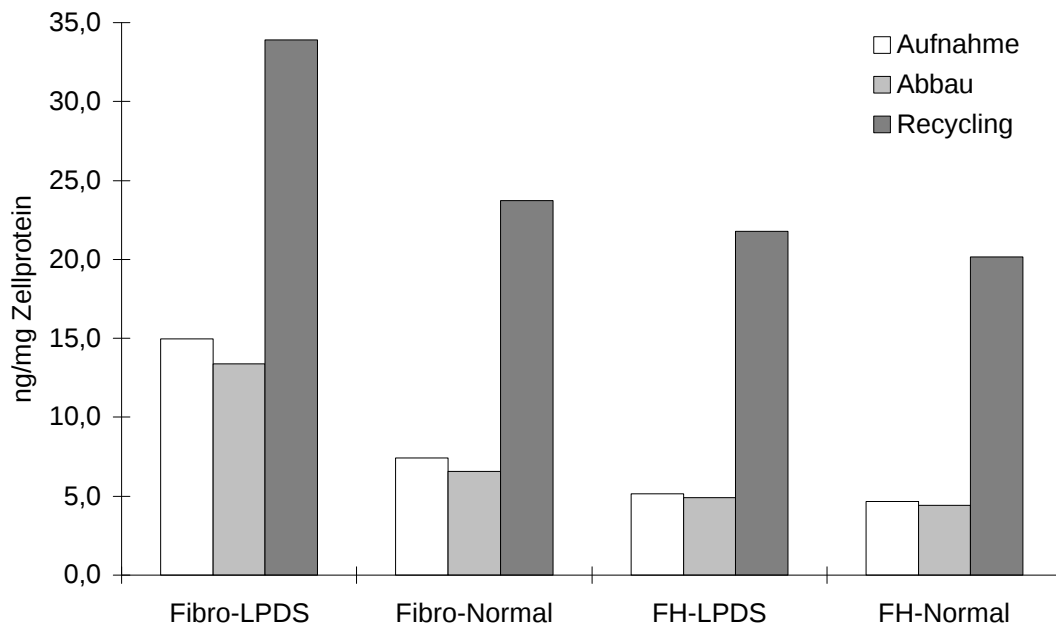


Abb. 9. Aufnahme, Abbau und Recycling von ^{125}J -markierten humanen Chylomikronen nach 240-minütiger Chasezeit unter Zugabe von ApoE

Dargestellt sind die Mittelwerte der Duplikate eines Experiments. Die ermittelten radioaktiven Aktivitäten wurden auf ng/mg Zellprotein berechnet. Das Experiment erfolgte unter Zugabe von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ApoE. Während die weißen Balken die sich noch in der Zelle befindliche Radioaktivität beschreiben, zeigen die grauen Balken die ins Chasemedium abgegebene Radioaktivität. Die hellgrauen Balken stellen dabei die den Abbau repräsentierenden nicht TCA-präzipitierbaren Anteile der gemessenen Strahlungsaktivität dar, und die dunkelgrauen beschreiben den TCA-präzipitierbaren Recycling Anteil. Die Versuche wurden entsprechend der im Material und Methoden beschriebenen Angaben durchgeführt.

Nach wie vor ist zu erkennen, daß die Zelllinien mit abnehmender LDL-R Expression auch weniger Chylomikronen aufnehmen. Entsprechend verhalten sich der lysosomale Abbau und das Recycling, die allerdings mit längerer Chasezeit im Verhältnis zu den aufgenommenen, und noch intrazellulär zu detektierenden Chylomikronen, weiter ansteigen. Auch nach 240 Minuten Chasezeit ist das Recycling der triglyceridreichen Lipoproteine unter den Bedingungen der Zugabe von ApoE (Abb.9.) deutlich ausgeprägter als bei LpL-Zugabe (Abb.6.).

Zur vergleichenden Analyse des schon in den vorherigen Abbildungen dargestellten Recyclinganteils, ist in der folgenden Abbildung (Abb.10.) der auf die Gesamtaufnahme der ^{125}J -markierten Chylomikronen bezogene, relative Anteil des Recyclings dargestellt.

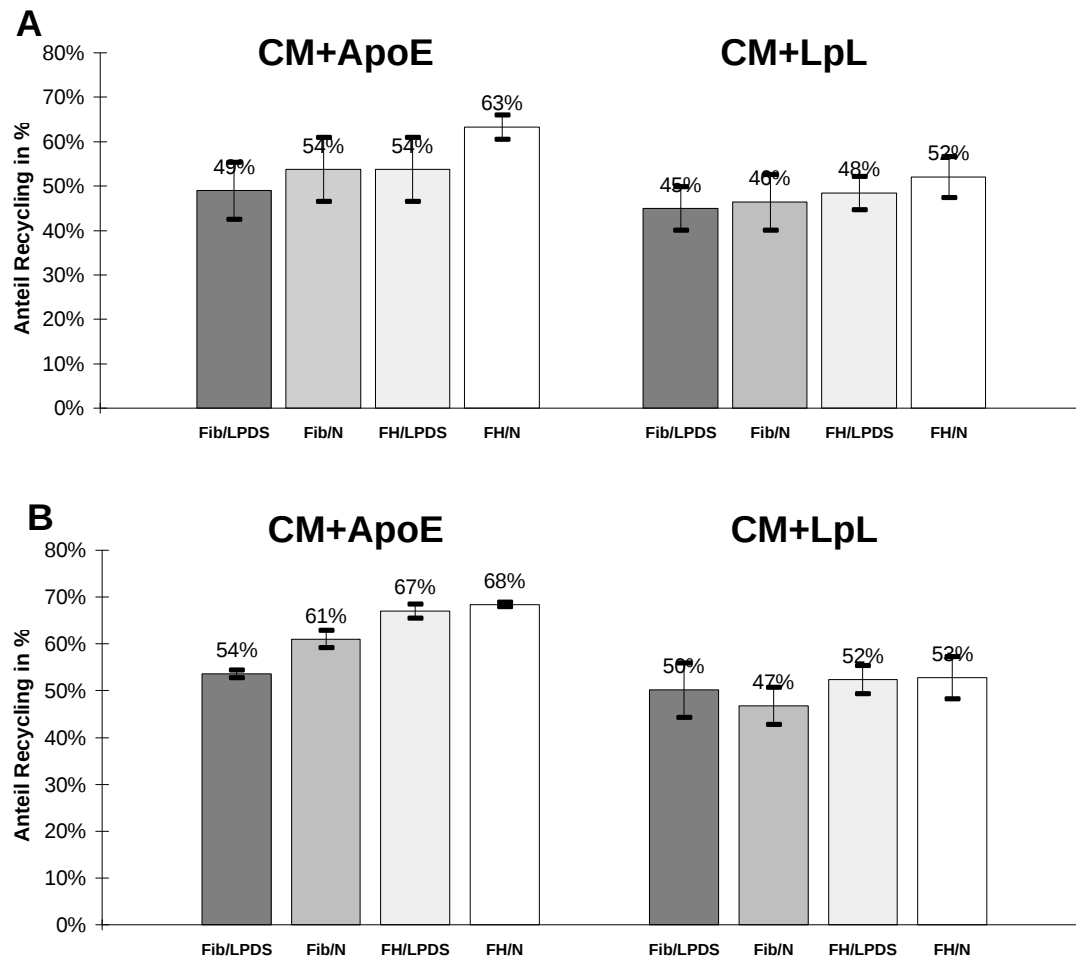


Abb. 10. Prozentualer Anteil des Recyclings an der Gesamtaufnahme ^{125}J -markierter Chylomikronen in Fibroblasten und FH-Fibroblasten.

Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus mehreren ([A]n=3 und n=6; [B]n=1 und n=5) unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Dargestellt ist der relative Anteil der im Chasemedium vorhandenen und TCA-präzipitierbaren Radioaktivität an der insgesamt gemessenen Strahlungsaktivität. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten, die Chasezeit 90 (A), bzw. 240 (B) Minuten. Die Versuche wurden mit Zusatz von entweder 2,5µg/ml ApoE, oder 0,2µg/ml THL-inhibierter LpL zum Inkubationsmedium durchgeführt.

Es ist zu erkennen, daß LpL-angereicherte Chylomikronen, bzw. deren Bestandteile, in etwas geringeren Maße Recyclingprozessen zugeführt werden als ApoE angereicherte Chylomikronen. Dies ist sowohl bei einer Chasezeit von 90 Minuten (Abb.10A), als auch bei einer Chasezeit von 240 Minuten (Abb.10B) zu beobachten. Zum zweiten zeigt die Abbildung 10, daß sich der

Recyclinganteil reziprok zur LDL-R Expression verhält: Das ausgeprägteste Recycling von Chylomikronen, bzw. deren Bestandteilen, ist in den die geringste LDL-R Expression aufweisenden, nicht stimulierten FH-Fibroblasten zu erkennen. Die den LDL-R überexprimierenden, LPDS-stimulierten Fibroblasten hingegen recyceln, im Vergleich zu den anderen dargestellten Zelllinien, den relativ geringsten Anteil der insgesamt internalisierten Chylomikronen. In diesen Zellen werden die Chylomikronen in höherem Maße sowohl lysosomal degradiert, als auch intrazellulär akkumuliert. Deutlich zu erkennen ist, daß bei den ApoE-angereicherten Chylomikronen die Tendenz der umgekehrten Abhängigkeit des Recyclings von der LDL-R Expression stärker ausgeprägt ist als bei LpL-angereicherten Chylomikronen.

Parallel zu den Pulse Chase Experimenten mit den Chylomikronen wurden die Versuche auch mit den bereits besser untersuchten LDL als Liganden durchgeführt. Sowohl die rezeptorvermittelte Endozytose, als auch die intrazellulären Transportwege der LDL können so mit denen der in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehenden Chylomikronen verglichen werden und erlauben Schlüsse auf den intrazellulären Metabolismus der Chylomikronen.

Wie schon bei der Aufnahme der LDL erkennbar (Abb.4), wird auch bei der Betrachtung der intrazellulären Verstoffwechselung von LDL (Abb.11) deutlich, wie ausgeprägt sowohl die noch in Zellen den befindlichen LDL, als auch die von ihnen bereits metabolisierten LDL mit der abnehmenden LDL-R Expression korrelieren. Die Stimulation durch LPDS-Medium war allerdings bei den Normalfibroblasten erheblich stärker ausgeprägt als bei den FH-Fibroblasten. Die Stimulierbarkeit der FH-Fibroblasten ist durch eine 5%ige Restaktivität des LDL-R in diesen Zellen (Labor Beisiegel) erklärbar.

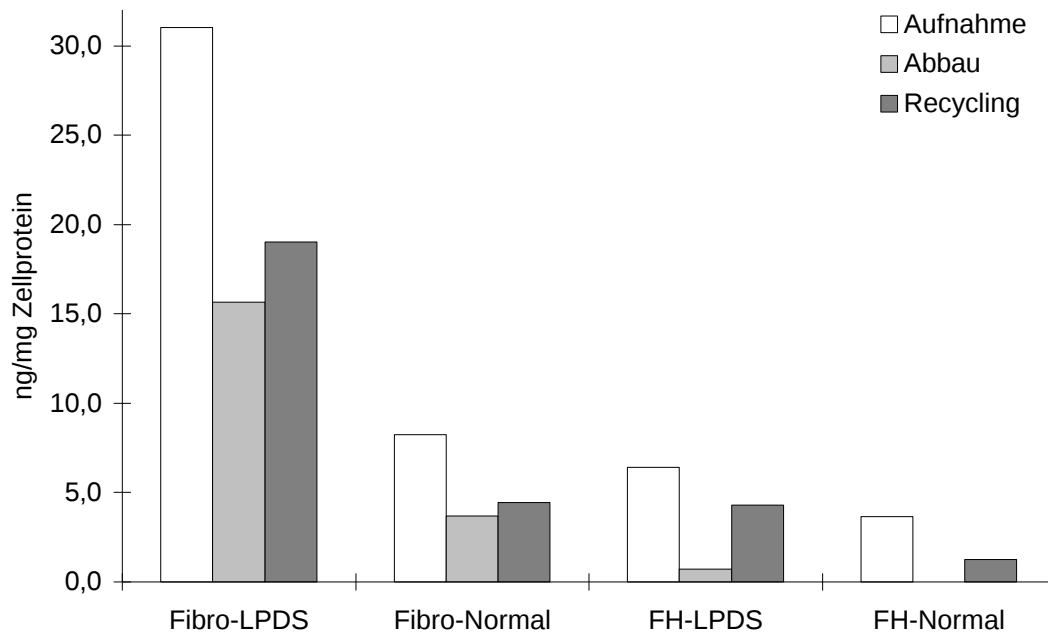


Abb.11. Aufnahme, Abbau und Recycling von ^{125}J -LDL in Fibroblasten und FH-Fibroblasten nach 60 Minuten Inkubation und 90 Minuten Chasezeit.

Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten der Duplikate eines repräsentativen Experiments aus sechs Versuchen. Die weißen Balken beschreiben die nach 90 Minuten Chasezeit noch in der Zelle befindlichen ^{125}J -markierten LDL. Die hellgrauen Balken zeigen den durch lysosomalen Abbau der LDL entstandenen, nicht TCA-präzipitierbaren Anteil der Radiaktivität im Chasemedium. Die dunkelgrauen Balken schließlich beschreiben den TCA-präzipitierbaren Anteil der im Chasemedium detektierbaren Radiaktivität, welcher daß Lipoprotein Recycling beschreibt. Die Versuche wurden entsprechend der im Abschnitt Material und Methoden dargestellten Standardbedingungen durchgeführt.

Darüber hinaus ist zu erkennen, daß die LDL über andere intrazelluläre Wege als die Chylomikronen verstoffwechselt werden: Nach 90 Minuten Chasezeit ist der größte Teil der ^{125}J -markierten LDL noch intrazellulär zu detektieren. In den LDL-R exprimierenden gesunden Fibroblasten ist nach 90 Minuten der lysosomale Abbau der LDL weitaus deutlicher ausgeprägt als bei den Chylomikronen (Abb.6 und Abb.8). Auch im Verhältnis zu den in Recycling-Prozessen resekretierten LDL ist der Anteil der abgebauten LDL höher als bei den Chylomikronen. Ein Vergleich zwischen den beiden untersuchten Zelllinien zeigt, daß die LDL-R defizienten FH-Fibroblasten deutlich weniger LDL im Sinne des lysosomalen Abbaus metabolisieren als die den LDL-R normal exprimierenden Fibroblasten (Abb.11). Dieser Unterschied ist auch nach 240 Minuten Chasezeit noch zu erkennen (Abb.12).

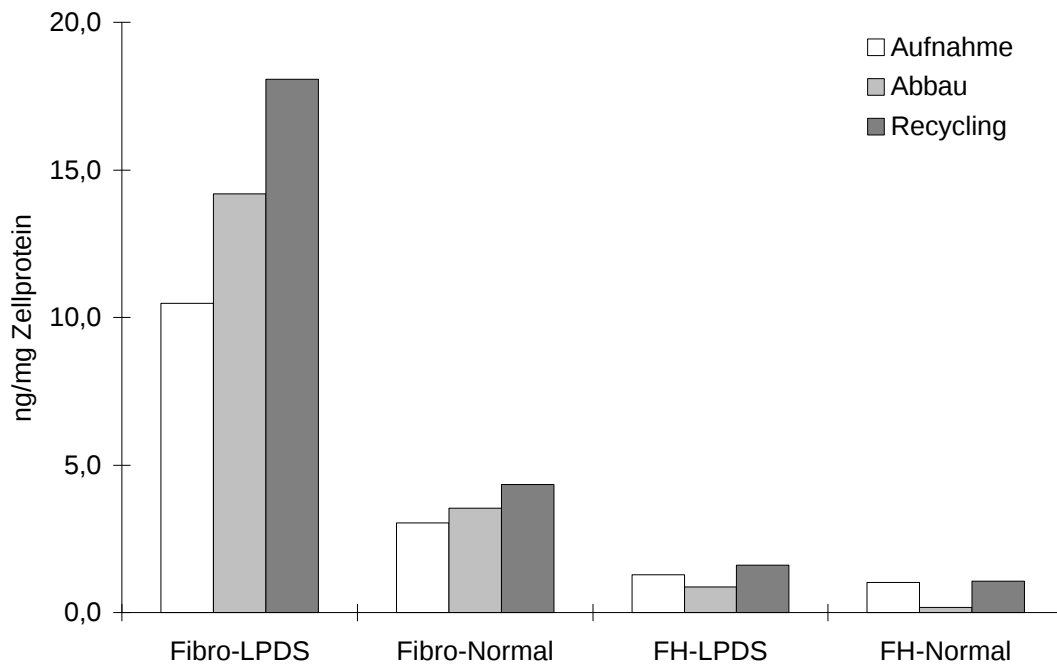


Abb.12. Aufnahme, Abbau und Recycling von ^{125}J -LDL in Fibroblasten und FH-Fibroblasten nach 60 Minuten Inkubation und 240 Minuten Chasezeit.

Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten eines repräsentativen Experiments aus mehreren ($n=5$) unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Versuche wurden entsprechend der im Abschnitt Material und Methoden dargestellten Standardbedingungen durchgeführt. Die weißen Balken beschreiben die nach 90 Minuten Chasezeit noch in der Zelle befindlichen ^{125}J -markierten LDL. Die hellgrauen Balken zeigen den durch lysosomalen Abbau der LDL entstandenen, nicht TCA-präzipitierbaren Anteil der Radioaktivität im Chasemedium. Die dunkelgrauen Balken schließlich beschreiben den TCA-präzipitierbaren Anteil der im Chasemedium detektierbaren Radioaktivität, welche daß Lipoprotein Recycling beschreibt.

Nach längerer Chasezeit verschiebt sich auch bei den LDL das Verhältnis zwischen noch im Intrazellularraum befindlichen und schon metabolisierten, d.h. lysosomal degradierten oder recycelten Lipoproteinen zugunsten der metabolisierten LDL (Abb.12). Wie oben schon erwähnt, bleiben die Unterschiede im Verhältnis von Abbau und Recycling zwischen den beiden Zelllinien, und zwar unabhängig von den Kulturbedingungen, weiter bestehen.

3.2.2. Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF)

Zu den im vorherigen Abschnitt dargestellten Untersuchungen der rezeptorvermittelten Endozytose und der intrazellulären Transportwege von Chylomikronen in Fibroblasten, werden in diesem Teil die Untersuchungen an sogenannten „Mouse Emryonic Fibroblasts“ durchgeführt. Es werden die Zelllinie MEF1, die sowohl LDL-R, als auch LRP exprimiert, und die mutante Zelllinie MEF4, bei der weder LDL-R-, noch LRP-Expression zu detektieren ist, verglichen.

Zunächst wurde die Endozytose der radioaktiv markierten Chylomikronen und LDL bei den die Lipoproteinrezeptoren LDL-R und LRP unterschiedlich exprimierenden Zelllinien der MEF untersucht.

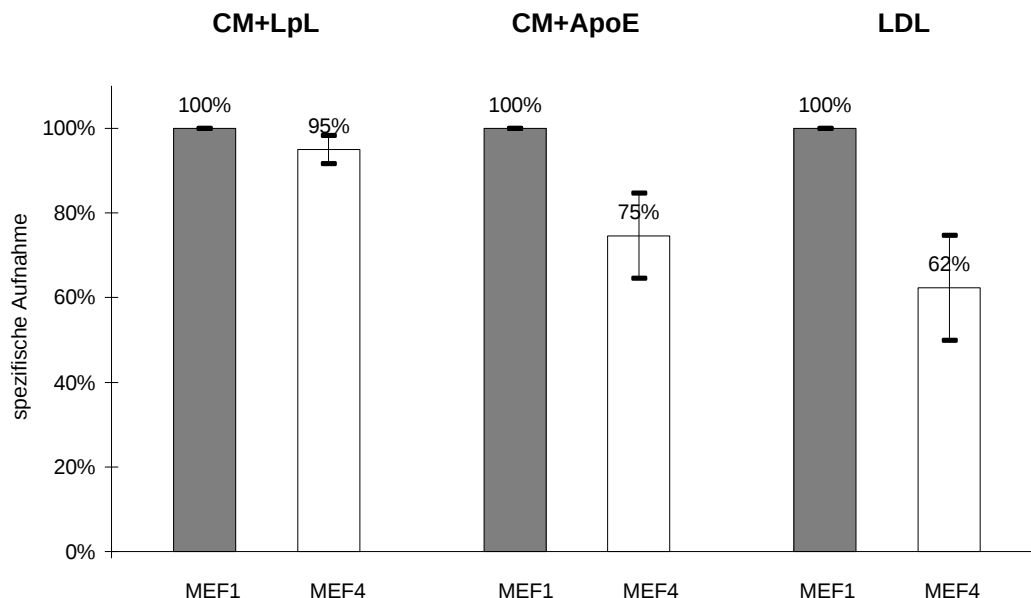


Abb. 13. Aufnahme ^{125}J -markierter Chylomikronen und Low Density Lipoproteins (LDL) in Mouse embryonic fibroblasts (MEF)

Dargestellt ist die spezifische Aufnahme der radioaktiv markierten Chylomikronen und LDL in die Zelllinien MEF1 und MEF 4 nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C. Die Versuche mit den Chylomikronen wurden mit Zugabe von 0,2 µg/ml ApoE, bzw. 2,5 µg/ml THL-inhibierter LpL zum Inkubationsmedium durchgeführt. Die Aufnahme der MEF1 wurde jeweils 100 % gesetzt und die Aufnahme in die MEF4 jeweils vergleichend dazu in Bezug gesetzt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Abbildung 13 veranschaulicht deutlich die Unterschiede in der Aufnahme der Lipoproteine. Unter Zugabe von LpL zum Inkubationsmedium konnte bei der Aufnahme der Chylomikronen nur ein Unterschied von 5% zwischen den Zelllinien MEF 1 und MEF4 erzielt werden. Mit Zusatz von ApoE konnte eine

deutlichere Differenz gezeigt werden, die rezeptordefizienten MEF4 endozytierten ungefähr ein Viertel weniger ^{125}J -markierte Chylomikronen als MEF1. Bei den LDL schließlich zeigten die MEF4 eine um ca. 40% verringerte Endozytose der Lipoproteine, verglichen mit den MEF1.

Wie schon im vorherigen Abschnitt bei den Fibroblasten geschehen, wurden auch bei den MEF die intrazellulären Stoffwechselwege der Chylomikronen und LDL genauer untersucht. Dies wurde auch hier mittels Pulse Chase Experimenten, bei denen die Inkubationszeit mit den ^{125}J -markierten Lipoproteinen 60 Minuten betrug und für die anschließende Chasezeit 90 Minuten gewählt wurden, gemacht. Die Versuche mit den Chylomikronen als Ligand wurden unter Zusatz von entweder LpL oder ApoE durchgeführt.

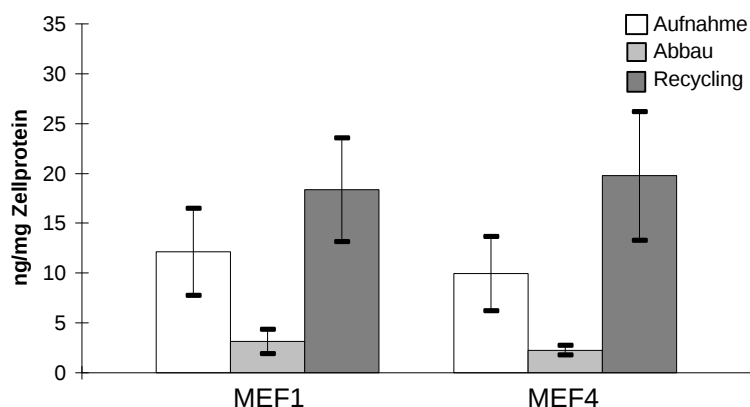


Abb. 14. Vergleich von Aufnahme, Abbau und Recycling ^{125}J -markierter Chylomikronen unter Zugabe von LpL in den Zelllinien MEF1 und MEF4.

Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es erfolgte ein Zusatz von $0,2\mu\text{g/ml}$ LpL zum Inkubationsmedium. Die Versuche wurden entsprechend der im Abschnitt Material und Methoden dargestellten Standardbedingungen durchgeführt. Die weißen Balken beschreiben die nach 90 Minuten Chasezeit noch in der Zelle befindlichen ^{125}J -markierten Chylomikronen. Die hellgrauen Balken zeigen den durch lysosomalen Abbau der Chylomikronen entstandenen nicht TCA-präzipitierbaren Anteil der Radiaktivität im Chasemedium. Die dunkelgrauen Balken schließlich beschreiben den TCA-präzipitierbaren Anteil der im Chasemedium detektierbaren Radiaktivität, welche daß Lipoprotein Recycling beschreibt.

Der zunächst durchgeführte Vergleich der intrazellulären Metabolisierung von Chylomikronen in den Zelllinien MEF1 und MEF4, denen zur Bindungs- und Aufnahmevermittlung LpL zugesetzt wurde, erbrachte nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien (Abb.14): Nach 90 Minuten Chasezeit waren in den LDL-R- und LRP-defizienten MEF4 lediglich ca. 15% weniger

Chylomikronen intrazellulär und im Chasemedium ca. 20% weniger durch lysosomale Degradation entstandene Abbauprodukte der Chylomikronen zu finden. Gegenüber den MEF4 war das Recycling der MEF1 sogar um ca. 5% reduziert. Die eben dargestellten Versuche wurden anschließend unter sonst gleichen Rahmenbedingungen mit Zugabe von ApoE, anstatt von LpL, durchgeführt und erbrachten weitaus deutlichere Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zelllinien (Abb.15).

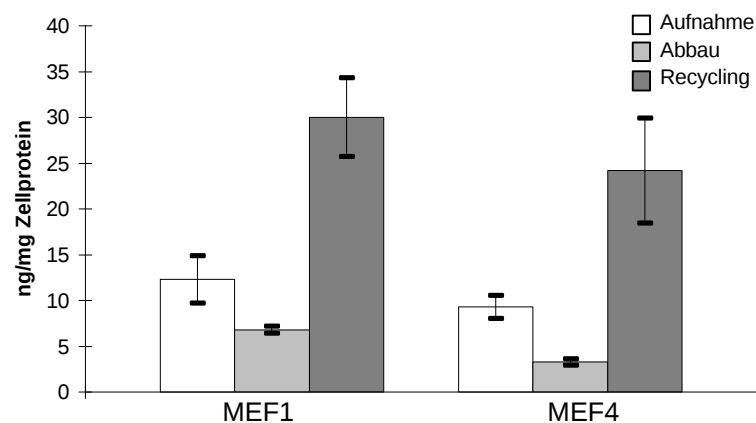


Abb. 15. Vergleich von Aufnahme, Abbau und Recycling ^{125}J -markierter Chylomikronen unter Zugabe von ApoE in den Zelllinien MEF1 und MEF4.

Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es erfolgte ein Zusatz von $2,5\mu\text{g/ml}$ ApoE zum Inkubationsmedium. Die Versuche wurden entsprechend der im Abschnitt Material und Methoden dargestellten Standardbedingungen durchgeführt. Die weißen Balken beschreiben die nach 90 Minuten Chasezeit noch in der Zelle befindlichen ^{125}J -markierten Chylomikronen. Die hellgrauen Balken zeigen den, durch lysosomalen Abbau der Chylomikronen entstandenen, nicht TCA-präzipitierbaren Anteil der Radiaktivität im Chasemedium. Die dunkelgrauen Balken schließlich beschreiben den TCA-präzipitierbaren Anteil, der im Chasemedium detektierbaren Radiaktivität, die daß Lipoprotein Recycling beschreibt.

Wie schon bei der Endozytose der radioaktiv markierten Chylomikronen zu erkennen (Abb.13), ist auch bei der genaueren Betrachtung der intrazellulären Transportwege zu sehen, daß die rezeptordefiziente Zelllinie MEF4 bei Zugabe von ApoE zum Inkubationsmedium eine weitaus deutlichere Hemmung der Internalisierung von Chylomikronen als beim Zusatz von LpL erfährt (Abb.14 und 15). Sowohl die nach 90 Minuten Chasezeit noch intrazellulär zu detektierenden Chylomikronen, als auch die im Chasemedium befindlichen Abbau- und Recyclingprodukte sind bei den MEF4, im Vergleich zu den MEF1, leicht vermindert (Abb.15).

Im Vergleich zu den Chylomikronen sind beim Einsatz von ^{125}J -markierten LDL als Ligand auch bei den MEF die schon bei den Fibroblasten (Abb.11) vorhandenen Unterschiede in der intrazellulären Metabolisierung zu erkennen (Abb.16):

Nach 60 Minuten Inkubation und 90 Minuten Chasezeit wurden im Verhältnis zum Recycling deutlich mehr Lipoproteine in lysosomalen Abbauprozessen degradiert als bei den Chylomikronen (Abb.14 und Abb.15). Desweiteren war der Anteil des Lipoprotein Recyclings bei den LDL im Verhältnis zu der nach 90 Minuten noch intrazellulär vorhandenen LDL deutlich geringer als bei den Chylomikronen (Abb.14 und Abb.15).

Vergleicht man die absolute Menge der von den MEF endozytierten Lipoproteine wird deutlich, daß LDL in weitaus geringerem Maße als Chylomikronen aufgenommen werden. Während die Chylomikronen von den MEF in Mengen von ca. 35-40 ng/mg Zellprotein aufgenommen werden, sind es bei den LDL lediglich ca. 4-8 ng/mg Zellprotein (Abb.13, Abb.14 u. Abb.15).

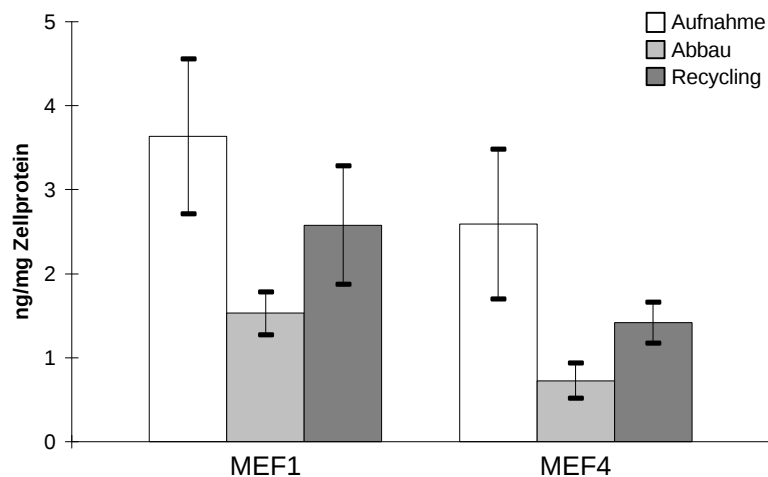


Abb. 16. Vergleich von Aufnahme, Abbau und Recycling ^{125}J -markierter LDL in den Zelllinien MEF1 und MEF4

Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Versuche wurden entsprechend der im Abschnitt Material und Methoden dargestellten Standardbedingungen durchgeführt. Die weißen Balken beschreiben die nach 90 Minuten Chasezeit noch in der Zelle befindlichen ^{125}J -markierten LDL. Die hellgrauen Balken zeigen den durch lysosomalen Abbau der LDL entstandenen nicht TCA-präzipitierbaren Anteil der Radiaktivität im Chasemedium. Die

dunkelgrauen Balken schließlich beschreiben den TCA-präzipitierbaren Anteil der im Chasemedium detektierbaren Radioaktivität, die daß Lipoprotein Recycling beschreibt.

Um Unterschiede in den Recyclingprozessen zwischen den beiden Zelllinien deutlich werden zu lassen, ist in der folgenden Abbildung der Anteil des Recyclings an der von den MEF internalisierten Gesamtmenge radioaktiv markierter Chylomikronen dargestellt.

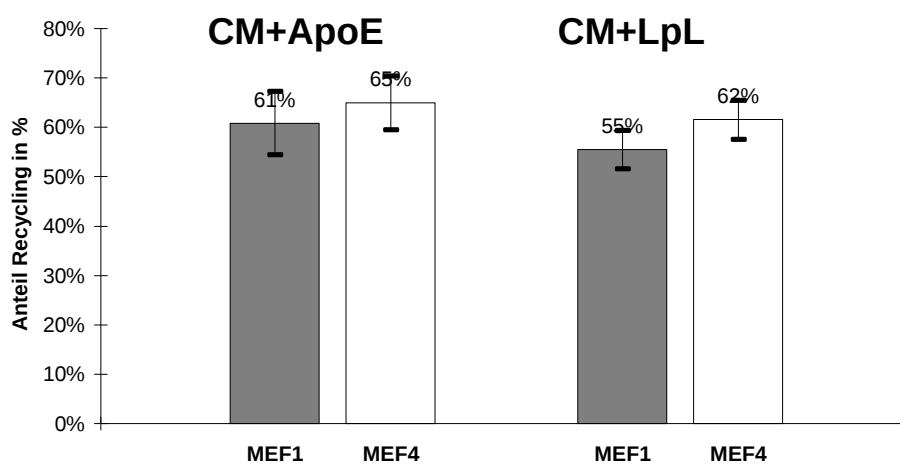


Abb. 17. Prozentualer Anteil des Recyclings an der Gesamtaufnahme ^{125}J -markierter Chylomikronen in MEF 1 und MEF4.

Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Dargestellt ist der relative Anteil der im Chasemedium vorhandenen und TCA-präzipitierbaren Radioaktivität an der insgesamt gemessenen Strahlungsaktivität. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten, die Chasezeit 90 Minuten. Die Versuche wurden mit Zusatz von entweder 2,5µg/ml ApoE, oder 0,2µg/ml THL-inhibierter LpL zum Inkubationsmedium durchgeführt.

Es ist zu erkennen, daß die LDL-R- und LRP-defizienten MEF4, gegenüber den MEF1, geringfügig mehr Chylomikronen, bzw. Chylomikronenbestandteile Recyclingprozessen zuführen, und damit wieder resekretieren (Abb.17). Darüber hinaus werden die ApoE-angereicherten Chylomikronen von beiden Zelllinien in einem etwas stärkeren Maße im Sinne des Recyclings metabolisiert als die LpL-angereicherten Chylomikronen.

4. Diskussion

Die Lipoproteinrezeptoren LDL-R und LRP stellen die bis heute am besten charakterisierten Rezeptoren im Lipoproteinstoffwechsel dar. LRP und LDL-R sind nicht nur für die Bindung und Aufnahme von Chylomikronen in die Zelle verantwortlich, sie sind auch an der weiteren intrazellulären Metabolisierung der Chylomikronen beteiligt. Im Unterschied zu den zumeist recycelten Rezeptoren LDL-R (Brown et al., 1983) und LRP (Dickson et al., 1981), werden die internalisierten Bestandteile der Chylomikronen intrazellulär sehr unterschiedlich metabolisiert: Das ApoB48 z.B. wird lysosomal abgebaut, die Apolipoproteine E und C z.B. werden vorrangig im Sinne von Recyclingprozessen von der Zelle resekretiert (Heeren et al., 1999).

In dieser Arbeit soll die Rolle der Lipoproteinrezeptoren LDL-R und LRP und der mit diesen Rezeptoren interagierenden Liganden ApoE und LpL, als Determinanten für die intrazelluläre Metabolisierung von Chylomikronen, untersucht werden. Im Mittelpunkt des Interesses stehen hier insbesondere Recyclingprozesse. Die Untersuchungen wurden mittels sogenannter Pulse-Chase-Experimente, an sich in ihrer LDL-R- und LRP-Expression unterscheidenden Fibroblasten, und mutanten embryonalen Mäusefibroblasten durchgeführt.

4.1. Experimentelles System

Als Grundlage des ersten Teils dieser Untersuchung dienten die auf verschiedenen Medien kultivierten gesunden Fibroblasten und LDL-R-defizienten FH-Fibroblasten. Die Fibroblasten wurden durch Kultur auf Lipoproteindefizientem Medium, gegenüber der Kultur auf Normalmedium in ihrer LDL-R Expression stimuliert. Der Nachweis erfolgte durch Western Blotting und anschließende Immundetektion. Bei den FH-Fibroblasten konnte dieser Effekt, aufgrund nur minimaler LDL-R Expression, nicht beobachtet werden. Die in den Experimenten verwendeten FH-Fibroblasten weisen aber eine fünfprozentige Restaktivität von intaktem LDL-R auf (Daten Labor

Beisiegel). Es standen also Fibroblasten, die den LDL-R in absteigender Konzentration exprimieren für die weiteren Experimente zur Verfügung. Zwischen den Fibroblasten und den FH- Fibroblasten konnten keine Unterschiede in der LRP Expression detektiert werden. Es war allerdings die Tendenz zu erkennen, daß diese durch die beiden verschiedenen Kulturbedingungen leicht beeinflußt werden konnte, und zwar reziprok zur LDL-R Expression: Die Kultur auf Lipoproteindefizienten Medium führte hier nicht zur Stimulation, sondern zur leichten Depression der LRP Rezeptorexpression. Es konnte somit ein in-vitro-System genutzt werden, in dem die Fibroblasten sich durch ihre quantitative LDL-R und in gewissem Grade auch LRP Expression unterscheiden.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Pulse Chase Experimente mit mutanten embryonalen Mäusefibroblastenzelllinien MEF1 und MEF4 durchgeführt. Mittels Immunblots des Zellproteins konnte nachgewiesen werden, daß die Zelllinie MEF1 sowohl LDL-R, als auch LRP exprimiert, während MEF4 keinen der beiden untersuchten Rezeptoren exprimiert.

Da in dieser Arbeit mit lebenden Zellen und biologischen Liganden gearbeitet wurde, muß darauf hingewiesen werden, daß Vergleichbarkeit und exakte Reproduzierbarkeit der Einzelexperimente nur bedingt möglich waren, was in den Schwankungen der Ergebnisse zwischen den einzelnen Experimenten zum Ausdruck kam. Gründe hierfür stellen dar, daß sowohl Fibroblasten, als auch MEF trotz Zellzählung nie in der exakt gleichen Dichte ausgesät werden konnten und daß mit steigender Passagenzahl in der Zellkultur mit Veränderungen der Zellen gerechnet werden mußte. Des weiteren haben die Variationen der Ergebnisse der Einzelexperimente ihre Ursache in den, obwohl immer vom gleichen humanen Spender gewonnenen, doch heterogen ausgefallenen Lipoproteinpräparationen. Auch die radioaktive Markierung der Lipoproteine variierte immer etwas. Schließlich stellen auch Alterung und Zerfall der Lipoproteine, die trotz Lagerung bei 4°C und Zusatz von Proteaseinhibitoren nicht zu verhindern waren, eine Mitursache für die schwankenden Versuchsergebnissen dar.

Die Pulse Chase Experimente wurden in der Regel mit Zusatz von ApoE oder boviner LpL als zweitem, nicht markierten Liganden zum Inkubationsmedium durchgeführt. Bei der LpL wurde mit 0,2µg/ml eine physiologischen Bedingungen entsprechende Konzentration gewählt. Durch LpL konnte eine Steigerung der Aufnahme von Chylomikronen um das vier- bis sechsfache erzielt werden (Abb. 3). Die durch LpL induzierte Steigerung der Bindung und Internalisierung von Chylomikronen erklärt sich durch zwei Mechanismen: Die mit der Lipase angereicherten Chylomikronen binden über die C-terminale Domäne der LpL direkt an das LRP und werden so in die Zelle aufgenommen (Beisiegel et al., 1994; Nykjaer et al., 1993; Nykjaer et al., 1994). Zum zweiten können indirekte Wechselwirkungen der LpL mit den HSPG der Zelloberfläche für die Vermittlung der Aufnahme verantwortlich gemacht werden (Eisenberg et al., 1992; Gliemann, 1998). Obwohl eine Bindung von LpL an den LDL-R beschrieben werden konnte (Salinelli et al., 1996; Medh et al., 1996), spielt die LpL vermutlich keine wesentliche Rolle bei der Internalisierung von Lipoproteinen über den LDL-R (Beisiegel und Heeren, 1997) .

Das in einer Konzentration von 2,5µg/ml zum Inkubationsmedium hinzugegebene, nicht markierte ApoE interagiert sowohl direkt mit dem LDL-R als auch direkt mit dem LRP (Beisiegel et al., 1989). Hierdurch erklärt sich die durch Zugabe von ApoE um das drei- bis achtfache gesteigerte Aufnahme der Chylomikronen in die Fibroblastenzelllinien (Abb. 3). Die unterschiedlichen Affinitäten der Bindung und Aufnahme vermittelnden Liganden LpL und ApoE zu den Lipoproteinrezeptoren LDL-R und LRP konnten ausgenutzt werden, um die Effekte bei der zellulären Internalisierung und der intrazellulären Metabolisierung der Chylomikronen der beiden Rezeptoren voneinander abzugrenzen.

Die von den Zellen resekretierten Anteile der ¹²⁵J-markierten Chylomikronen werden hauptsächlich durch Apolipoproteine gebildet (Heeren et al., 1999). Deshalb wurde dem Chasemedium HDL (5mg/dl) als hydrophober Akzeptor für resekretierte Apolipoproteine hinzugegeben.

Insgesamt ergibt sich die Schwierigkeit die in einem in-vitro-System erhobenen Daten auf in-vivo-Verhältnisse zu übertragen: Eine Annäherung an die Situation im menschlichen Organismus ist allerdings auf Seiten der Liganden durch die ausschließliche Verwendung von humanen Spendern gewonnenen Lipoproteinen, und bei den Zellen, durch die Verwendung von humanen Fibroblasten gegeben. Ob sich aber die durch die mutanten embryonalen Mäusefibroblasten (MEF) gewonnenen Ergebnisse auf in-vivo-Verhältnisse im adulten Menschen übertragen lassen, scheint trotz der evolutionär hochkonservierten Struktur der Lipoproteinrezeptoren sehr fraglich, zumal in dieser Arbeit zu sehen ist, daß sich die wenig differenzierten embryonalen Mäusefibroblasten schon in vitro deutlich von adulten humanen Fibroblasten unterscheiden. Vergleicht man die spezifische Aufnahme der ¹²⁵J-markierten Chylomikronen in die Zellen, wird deutlich, daß die MEF4 trotz erheblicher LRP und LDL-R Defizienz, im Vergleich zu MEF1, weitaus mehr Chylomikronen internalisieren als die lediglich LDL-R-defizienten FH-Fibroblasten im Vergleich zu Normalfibroblasten. Im Unterschied zu den adulten humanen Fibroblasten scheinen die MEF die Möglichkeit zu haben, Lipoproteine noch über andere Wege aufzunehmen. In Frage kommen hier entweder zusätzliche Rezeptoren oder Proteoglykan-vermittelte Mechanismen zur Aufnahme von Chylomikronen. Zu ähnlichen Schlußfolgerungen führten Beobachtungen, entsprechend derer die LpL bei den rezeptordefizienten MEF4 die Aufnahme von Chylomikronen um das 2,5fache zu steigern vermag (Heeren, 1995). Insgesamt scheinen die MEF-Zelllinien ein unzureichendes Modell zur Untersuchung von Prozessen der Rezeptor-vermittelten Endozytose im Menschen darzustellen.

4.2. Einfluß der Lipoproteinrezeptoren LDL-R und LRP auf die intrazelluläre Metabolisierung, insbesondere das Recycling von Chylomikronen

Um suffiziente Aussagen hinsichtlich der intrazellulären Metabolisierung der Chylomikronen möglich zu machen, wurde zunächst die spezifische Aufnahme der ^{125}J -markierten Chylomikronen in den, die beiden untersuchten Lipoproteinrezeptoren unterschiedlich exprimierenden Zelllinien vergleichend untersucht. Die Assoziation der Chylomikronen mit additiv hinzugegebener LpL oder ApoE macht eine suffiziente Internalisierung in die Zelle erst möglich (Abb.5). Es konnte gezeigt werden, daß die ApoE-vermittelte Internalisierung der Chylomikronen entsprechend der abnehmenden LDL-R-Expression ebenfalls abnimmt (Abb.4A; Abb.5). Dies läßt den Schluß zu, daß die ApoE-vermittelte Internalisierung der Chylomikronen zu einem beträchtlichen Teil von LDL-R der Zelloberfläche vermittelt wird. Durch den Vergleich mit der Aufnahme ^{125}J -markierter LDL (Abb.4C) wird allerdings deutlich das nicht nur der LDL-R für die ApoE-vermittelte Internalisierung der CM in die Zellen verantwortlich sein kann. Eine wesentliche Rolle spielt hier, das mit dem ApoE der Chylomikronen, nicht aber mit dem ApoB100 der LDL interagierende LRP. Der Einfluß dieses Rezeptors wird in der LpL-vermittelten Aufnahme der Chylomikronen deutlich: Obwohl die LpL auch an den LDL-R bindet (Salinelli et al.,1996; Medh et al., 1996) ,stellt sie doch vorrangig einen Liganden für das LRP dar (Beisiegel et al., 1991). Die LpL hat keinen steigernden Effekt bei der zellulären Aufnahme von Lipoproteinen via LDL-R (Beisiegel und Heeren, 1997). In diesem Sinne sind auch klare Unterschiede zu erkennen: Neben weitaus geringeren Unterschieden zwischen Fibroblasten und FH-Fibroblasten (Abb. 4A+B; Abb. 5), sind bei der LpL-vermittelten Aufnahme die Unterschiede in der Stimulierbarkeit bei beiden Zelllinien, auf Grund der nicht vorhandenen Effekte der LpL bei der LDL-R-vermittelten Aufnahme, geringer ausgeprägt als bei ApoE-Vermittlung (Abb. 5). Inwieweit die dennoch erkennbare Stimulation in der Aufnahme durch das LPDS-Medium LRP-bedingt ist, scheint fraglich, da die Immundetektion des LRP keine Steigerung, sondern eine geringe

Verminderung der Expression unter Kultur auf cholesterolreduzierten Medium zeigte.

Da die Steigerung der Aufnahme der Chylomikronen in die Fibroblasten nicht allein durch LRP und LDL-R erklärt werden konnte, ist anzunehmen, daß noch andere Rezeptoren beteiligt sind. Neben den beiden untersuchten Rezeptoren kommen aus der LDL-R-Genfamilie noch GP330 und VLDL-R in Frage ApoE-, bzw. LpL-angereicherte Chylomikronen aufzunehmen. Das GP330 konnte aber weder auf den in den Versuchen verwendeten Fibroblasten und FH-Fibroblasten, noch auf den MEF detektiert werden (Labor Beisiegel). Die Expression des VLDL-R auf den in den Pulse Chase Experimenten verwendeten Zellen wurde nicht untersucht, ist aber auch nicht zu erwarten, da dieser Rezeptor hauptsächlich in sehr stoffwechselaktiven Geweben, wie Muskel- und Fettgewebe, exprimiert wird (Gafvels et al., 1993).

Die für die Endozytose der Chylomikronen verantwortlichen Rezeptoren und Liganden spielen auch für die weitere intrazelluläre Metabolisierung eine entscheidende Rolle, da die strukturellen Eigenschaften des endozytierten Rezeptor-Ligand-Komplexes dessen Weg durch die verschiedenen endosomalen Kompartimente der Zelle maßgeblich beeinflussen.

Dies wird u.a. in den zwischen LpL- und ApoE -angereicherten Chylomikronen bestehenden Unterschieden der intrazellulären Verstoffwechselung deutlich (Abb. 6, 7, 8, 9, 10): LpL-angereicherte Chylomikronen wurden von humanen Fibroblasten zu 45 - 52% recycled. Bei ApoE-Anreicherung war dieser Anteil höher, 49 - 68% wurden recycled (Abb. 10). Entsprechend werden die LpL-angereicherten Chylomikronen von der Zelle stärker lysosomal degradiert. Diese Unterschiede waren auch in den Pulse Chase Experimenten mit den MEF zu erkennen (Abb. 17). Erklärbar wird dies vermutlich dadurch, daß ApoE durch seine Interaktion mit sowohl LDL-R, als auch LRP eine vielfältigere Vernetzung der Chylomikronen mit den Rezeptoren ermöglicht, als die nicht mit dem LDL-R interagierende LpL. Die Rezeptor-Ligand-Komplexe der ApoE-angereicherten Chylomikronen zeichnen sich durch die Vernüpfung vieler ApoE's, mit sowohl LDL-R, als auch LRP aus, so daß ein großer, multivalente Bindungen aufweisender Rezeptor-Ligand-Komplex entsteht, der gegenüber der Ansäuerung im CURL relativ resistent ist. So bleibt die Dissoziation des

Liganden, in diesem Falle der Apolipoproteine E und C, vom Rezeptor aus, und beide werden über Recyclingwege von der Zelle wieder resekretiert. Die LpL-angereicherten Chylomikronen scheinen durch fehlende oder zumindest unzureichende Bindung an den LDL-R insgesamt weniger vielfältige Bindungen an die Rezeptoren zu haben, komplexieren in geringerem Maße mit ihnen, und werden deshalb letztlich auch in geringerem Maße recycled. Passend zu dieser Hypothese einer Ligand-induzierten Komplexierung sind auch Beobachtungen, daß ApoE den intrazellulären Weg der LpL in Richtung Recycling zu dirigieren vermag (Heeren, 1998). Der im Vergleich zu den Chylomikronen deutlich vermehrte Abbau der LDL (Abb. 11, 12, 16), ist schließlich darauf zurückzuführen, daß das ApoB100 der LDL nur eine Bindungsstelle zum LDL-R aufweist (Kostner und März, 1995), und damit im CURL auch relativ leicht vom Rezeptor getrennt werden kann.

Neben den beschriebenen Unterschieden, in der intrazellulären Metabolisierung zwischen LpL-, und ApoE-angereicherten Chylomikronen konnten aber auch noch Differenzen zwischen den sich in ihrer LDL-R und auch LRP Expression unterscheidenden Zelllinien der Fibroblasten und MEF beobachtet werden:

Es konnte gezeigt werden, daß mit abnehmender LDL-R Expression der Anteil der über Recyclingwege metabolisierten Chylomikronen zunimmt. Dieser Effekt war bei ApoE-angereicherten Chylomikronen weitaus deutlicher zu erkennen als bei LpL-angereicherten Chylomikronen (Abb. 6, 7, 8, 9, 10): Die den LDL-R überexprimierenden Fibroblasten recycleten 49, bzw. 54% der internalisierten ApoE-angereicherten Chylomikronen, während bei den LDL-R nur minimal exprimierenden, nicht-stimulierten FH-Fibroblasten dieser Anteil bei 63, bzw. 68% lag (Abb.10). Unterstützt werden die erhobenen Daten durch Beobachtungen von Jensen et al.: In Experimenten mit LDL-R-überexprimierenden Affennierenzellen konnte sogar eine vollständige Degradation des endozytierten ApoE beobachtet werden (Jensen et al., 1994). Da die Unterschiede zwischen den ApoE- und LpL-angereicherten Chylomikronen nur bei 4-16% lagen, ist zu vermuten, daß der LDL-R zwar eine Rolle für das Recycling triglyceridreicher Lipoproteine spielt, diese aber weitaus geringer ist als die anderer, noch zu ergründender Determinanten.

Eine wesentliche Rolle könnte hier das im Vergleich zum LDL-R erheblich größere, und auch weitaus mehr ligandenbindende Complement Type Repeats enthaltene LRP spielen (Abb. 1). Durch diese strukturellen Eigenschaften wäre das LRP zu einer weitaus stärkeren Komplexierung der internalisierten Liganden in der Lage als der LDL-R, könnte damit die säureinduzierte Dissoziation von Rezeptor und Ligand im CURL erschweren, und schließlich zum verstärkten Recycling der internalisierten Chylomikronen beitragen. In diesem Sinne ließe sich auch die Abnahme des Recyclings bei LDL-R Überexpression, als ein kompetetiver Effekt zwischen LDL-R und LRP erklären. Die Rolle des LRP beim Recycling von Chylomikronen konnte in dieser Arbeit leider nicht ausreichend geklärt werden, da es nicht möglich war, die Expression des LRP bei den Fibroblasten genügend zu modulieren. In den Versuchen mit den MEF-Zelllinien, bei denen ein u.a. LRP Knock Out vorhanden war, war es nicht möglich die oben beschriebene Hypothese, hinsichtlich der Rolle des LRP beim Recycling der Chylomikronen, zu bestätigen. Insgesamt erwiesen sich die MEF aber als eher unzureichendes Modell für die Untersuchung der Rezeptor-vermittelten Endozytose, so daß die mit diesen Zellen gewonnen Daten über den intrazellulären Transport endozytierter Lipoproteine nur sehr bedingt auf die Verhältnisse in adulten humanen Zellen übertragen werden können.

Neben dem LRP müssen aber auch HSPG der Zelloberfläche als mögliche Faktoren für die intrazelluläre Metabolisierung in Betracht gezogen werden. Den bei der Aufnahme von Chylomikronen mit dem LRP interagierenden HSPG konnte vor kurzem eine Rolle bei der intrazellulären Verstoffwechselung von mit verschiedenen Isoformen des ApoE angereicherten β -VLDL zugeschrieben werden. Es konnte unter anderem in Fibroblasten gezeigt werden, daß ApoE3 und ApoE4, abhängig von der HSPG Expression der Zellen unterschiedlich akkumuliert, bzw. resekretiert werden (Ji et al., 1998).

5. Zusammenfassung

Lipoproteine werden, wie viele andere Makromoleküle, durch rezeptorvermittelte Endozytose in den Intrazellularraum der Zelle aufgenommen. Die endozytierten Rezeptor-Ligand-Systeme werden intrazellulär in verschiedenen endosomalen Kompartimenten transportiert und metabolisiert. Anders als bei den Rezeptoren, die wie LDL-R und LRP zumeist via Rezeptorrecycling zur Zelloberfläche zurückkehren, werden die Liganden, abhängig von den strukturellen Eigenschaften des Rezeptor-Ligand-Systems, intrazellulär sehr unterschiedlich metabolisiert. Einige Liganden, wie z.B. LDL, werden vorrangig lysosomal degradiert, andere, wie z.B. HDL, aber auch ca. 20% der LDL intakt retroendozytiert und wieder andere, wie z.B. die Apolipoproteine ApoE und ApoC der Chylomikronen schließlich von der Zelle „recycled“.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels Pulse Chase Experimenten an Fibroblasten und Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF) zu klären, inwieweit die intrazelluläre Verstoffwechselung der Chylomikronen, bzw. deren Bestandteilen von den Lipoproteinrezeptoren LRP und LDL-R, abhängig ist. Insbesondere das Recycling von Chylomikronen Bestandteilen sollte untersucht werden.

Zunächst konnte gezeigt werden, daß die Assoziation der Chylomikronen mit ApoE oder LpL deren suffiziente Aufnahme in die Zelle erst möglich macht. Hierbei scheint ApoE durch seine Interaktion mit LDL-R und LRP die Internalisierung der Partikel zu bewirken. Die LpL-angereicherten Chylomikronen werden nicht LDL-R-vermittelt in die Zelle aufgenommen.

Es zeigte sich, daß mit LpL angereicherte Chylomikronen in geringerem Maße von der Zelle recycled werden als ApoE-angereicherte Chylomikronen. Darüber hinaus konnte in den Pulse Chase Experimenten festgestellt werden, daß mit abnehmender LDL-R Expression der Anteil der über Recyclingwege metabolisierten Chylomikronen zunimmt.

Dieser Effekt war bei ApoE-angereicherten Chylomikronen weitaus deutlicher zu erkennen als bei LpL-angereicherten Chylomikronen.

Direkte Rückschlüsse auf die Einflüsse des LRP beim Recycling der Chylomikronen waren nicht möglich, da die LRP Expression der Fibroblasten nicht ausreichend moduliert werden konnte.

Die MEF unterschieden sich in den Pulse Chase Experimenten so deutlich von den adulten humanen Fibroblasten, daß sie als ein ungeeignetes Modell für die Untersuchung von Rezeptor-vermittelter Endozytose und Recycling von Chylomikronen in adulten Zellen erschienen.

Es konnten somit Einflüsse des LDL-R beim Recycling der Chylomikronen bestätigt werden, während die Rolle des LRP in dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte.

6. Literaturverzeichnis

- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271, 518-520.
- Aggerbeck LP, Wetterau JR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA (1988) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the amino-terminal (receptor-binding) domain of human apolipoprotein E3 from serum very low density lipoproteins. *J.Mol.Biol.* 202, 179-181.
- Alam R, Yatsu FM, Tsui L, Alam S (1989) Receptor-mediated uptake and 'retroendocytosis' of high-density lipoproteins by cholesterol-loaded human monocyte-derived macrophages: possible role in enhancing reverse cholesterol transport. *Biochim.Biophys.Acta* 1004, 292-299.
- Anderson RG, Brown MS, Goldstein JL (1977) Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor- bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10, 351-364.
- Argraves KM, Battey FD, MacCalman CD, McCrae KR, Gafvels M, Kozarsky KF, Chappell DA, Strauss JF, Strickland DK (1995) The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type I complexes. *J.Biol.Chem.* 270, 26550-26557.
- Beisiegel U, Schneider WJ, Brown MS, Goldstein JL (1982) Immunoblot analysis of low density lipoprotein receptors in fibroblasts from subjects with familial hypercholesterolemia. *J.Biol.Chem.* 257, 13150-13156.
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E- binding protein. *Nature* 341, 162-164.
- Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88, 8342-8346.
- Beisiegel U (1992) Apolipoproteins as Ligands for Lipoprotein Receptors. In: *Structure and Funktion of Apolipoproteins*. Edited by Rosseneu, M., Boca Raton, USA, CRC Press, 269-294.
- Beisiegel U, Krapp A, Weber W, Olivecrona G (1994) The role of alpha 2M receptor/LRP in chylomicron remnant metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 10;737:53-69
- Beisiegel U (1995) Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. *Curr.Opin.Lipidol.* 6, 117-122.
- Beisiegel U, Weber W, Heeren J, Hilpert J (1995) Intracellular Consequences of Chylomicron Uptake. *Circulation* 92, 691.
- Beisiegel U and Heeren J (1997) Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *Proc.Nutr.Soc.* 56, 731-737.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54
- Bradley WA and Gianturco SH (1986) ApoE is necessary and sufficient for the binding of large triglyceride-rich lipoproteins to the LDL receptor; apoB is unnecessary. *J.Lipid Res.* 27, 40-48.
- Brodsky FM (1988) Living with clathrin: its role in intracellular membrane traffic. *Science* 242, 1396-1402.
- Brown MS, Anderson RG, Goldstein JL (1983) Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* 32, 663-667.
- Brown MS and Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
- Brown MS and Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.

- Bu G, Williams S, Strickland DK, Schwartz AL (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2- macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 7427-7431.
- Chappell DA, Fry GL, Waknitz MA, Iverius PH, Williams SE, Strickland DK (1992) The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2- macroglobulin receptor binds and mediates catabolism of bovine milk lipoprotein lipase. *J.Biol.Chem.* 267, 25764-25767.
- Chappell DA, Inoue I, Fry GL, Pladet MW, Bowen SL, Iverius PH, Lalouel JM, Strickland DK (1994) Cellular catabolism of normal very low density lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2- macroglobulin receptor is induced by the C-terminal domain of lipoprotein lipase. *J.Biol.Chem.* 269, 18001-18006.
- Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J.Biol.Chem.* 265, 31116-31123..
- Chen CM, al-Haideri M, Presley JF, Maxfield FR (1995) Apoprotein E on Model Triglyceride-rich Particles, in Comparison to Apoprotein B on LDL, Remains relatively Intact after Cell Uptake. *Circulation* 92, 691.
- Choi SY and Cooper AD (1993) A comparison of the roles of the low density lipoprotein (LDL) receptor and the LDL receptor-related protein/alpha 2- macroglobulin receptor in chylomicron remnant removal in the mouse in vivo. *J.Biol.Chem.* 268, 15804-15811.
- Cummings RD, Kornfeld S, Schneider WJ, Hobgood KK, Tolleshaug H, Brown MS, Goldstein JL (1983) Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J.Biol.Chem.* 258, 15261-15273.
- Davis CG, Goldstein JL, Suedhof TC, Anderson RG, Russell DW, Brown MS (1987) Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 326, 760-765.
- Davis RC, Wong H, Nikazy J, Wang K., Han Q, Schotz MC (1992). Chimeras of hepatic lipase and lipoprotein lipase. Domain localization of enzyme-specific properties. *J.Biol.Chem.* 267, 21499-21504.
- De Duve C and Wattiaux R (1966) Functions of lysosomes. *Annu.Rev.Physiol.* 28, 435-492.
- Deckelbaum RJ, Ramakrishnan R, Eisenberg S, Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G (1992) Triacylglycerol and phospholipid hydrolysis in human plasma lipoproteins: role of lipoprotein and hepatic lipase. *Biochemistry* 31, 8544-8551.
- Dichek HL, Brecht W, Fan J, Ji ZS, McCormick SP, Akeefe H, Conzo L, Sanan DA, Weisgraber KH, Young SG, Taylor JM, Mahley RW (1998) Overexpression of hepatic lipase in transgenic mice decreases apolipoprotein B-containing and high density lipoproteins. Evidence that hepatic lipase acts as a ligand for lipoprotein uptake. *J Biol Chem* ;273(4):1896-903
- Dickson RB, Willingham MC, Pastan I (1981) alpha 2-macroglobulin adsorbed to colloidal gold: a new probe in the study of receptor-mediated endocytosis. *J.Cell* 89, 29-34.
- Dunn KW and Maxfield FR (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J.Cell Biol.* 117, 301-310.
- Egerlund T, Olivecrona T (1972) The purification of a lipoprotein lipase from bovine skim milk *J.Biol.Chem.* 247: 6212-6217
- Eisenberg S, Sehayek E, Olivecrona T, Vlodavsky I (1992) Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J.Clin.Invest.* 90, 2013-2021.
- Elshourbagy N, Liao, WS, Mahley RW, Taylor JM (1985) Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82, 203-207.
- Fraser R, Dobbs BR, Rogers GW (1995) Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. *Hepatology* 21, 863-874.

- Fuki IV, Kuhn KM, Lomazov IR, Rothman VL, Tuszynski GP, Iozzo RV, Swenson TL, Fisher EA, Williams KJ (1997) The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro. *J Clin Invest* 15;100(6):1611-22
- Gafvels ME, Caird M, Britt D, Jackson CL, Patterson D, Strauss JF (1993) Cloning of a cDNA encoding a putative human very low density lipoprotein/apolipoprotein E receptor and assignment of the gene to chromosome 9pter-p23. *Somatic Cell And Molecular Genetics* 19, 557-569.
- Geuze HJ, Slot JW, Strous GJ, Lodish HF, Schwartz AL (1983) Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell* 32, 277-287.
- Ghosh RN, Gelman DL, Maxfield FR (1994) Quantification of low density lipoprotein and transferrin endocytic sorting HEP2 cells using confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 107, 2177-89.
- Ginsberg HN (1995) Synthesis and secretion of apolipoprotein B from cultured liver cells. *Curr Opin Lipidol.* 6, 275-280.
- Gliemann J, Moestrup S, Henning Jensen P, Sottrup-Jensen L, Busk Andersen H, Munck Petersen C, Sonne O (1986) Evidence for binding of human pregnancy zone protein-proteinase complex to alpha 2-macroglobulin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1986 Oct 1;883(3):400-6
- Gliemann J (1998) Receptors of the low density lipoprotein (LDL) receptor family in man. Multiple functions of the large family members via interaction with complex ligands. *Biol Chem* 379(8-9):951-64
- Godyna S, Liao G, Popa I, Stefansson S, Argraves WS (1995) Identification of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) as an endocytic receptor for thrombospondin-1. *J. Cell* 129, 1403-1410.
- Goldstein JL, Basu SK, Brown MS (1983) Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Method. Enzymol.* 98, 241-260.
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell* 1, 1-39.
- Gotto AMJ, Pownall HJ, Havel RJ (1986) Introduction to the plasma lipoproteins. *Method. Enzymol.* 128, 3-41.
- Greenspan P and St Clair RW (1984) Retroendocytosis of low density lipoprotein. Effect of lysosomal inhibitors on the release of undegraded 125I-low density lipoprotein of altered composition from skin fibroblasts in culture. *J. Biol. Chem.* 259, 1703-1713.
- Havel RJ, Chao Y, Windler EE, Kotite L, Guo LS (1980) Isoprotein specificity in the hepatic uptake of apolipoprotein E and the pathogenesis of familial dysbetalipoproteinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4349-4353.
- Heeren J (1995) Retroendozytose von Chylomikronen bei mutanten embryonalen Mausfibroblasten. Diplomarbeit, Universität Hamburg
- Heeren J, Weber W, Beisiegel U (1999) Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J Cell Sci* 112(Pt 3):349-359
- Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* 7, 4119-4127.
- Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, Brown MS (1990) Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J.* 9, 1769-1776.
- Herz J, Goldstein JL, Strickland DK, Ho YK, Brown MS (1991) 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 21232-21238.
- Herz J, Clouthier DE, Hammer RE (1992) LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation (published erratum appears in *Cell* 1993 May 7;73(3):428). *Cell* 71, 411-421.

- Herz J, Couthier DE, Hammer RE (1993) Correction: LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 73, 428-428.
- Heuser J (1980) Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J.Cell Biol.* 84, 560-583.
- Hide WA, Chan L, Li WH (1992) Structure and evolution of the lipase superfamily. *J.Lipid Res.* 33, 167-178.
- Hofer F, Gruenberger M, Kowalski H, Machat H, Huettinger M, Kuechler E, Blass D (1994) Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 1839-1842.
- Hopkins CR, Gibson A, Shipman M, Miller K (1990) Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum (see comments). *Nature* 346, 335-339.
- Hospattankar AV, Law SW, Lackner K, Brewer HBJ (1986) Identification of low density lipoprotein receptor binding domains of human apolipoprotein B-100: a proposed consensus LDL receptor binding sequence of apoB-100. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 139, 1078-1085.
- Innerarity TL and Mahley RW (1978) Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry* 17, 1440-1447.
- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery (see comments). *J.Clin.Invest.* 92, 883-893.
- Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS (1994) The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 4431-4435.
- Ishibashi S, Perrey S, Chen Z, Osuga J, Shimada M, Ohashi K, Harada K, Yazaki Y, Yamada N (1996) Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J.Biol.Chem.* 271, 22422-22427.
- Jensen PH, Moestrup SK, Sottrup-Jensen L, Petersen CM, Gliemann J (1988) Receptors for alpha 2-macroglobulin- and pregnancy zone protein- proteinase complexes in the human placental syncytiotrophoblast. *Placenta.* 9, 463-477.
- Jensen TG, Roses AD, Jorgensen AL (1994) Apolipoprotein E uptake and degradation via chloroquine- sensitive pathway in cultivated monkey cells overexpressing low density lipoprotein receptor. *Neurosci.Lett.* 180, 193-196.
- Ji ZS, Brecht WJ, Miranda RD, Hussain MM, Innerarity TL, Mahley RW (1993) Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J.Biol.Chem.* 268, 10160-10167.
- Ji ZS, Fazio S, Lee YL, Mahley RW (1994a) Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J.Biol.Chem.* 269, 2764-2772.
- Ji ZS, Fazio S, Mahley RW (1994b) Variable heparan sulfate proteoglycan binding of apolipoprotein E variants may modulate the expression of type III hyperlipoproteinemia. *J.Biol.Chem.* 269, 13421-13428.
- Ji ZS, Lauer SJ, Fazio S, Bensadoun A, Taylor JM, Mahley RW (1994c) Enhanced binding and uptake of remnant lipoproteins by hepatic lipase-secreting hepatoma cells in culture. *J.Biol.Chem.* 269, 13429-13436.
- Ji ZS, Sanan DA, Mahley RW (1995) Intravenous heparinase inhibits remnant lipoprotein clearance from the plasma and uptake by the liver: in vivo role of heparan sulfate proteoglycans. *J.Lipid Res.* 36, 583-592.

- Ji ZS, Pitas RE, Mahley RW (1998) Differential cellular accumulation/retention of apolipoprotein E mediated by cell surface heparan sulfate proteoglycans. Apolipoproteins E3 and E2 greater than E4. *J Biol Chem* 273(22):13452-60
- Jing SQ, Spencer T, Miller K, Hopkins C, and Trowbridge IS (1990) Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific signal sequence for internalization. *J. Cell* 110, 283-294.
- Kerjaschki D and Farquhar MG (1982) The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79, 5557-5581.
- Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, Kim HJ, Suzuki H, Kondo H, Saeki S, Yamamoto T (1996) Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J.Biol.Chem.* 271, 8373-8380.
- Kirchgeßner TG, Chuat JC, Heinzmann C, Etienne J, Guilhot S, Svenson K, Ameis D, Pilon C, d'Auriol L, Andalibi A, (1989) Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24):9647-51
- Kirchhausen T, Toyoda T (1993) Immunoelectron microscopic evidence for the extended conformation of light chains in clathrin trimers. *J Biol Chem* 268(14):10268-73
- Kita T, Brown MS, Watanabe Y, Goldstein JL (1981) Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78, 2268-2272.
- Kita T, Goldstein JL, Brown MS, Watanabe Y, Hornick CA, Havel RJ (1982) Hepatic uptake of chylomicron remnants in WHHL rabbits: a mechanism genetically distinct from the low density lipoprotein receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79, 3623-3627.
- Kostner, GM, März, W (1995) Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In: Schwandt P, Richter O *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer, Stuttgart New York, S. 3-47
- Kounnas MZ, Morris RE, Thompson MR, FitzGerald DJ, Strickland DK, Saelinger CB (1992) The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes *Pseudomonas* exotoxin A. *J.Biol.Chem.* 267, 12420-12423.
- Kounnas MZ, Henkin J, Argraves WS, Strickland DK (1993) Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2- macroglobulin receptor mediates cellular uptake of pro-urokinase. *J.Biol.Chem.* 268, 21862-21867.
- Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Esser V, Brown MS (1989) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86, 5810-5814.
- Kowal RC, Herz J, Weisgraber KH, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL (1990) Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J.Biol.Chem.* 265, 10771-10779.
- Krapp A, Zhang H, Ginzinger D, Liu MS, Lindberg A, Olivecrona G, Hayden MR, Beisiegel U (1995) Structural features in lipoprotein lipase necessary for the mediation of lipoprotein uptake into cells. *J.Lipid Res.* 36, 2362-2373.
- Krapp A, Ahle S, Kersting S, Hua Y, Kneser K, Nielsen M, Gliemann J, Beisiegel U (1996) Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor-related protein (LRP). *J.Lipid Res.* 37, 926-936.
- Krieger M and Herz J (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu.Rev.Biochem.* 63, 601-637.
- Kristensen T, Moestrup SK, Gliemann J, Bendtsen L, Sand O, Sottrup-Jensen L (1990) Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor. *Febs.Lett.* 276, 151-155.

- LaFerla FM, Troncoso JC, Strickland DK, Kawas CH, Jay G (1997) Neuronal cell death in Alzheimer's disease correlates with apoE uptake and intracellular Abeta stabilization. *J Clin Invest* Jul 15;100(2):310-20
- Magnusson S, Faerevik I, Berg T (1992) Characterization of retroendocytosis in rat liver parenchymal cells and sinusoidal endothelial cells. *Biochem.J.* 287, 241-246.
- Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622-630.
- McFarlane AS (1958) Efficient trace labeling of proteins with iodine. *Nature* -57
- Medh JD, Bowen SL, Fry GL, Ruben S, Andracki M, Inoue I, Lalouel JM, Strickland DK, Chappell DA (1996) Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins in vitro. *J.Biol.Chem.* 271, 17073-17080.
- Meilinger M, Haumer M, Szakmary KA, Steinboeck F, Scheiber B, Goldenberg H, Huettinger M (1995) Removal of lactoferrin from plasma is mediated by binding to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2- macroglobulin receptor and transport to endosomes. *Febs.Lett.* 360, 70-74.
- Mikhailenko I, Kounnas MZ, Strickland DK (1995) Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2- macroglobulin receptor mediates the cellular internalization and degradation of thrombospondin. A process facilitated by cell- surface proteoglycans. *J.Biol.Chem.* 270, 9543-9549.
- Milne R, Theolis RJ, Maurice R, Pease RJ, Weech PK, Rassart E, Fruchart JC, Scott J, Marcel YL (1989) The use of monoclonal antibodies to localize the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B. *J.Biol.Chem.* 264, 19754-19760.
- Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G (1992) Distribution of the alpha2-makroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues *Cell Tissue Res* 1992 Sep; 269(3):375-82
- Nelson N (1992) Structure and function of V-ATPases in endocytic and secretory organelles. *J.Exp.Biol.* 172, 149-153.
- Neville DMJ (1971) Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J.Biol.Chem.* 246, 6328-6334.
- Niemeier A, Gafvels M, Heeren J, Meyer N, Angelin B, Beisiegel U (1996) VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J.Lipid Res.* 37, 1733-1742.
- Novak S, Hiesberger T, Schneider WJ, Nimpf J (1996) A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse. *J.Biol.Chem.* 271, 11732-11736.
- Nykjaer A, Petersen CM, Moller B, Jensen PH, Moestrup SK, Holtet TL, Etzerodt M, Thogersen HC, Munch M, Andreasen PA (1992) Purified alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase.plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes. *J.Biol.Chem.* 267, 14543-14546.
- Nykjaer A, Bengtsson-Olivecrona G, Lookene A, Moestrup SK, Petersen CM, Weber W, Beisiegel U, Gliemann J (1993) The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta- migrating very low density lipoprotein associated with the lipase. *J.Biol.Chem.* 268, 15048-15055.
- Nykjaer A, Nielsen M, Lookene A, Meyer N, Roigaard H, Etzerodt M, Beisiegel U, Olivecrona G, Gliemann J (1994) A carboxyl-terminal fragment of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein and inhibits lipase-mediated uptake of lipoprotein in cells. *J Biol Chem* 269(50):31747-55
- Octave JN, Schneider YJ, Truet A, Crichton RR (1983) Iron uptake and utilization by mammalian cells. I: Cellular uptake of transferrin and iron. *Trends In Biochemical Sciences* 8, 217-220.

- Oka K, Ishimura-Oka K, Chu MJ, Sullivan M, Krushkal J, Li WH, Chan L (1994) Mouse very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR) cDNA cloning, tissue-specific expression and evolutionary relationship with the low-density-lipoprotein receptor. *Eur J Biochem* 224(3):975-982
- Orth K, Madison EL, Gething MJ, Sambrook JF, Herz J (1992) Complexes of tissue-type plasminogen activator and its serpin inhibitor plasminogen-activator inhibitor type 1 are internalized by means of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 7422-7426.
- Pearse BM (1988) Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits. *EMBO J.* 7, 3331-3336.
- Pryer NK, Wuestehube LJ, Schekman R (1992) Vesicle-mediated protein sorting. *Annu.Rev.Biochem.* 61, 471-516.
- Raychowdhury R, Niles JL, McCluskey RT, Smith JA (1989) Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor. *Science* 244, 1163-1165.
- Rogler G, Herold G, Stange EF (1991) HDL3-retroendocytosis in cultured small intestinal crypt cells: a novel mechanism of cholesterol efflux. *Biochim.Biophys.Acta* 1095, 30-38.
- Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J (1998) Inducible Inactivation of Hepatic LRP Gene by Cre-mediated Recombination Confirms Role of LRP in Clearance of Chylomicron Remnants. *J.Clin.Invest.* 101(3), 689-695.
- Rothman JE and Schmid SL (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell* 46, 5-9.
- Rubinsztein DC, Cohen JC, Berger GM, van der Westhuyzen DR, Coetzee GA, Gevers W (1990) Chylomicron remnant clearance from the plasma is normal in familial hypercholesterolemic homozygotes with defined receptor defects. *J.Clin.Invest.* 86, 1306-1312.
- Russell DW, Brown MS, Goldstein JL (1989) Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. *J.Biol.Chem.* 264, 21682-21688.
- Salinelli S, Lo JY, Mims MP, Zsigmond E, Smith LC, Chan L (1996) Structure-function relationship of lipoprotein lipase-mediated enhancement of very low density lipoprotein binding and catabolism by the low density lipoprotein receptor. Functional importance of a properly folded surface loop covering the catalytic center. *J.Biol.Chem.* 271, 21906-21913.
- Schaefer EJ, Gregg RE, Ghiselli G, Forte TM, Ordovas JM, Zech LA, Brewer HBJ (1986) Familial apolipoprotein E deficiency. *J.Clin.Invest.* 78, 1206-1219.
- Schmid SL (1992) The mechanism of receptor-mediated endocytosis: more questions than answers. *Bioessays* 14(9):589-96
- Schneider WJ, Beisiegel U, Goldstein JL, Brown MS (1982) Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *J.Biol.Chem.* 257, 2664-2673.
- Semenkovich CF, Chen SH, Wims M, Luio CC, Li WH, Chan L (1989) Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution. *J.Lipid Res.* 30, 423-431.
- Shafi S, Brady SE, Bensadoun A, Havel RJ (1994) Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in rat liver. *J.Lipid Res.* 35, 709-720.
- St Clair RW and Beisiegel U (1997) What do all the apolipoprotein E receptors do? *Curr.Opin.Lipidol.* 8, 243-245.
- Stefansson S, Chappell DA, Argraves KM, Strickland DK, Argraves WS (1995) Glycoprotein 330/low density lipoprotein receptor-related protein-2 mediates endocytosis of low density lipoproteins via interaction with apolipoprotein B100. *J.Biol.Chem.* 270, 19417-19421.
- Tabas I (1995) The stimulation of the cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages. *Curr.Opin.Lipidol.* 6, 260-268.

- Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T (1992) Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 9252-9256.
- Takahashi S, Suzuki J, Kohno M, Oida K, Tamai T, Miyabo S, Yamamoto T, Nakai T (1995) Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J.Biol.Chem.* 270, 15747-15754.
- Warshawsky I, Broze GJJ, Schwartz AL (1994) The low density lipoprotein receptor-related protein mediates the cellular degradation of tissue factor pathway inhibitor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 6664-6668.
- Watanabe Y, Inaba T, Shimano H, Gotoda T, Yamamoto K, Mokuno H, Sato H, Yazaki Y, Yamada N (1994) Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages. Possible involvement in the atherosclerotic process. *Arterioscler.Thromb.* 14, 1000-1006.
- Weisgraber KH, Innerarity TL, Harder KJ, Mahley RW, Milne RW, Marcel YL, Sparrow JT (1983) The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Monoclonal antibody inhibition of binding. *J.Biol.Chem.* 258, 12348-12354.
- Wetterau JR, Aggerbeck LP, Rall SCJ, Weisgraber KH (1988) Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. *J.Biol.Chem.* 263, 6240-6248.
- Willnow TE, Goldstein JL, Orth K, Brown MS, Herz J (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J.Biol.Chem.* 267, 26172-26180.
- Willnow TE, Sheng Z, Ishibashi S, Herz J (1994) Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science* 264, 1471-1474.
- Windler E, Chao Y, Havel RJ (1980) Determinants of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants in the rat. *J.Biol.Chem.* 255, 5475-5480.
- Wolf BB, Lopes MB, VandenBerg SR, Gonias SL (1992) Characterization and immunohistochemical localization of alpha 2- macroglobulin receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein) in human brain. *Am.J.Pathol.* 141, 37-42.
- Yamada N, Shames DM, Takahashi K, Havel RJ (1988) Metabolism of apolipoprotein B-100 in large very low density lipoproteins of blood plasma. Kinetic studies in normal and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J.Clin.Invest.* 82, 2106-2113.
- Yamamoto T, Hoshino A, Takahashi S, Kawarabayasi Y, Iijima H, Sakai J (1995) The role of the very low density lipoprotein receptor in the metabolism of plasma lipoproteins containing ApoE. *Ann.NY Acad.Sci.* 748, 217-224.
- Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Seimiya K, Kanaki T, Morisaki N, Schneider WJ, Saito Y (1996) Elements of neural adhesion molecules and yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J.Biol.Chem.* 271, 24761-24768.
- Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS, Schonfeld G, Hazzard WR, Blum C. (1982) Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J.Lipid Res.* 23, 911-914.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

AP	Adaptor Protein
Apo	Apolipoprotein
AS	Aminosäure
ATP	Adenylnukleotidtriphosphat
b	bovin
BSA	Bovine Serum Albumin
CETP	Cholesterinestertransferprotein
CPM	Counts Per Minute
CURL	Compartment of Uncoupling Receptors and Ligands
δ	Dichte einer Lösung in g/ml
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	Fetal Bovine Serum
FH	Familiäre Hypercholesterinämie
HDL	High Density Lipoproteins
HL	Hepatische Lipase
HSPG	Heparansulphat Proteoglykane
IDL	Intermediate Density Lipoproteins
KBr	Kaliumbromid
kDa	Kilodalton
LCAT	Lezithin-Cholesterol-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoproteins
LDL-R	Low Density Lipoprotein Rezeptor
LPDS	Lipoproteindefizientes Serum
LpL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-Receptor-Related Protein
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PL	Pankreatische Lipase
RAP	Receptor Associated Protein
SDS	Sodiumdodecylsulphat
THL	Tetrahydrolipstatin
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
VLDL-R	Very Low Density Lipoprotein Rezeptor

7.2. Danksagung

Für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die stets geduldige Unterstützung gilt mein besonderer Dank Dr. Jörg Heeren.

Für wissenschaftliche Betreuung und Bereitstellung der technischen Voraussetzungen die diese Arbeit möglich gemacht haben, gebührt mein aufrichtiger Dank Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Schließlich sei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Biochemischen Stoffwechsellabors ganz herzlich gedankt.

7.3. Lebenslauf

Name	Jens Höppner
Geburtsdatum	16.1.73
Geburtsort	Bremen
Familienstand	ledig
Eltern	Fritz und Rosemarie Höppner

Schulbildung

08/79-07/83	Grundschule Brinkum
08/83-07/92	Kooperative Gesamtschule Stuhr-Brinkum
07/92	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife / Abitur

Berufsausbildung

04/93	Studium der Medizin an der Universität Hamburg
03/95	Ärztliche Vorprüfung / Physikum
03/96	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/98	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/98	Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel im Biochemischen Stoffwechsellabor der Medizinischen Klinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf
10/98 – 09/99	Ausbildung im Rahmen des Praktischen Jahres (PJ) am Universitätskrankenhauses Eppendorf Hamburg, am Universitätsspital Zürich / Schweiz und am Mt. Zion Hospital der University of California San Francisco / USA
11/99	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Abschluß des Medizinstudiums

7.4. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne Fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht anderweitig einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Jens Höppner