

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

**Apolipoprotein E- und HDL-induzierter
Cholesterintransport aus endosomalen Kompartimenten**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Karim Gras
aus Berlin

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 02.11.2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. W. Hampe

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. Schmale

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Arbeitshypothese und Fragestellung</u>	1
2	<u>Einleitung</u>	2
2.1	Die Lipoproteine	2
2.1.1	Stoffwechselwege exogener Lipide	3
2.1.2	Stoffwechselwege endogener Lipide	4
2.1.3	Reverser Cholesterintransport	5
2.2	Intrazelluläre Stoffwechselwege von Lipoproteinen	6
2.2.1	Zelluläre Bindung und Internalisierung von Liganden	6
2.2.2	Intrazellulärer LDL-Stoffwechsel	7
2.2.3	Intrazellulärer Stoffwechsel triglyzeridreicher Lipoproteine	9
2.2.4	Intrazellulärer HDL-Stoffwechsel	10
2.3	Regulation des intrazellulären Stoffwechsels durch Rab-Proteine	11
2.3.1	Rab-Proteine und Cholesterinhomöostase	16
2.4	Inhibitoren des intrazellulären Transportes	17
2.5	Ziel der Arbeit	20
3	<u>Material und Methoden</u>	21
3.1	Geräte	21
3.2	Verbrauchsmittel	21
3.3	Chemikalien	22
3.4	Zellkultur	22
3.5	Proteinbestimmung	23
3.6	Cholesterinefflux in Abhängigkeit von Rab4 und Rab5	25
3.6.1	DNA-Präparation	25
3.6.2	Transfektionsvektoren / Restriktionsverdau	26
3.6.3	Transfektion von HUH7-Zellen	27
3.7	Isolierung von Liganden und radioaktive Markierung	28
3.7.1	Isolierung von Chylomikronen	28
3.7.2	Isolierung von LDL und HDL	29
3.7.3	³ H-Cholesterin-Markierung von LDL und Chylomikronen	29

3.8	Pulse-Chase-Experimente	30
3.9	Immunfluoreszenz	33
3.9.1	Aufnahmeexperimente	34
3.9.2	Pulse-Chase-Experimente	35
4	<u>Ergebnisse</u>	36
4.1	Charakterisierung der Lipoproteine	36
4.2	Markierung der Liganden	37
4.3	Cholesterinefflux unter Hemmung des vesikulären Transportes	38
4.4	ApoE-abhängiger Cholesterintransport in Rab4-/Rab5-überexprimierenden Zellen	46
4.5	Lokalisation von Rab5 und Cholesterin in intrazellulären Kompartimenten	53
5	<u>Diskussion</u>	59
6	<u>Zusammenfassung</u>	68
7	<u>Literaturverzeichnis</u>	69
8	<u>Anhang</u>	84
8.1	Abkürzungsverzeichnis	84
8.2	Danksagung	86
8.3	Lebenslauf	87
8.4	Erklärung	88

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Triglyzeride der im Darm synthetisierten Chylomikronen werden im Blut von der Lipoprotein-Lipase (LPL) hydrolysiert, so dass die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide direkt zur Energiegewinnung im Muskel bzw. zur Speicherung im Fettgewebe genutzt werden. Während der Hydrolyse wird das Apolipoprotein E (ApoE) von Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) auf die verbleibenden Chylomikronen-Remnants (CR) transferiert. Das ApoE bindet an hepatische Lipoprotein-Rezeptoren, insbesondere das LDL-Rezeptor Related Protein 1 (LRP1) und den LDL-Rezeptor (LDL-R), und kann somit die CR-Aufnahme in die Leber vermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass nach der Aufnahme der CR der hydrophobe Lipidanteil zusammen mit dem ApoB in die Lysosomen zur Degradation transportiert wird, während ApoE in peripheren Recycling-Endosomen verbleibt (Heeren et al., 1999). HDL im extrazellulären Medium stimuliert sowohl das Recycling von ApoE als auch den Cholesterinefflux aus diesen Endosomen, so dass dieser Prozess eine Rolle bei der Neubildung ApoE-reicher HDL spielt (Heeren et al., 2003). In dieser zellbiologischen Arbeit soll geklärt werden, welche endosomalen Kompartimente an dem HDL-induzierten Recycling von ApoE und dem Cholesterinefflux beteiligt sind.

2 Einleitung

2.1 Die Lipoproteine

Lipide stellen neben Kohlenhydraten und Eiweißen den wichtigsten Energielieferanten für den menschlichen Organismus dar. Sie sind außerdem Grundbestandteil von biologischen Membranen, Steroidhormonen und Gallensäuren. Durch Transport im Blutplasma werden Lipide den einzelnen Organen zugeführt und zwischen den Geweben ausgetauscht. Es lassen sich die amphiphilen Fettsäuren, Phospholipide und freies Cholesterin von den hydrophoben Cholesterinestern und Triglyzeriden unterscheiden. Freie Fettsäuren werden überwiegend an Albumin gebunden transportiert. Wegen ihrer Wasserunlöslichkeit werden die anderen Lipide im Plasma zu mizellaren Komplexen mit Proteinen zusammengesetzt, den sogenannten Lipoproteinen. Diese großen sphärischen Partikel bestehen aus zu Mizellen angeordneten Phospholipiden und freiem Cholesterin, Apolipoproteinen und den im Kern angeordneten hydrophoben Triglyzeriden und Cholesterinestern. Lipoproteine werden nach Dichte, Größe, elektrischer Ladung und Lipid-Apolipoproteinanteilen in fünf verschiedene Klassen unterteilt (Gotto et al., 1986). Die triglyzeridreichen Chylomikronen sind die größten Lipoproteine (\varnothing 75-1200 nm) mit der geringsten Dichte ($\delta < 0,96$ g/ml), sie zeichnen sich weiterhin durch einen hohen Lipidanteil (98%) und einen geringen Proteinanteil (2%) aus. Es folgen mit abnehmender Größe und zunehmender 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), die einen Proteinanteil von bis zu 55% aufweisen können. Die Bezeichnung der Lipoproteine geht auf die unterschiedliche Anordnung der in einem Kaliumbromid-Dichtegradienten durch Ultrazentrifugation getrennten Fraktionen zurück. Der Apolipoprotein-Anteil gibt den Lipoproteinen zusätzliche Stabilität und spielt im Stoffwechsel der Lipide eine entscheidende Rolle. Apolipoproteine bestimmen die Geschwindigkeit des Lipoprotein-Umsatzes. Sie vermitteln über Interaktion mit Oberflächenproteinen und Rezeptoren die spezifische Aufnahme in die Zelle, sind als Kofaktoren an verschiedenen enzymatischen Reaktionen beteiligt und stabilisieren die Lipoproteinstruktur mittels amphipathischer Helices.

Im Lipoproteinmetabolismus des Menschen lässt sich grundsätzlich die Verstoffwechslung über die Nahrung aufgenommener Lipide von der vom Organismus

selbst synthetisierter Lipide unterscheiden. Es kann also von einem exogenen und einem endogenen Stoffwechselweg der Lipide gesprochen werden.

2.1.1 Stoffwechselwege exogener Lipide

Die über die Nahrung aufgenommenen Triglyzeride werden nach Emulgation durch die Magen- und Pankreaslipase in Di- und Monoglyzeride sowie freie Fettsäuren gespalten. Die entstandenen Spaltprodukte assoziieren mit Gallensäuren und bilden zusammen mit Cholesterin und Phospholipiden Mizellen, die in die Enterozyten des Jejunums aufgenommen werden, wobei die Gallensäuren über den enterohepatischen Kreislauf wieder in die Leber gelangen. Mit der Nahrung zugeführte Cholesterinester werden vor Integration in die Mizellen durch die pankreatische Cholesterinesterase hydrolysiert. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Cholesterinabsorption über NPC1L1 vermittelt wird (Altmann et al., 2004).

Während kurzkettige Fettsäuren aufgrund ihrer relativ guten Wasserlöslichkeit über die Vena Portae zur Leber gelangen, werden langkettige Fettsäuren in den Dünndarmepithelzellen zur Resynthese von Triglyzeriden durch Übertragung freier Fettsäuren auf β -Monoglyzeride oder kompletter Neusynthese aus α -Glyzerophosphat und freien Fettsäuren genutzt. In den Mucosazellen entstehen aus Triglyzeriden, Cholesterinestern, Phospholipiden und den Apolipoproteinen ApoA-I, ApoA-II, ApoB-48 und ApoA-IV die Chylomikronen. Chylomikronen werden nach Exozytose in den interstitiellen Raum in die Lymphe abgegeben und gelangen unter Umgehung der Leber über den Ductus thoracicus in den venösen Kreislauf (Hussain et al., 1996; Kane, 1996). Bereits im Dünndarminterstitium sowie im Blut nehmen die Chylomikronen die aus den HDL stammenden Apolipoproteine ApoC-I, ApoC-II und ApoC-III auf, wobei ApoC-II essentieller Kofaktor für die endothelständige Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG)-gebundene LPL ist (Olivecrona und Bengtsson-Olivecrona, 1993). Die Triglyzeride der Chylomikronen werden intravaskulär hydrolytisch von der LPL gespalten (Eisenberg et al., 1992). Die dabei entstehenden freien Fettsäuren stehen entweder als Substrat der β -Oxidation in Skelett und Herzmuskulatur der Energiegewinnung zur Verfügung oder werden im Fettgewebe re-verestert und gespeichert. Während der Lipolyse nehmen die Chylomikronen ApoE aus den HDL auf, geben überschüssige Apolipoproteine und Phospholipide ab und formen so die kleineren CR, die nun auch die von den Endothelzellen abgelöste LPL enthalten (Zambon et al., 1996). ApoE erhöht wesentlich die Affinität der CR zu dem LDL-R und LRP1 der Leberzellen (Bradley und Gianturco, 1986;

Beisiegel et al., 1989; Kowal et al., 1989; Willnow et al., 1994; Beisiegel, 1995; Rohlmann et al., 1998). LPL kann zusätzlich mit hoher Affinität LRP1 binden und vermittelt so die endozytotische Aufnahme der Remnants in die Hepatozyten (Beisiegel et al., 1991; Heeren et al., 2002). Auch HSPG scheinen direkt an Remnantbindung und -aufnahme beteiligt zu sein (Mahley und Ji, 1999). Durch die Hepatische-Lipase, die an den HSPG von Leberzellen lokalisiert ist, werden die CR abschließend prozessiert (Mahley und Ji, 1999). Mittels rezeptorvermittelter Endozytose in die Parenchymzellen der Leber werden die in den CR verbliebenen Triglyzeride, Cholesterinester und Oberflächenlipide effektiv und schnell zur Zwischenlagerung in den intrazellulären Pool verschoben.

2.1.2 Stoffwechselwege endogener Lipide

Im Hungerzustand dient von der Leber synthetisiertes VLDL dazu, periphere Gewebe mit Triglyzeriden zur Energiegewinnung und Cholesterin als Membranbaustein und Vorstufe für die Synthese von Steroidhormonen und Vitamin D zu versorgen. Im Verlauf des peripheren VLDL-Abbaus entstehen IDL und LDL.

Jeder im menschlichen Hepatozyten synthetisierte VLDL-Partikel enthält ein Molekül ApoB-100, außerdem ApoE und kleine Mengen ApoC. Es werden nun je nach Partikelgröße, Dichte und entsprechender Flotationsrate in der Ultrazentrifuge größere, triglyzeridreiche VLDL₁ von kleineren, triglyzeridarmen VLDL₂ unterschieden (Packard und Shepherd, 1997). Nach Exozytose in den Disse-Raum und Eintritt in den Blutkreislauf nehmen die VLDL weitere von den HDL stammende Moleküle ApoE und ApoC auf. Die durch die endothelständige LPL katalysierte Hydrolyse der Triglyzeride in den VLDL führt, ähnlich wie bei den Chylomikronen, zu einer Bereitstellung von freien Fettsäuren für periphere Gewebe und lässt kleinere, relativ Cholesterin- und ApoE-reiche Partikel zurück, die IDL. Diese können - bedingt durch ihren hohen ApoE-Anteil - über den LDL-R wieder in die Leberzellen aufgenommen werden. Alternativ können aus IDL auch LDL entstehen. Der LDL-Entstehung geht eine weitere LPL- und Hepatische-Lipase-vermittelte Hydrolyse von Triglyzeriden der IDL, ein Verlust des ApoE-Anteils und die Cholesterin-Ester-Transfer-Protein (CETP)-vermittelte Cholesterinanreicherung aus HDL voraus. Die cholesterinreichen LDL-Partikel enthalten als einziges Apolipoprotein das ApoB 100, über dessen Bindung an den LDL-R sie als Cholesterinlieferanten in hepatische und extrahepatische Gewebe aufgenommen werden (Brown und Goldstein, 1986). Die zelluläre Cholesterinhomeostase wird sowohl über Induktion von Schlüsselenzymen der zellulären De-Novo-Synthese als auch über die Expression des LDL-R reguliert; so werden

intrazellulär hohe Cholesterinkonzentrationen vermieden. Ein LDL-R-unabhängiger, nicht sättigbarer Mechanismus des LDL-Katabolismus wird als Scavenger-Pathway bezeichnet. Etwa ein Drittel der LDL wird so durch adsorptive Endozytose, Pinozytose und mittels Scavenger-Rezeptoren, die spezifisch modifizierte LDL binden können, zellulär aufgenommen. Erhöhte Serum-LDL-Spiegel sind ein maßgeblicher Risikofaktor für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen. Vor allem kleine, dichte LDL-Partikel werden langsamer aus dem Blut eliminiert, sind leichter oxidierbar und penetrieren aufgrund ihrer hohen Affinität zu Proteoglykanen leichter das Gefäßendothel (Lamarche et al., 1997), wo sie nach oxidativer Veränderung über Interaktion mit dem Scavenger-Rezeptor in Makrophagen aufgenommen werden. Weitere Cholesterineinlagerung in die Makrophagen führt zur Bildung so genannter Schaumzellen, die den Bereich beginnender atherosklerotischer Veränderungen demarkieren (Krieger und Herz, 1994). Cholesterin kann vom Organismus nur in Form von freiem Cholesterin oder Gallensäuren über die Leber ausgeschieden werden.

2.1.3 Reverser Cholesterintransport

Der menschliche Organismus kann Cholesterin bis auf geringe Mengen, die über die Haut abgeschilfert werden, nur über die Leber ausscheiden. Hohe intrazelluläre Cholesterinkonzentrationen können zytotoxisch wirken (Leake und Peters, 1982; Sevanian und Peterson, 1986; Brady et al., 1989). Periphere Zellen müssen daher ihr überschüssiges Cholesterin in einer als reverser Cholesterintransport bezeichneten Abfolge metabolischer Ereignisse zur Leber transportieren, wo Cholesterin entweder direkt oder nach Umbau zu Gallensäuren ausgeschieden werden kann. Eine zentrale Rolle nehmen hierbei die in Leber und Dünndarm gebildeten HDL ein. Naszierende HDL enthalten ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV und ApoE. Diese neu synthetisierten HDL nehmen freies Cholesterin peripherer Zellen auf, das dann von der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verestert wird. ApoA-I wird bei dieser Reaktion als Kofaktor benötigt (Fielding und Fielding, 1980; Phillips et al., 1998). Im Serum unterscheidet man kleinere, dichte HDL₃, die nach weiterer Cholesterineinlagerung die größeren, weniger dichten HDL₂ bilden. An der Aufnahme peripheren Cholesterins sind vor allem HDL₃ beteiligt, da sie den für einen gerichteten Flux von Cholesterin zwischen Zelle und HDL nötigen Konzentrationsgradienten zwischen Membran und Akzeptor-Lipoprotein aufweisen. In den HDL enthaltene Cholesterinester werden mittels CETP auf ApoB-haltige Lipoproteine übertragen und dann - im Sinne eines Cholesterinester-Recycling - über den LDL-R aus

der Zirkulation entfernt oder über die Leber ausgeschieden. Cholesterinester werden jedoch auch direkt von den HDL zur Leber transportiert und dort, vermittelt durch den „Scavenger-Receptor-Class-B-Type I“ (SR-BI), selektiv aufgenommen (Acton et al., 1996).

2.2 Intrazelluläre Stoffwechselwege von Lipoproteinen

Die rezeptorvermittelte Endozytose beschreibt die spezifische Internalisierung von Makromolekülen aus dem Extrazellulärraum unter Überwindung der Plasmamembran. Membranständige Rezeptoren vermitteln hierbei die Aufnahme von Transportproteinen des Plasmas, Hormonen, Immunglobulinen, aber auch von Viren und Toxinen in das Zellinnere.

2.2.1 Zelluläre Bindung und Internalisierung von Liganden

Nach Rezeptorbindung des Liganden werden die Rezeptor-Ligand-Einheiten über bestimmte, „Clathrin-Coated-Pits“ (Coated-Pits) genannte Regionen der Zellmembran in die Zelle aufgenommen (Anderson et al., 1977). Die Rezeptoren können, wie z.B. der LDL-R, schon vor Bindung des Liganden im Bereich der Coated-Pits konzentriert vorkommen. Die Ligandenbindung an den Rezeptor kann aber auch die Anreicherung zu internalisierender Partikel und die Entstehung von Coated-Pits induzieren, wie es zum Beispiel bei dem EGF-Rezeptor oder dem Insulin-Rezeptor der Fall ist. Bei der spezifischen Anreicherung von LDL-Rezeptoren dient eine tyrosinhaltige Tetrapeptidsequenz (NPXY) im zytoplasmatischen Teil des LDL-R als Erkennungsmerkmal (Pearse, 1988; Chen et al., 1990). Coated-Pits weisen an ihrer zytoplasmatischen Seite ein korbartiges Clathringerüst auf, das über Adaptine an den LDL-R befestigt ist. Adaptinkomplexe am Trans-Golgi (AP1) und an der Plasmamembran (AP2) vermitteln über Clathrin-bindende Domänen (Ahle et al., 1988; Robinson, 1994) Membranbindung und selektiven Vesikeltransport (Pearse, 1988; Keen und Beck, 1989). Clathrin ist aus drei leichten und drei schweren Untereinheiten aufgebaut, wobei die schweren Untereinheiten die wesentliche Strukturkomponente, sogenannte Triskelionen formieren (Brodsky, 1988). Die spontane Krümmung der Triskelion-Matrix bewirkt eine Vesikelabschnürung aus der Plasmamembran und damit die Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Einheiten (Heuser, 1980). Die nun als „Clathrin-Coated-Vesicles“ (Coated-Vesicles) bezeichneten Zellorganellen verlieren unter Katalyse des „Uncoating-Enzyme“ ihren Clathrin-Mantel (Rothman und Schmid, 1986) und ermöglichen so eine Fusion der Vesikel mit anderen

Organellen. Nach Verschmelzung mit den sogenannten sortierenden Endosomen (Geuze et al., 1983) kommt es durch eine ATP-abhängige Absenkung des pH-Wertes ($<6,0$) in den Vesikeln zur Dissoziation von Rezeptor und Ligand (Nelson, 1992). Diese jetzt auch als „Compartment of Uncoupling Receptor and Ligand“ (CURL) bezeichneten Strukturen sind große vesikuläre Organellen mit tubulären Fortsätzen, in denen sich die regenerierten Rezeptoren befinden, wohingegen die Liganden im Vesikellumen liegen. Durch Abschnürung und Clathrin-Ummantelung der tubulären Fortsätze werden die Rezeptoren, im Sinne eines Recyclings (Mukherjee et al., 1997), zurück zur Zellmembran transportiert, wo sie erneut der Bindung ihres Liganden zur Verfügung stehen. Dieses Rezeptor-Recycling gilt jedoch nicht für alle Rezeptor-Ligand-Komplexe. Der EGF-Rezeptor beispielsweise wird zusammen mit seinem Liganden zu den Lysosomen transportiert, wo beide Konstituenten vollständig degradiert werden (De Duve und Wattiaux, 1966). Nach Rezeptor-Ligand-Dissoziation werden die sich im Lumen befindenden Liganden unter weiterer Ansäuerung ($\text{pH}=5,0-6,0$) in den nun als prälysosomal-späte Endosomen bezeichneten Vesikeln zu den Lysosomen transportiert und nach Vesikelfusion terminal degradiert.

Eine weitere Möglichkeit des Rezeptor-Recyclings wurde für den Transferrin-Rezeptor (TfR) beschrieben (Octave et al., 1983). An Transferrin (Tf) gebundenes zweiwertiges Eisen wird über den TfR in die Zelle aufgenommen. Im sortierenden Endosom dissoziiert das Eisen nach pH-Verminderung von dem Tf, während dieses über Apotransferrin an seinen Rezeptor gebunden bleibt. Der TfR-Komplex wird unter Umgehung lysosomaler Degradation von sogenannten Recycling-Endosomen zurück an die Zelloberfläche transportiert. Hier zerfällt der Komplex unter den Bedingungen eines neutralen pH-Wertes und der Rezeptor kann erneut Eisen beladenes Tf binden. Für Recycling-Endosomen wurde auch ein retrograder Transport zu den sortierenden Endosomen beobachtet (Ghosh und Maxfield, 1995), wie er ebenfalls zwischen Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischen Retikulum vorkommt (Sandvig und van Deurs, 1996).

2.2.2 Intrazellulärer LDL-Stoffwechsel

Die durch Delipidierung von VLDL oder De-Novo-Synthese der Leber (Gaw et al., 1995) entstandenen LDL transportieren beim Stoffwechselgesunden mehr als zwei Drittel des Cholesterins im Plasma. LDL-Abbau erfolgt größtenteils über Bindung an den LDL-R und rezeptorvermittelte Endozytose (Brown und Goldstein, 1986). Nach Aufnahme in die Zelle werden LDL in Lysosomen abgebaut. Der Proteinanteil der LDL wird hydrolytisch

gespalten und die enthaltenen Cholesterinester von der sauren Lipase in Fettsäuren und Cholesterin zerlegt. So entstandenes freies Cholesterin wird für die Synthese von Membranen, Steroidhormonen und Gallensäuren eingesetzt oder zur Speicherung erneut verestert. Ein Teil der über Rezeptoren in die Zelle aufgenommenen LDL wird nicht degradiert, sondern erscheint unverändert wieder an der Zelloberfläche. Bei diesem auch als Retroendozytose bezeichneten Rezeptor-Ligand-Recycling (Greenspan und St Clair, 1984; Kambouris et al., 1990) führt endosomale Ansäuerung nicht zu einer Dissoziation der LDL von ihrem Rezeptor, so dass intakte LDL-Partikel zusammen mit den Rezeptoren an die Zelloberfläche zurücktransportiert werden (Magnusson et al., 1992). Auch für HDL wurde Retroendozytose beschrieben (Rogler et al., 1991). Die genauen Mechanismen und die Rolle dieses Transportweges im retrograden Cholesterintransport sollen später eingehender beschrieben werden.

Da exzessive intrazelluläre Cholesterinkonzentrationen jedoch auch zelltoxisch wirken können (Brown und Goldstein, 1986), unterliegt die zelluläre Cholesterinhomöostase einer komplexen Regulation. Freies Cholesterin aktiviert die für die Veresterung benötigte Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) und nimmt über Hemmung der Cholesterinbiosynthese und Regulierung der LDL-R-Expression eine Schlüsselrolle in der Steuerung zellulärer Cholesterinhomöostase ein. Sinkt der Cholesteringehalt der Membran des Endoplasmatischen Retikulums oder der Kernmembran, so werden dort verankerte „Sterol-Responsive-Element-Binding-Proteins“ (SREBP-1, SREBP-2) genannte Transkriptionsfaktoren aktiviert (Brown und Goldstein, 1997), die im Zellkern unter anderem die Transkription des Gens für den LDL-R, die HMG-CoA-Synthetase und HMG-CoA-Reduktase ermöglichen. SREBP-Aktivierung erfolgt durch die „SREBP-Cleavage-Activating-Protein“ (SCAP)-vermittelte proteolytische Freisetzung eines 68 kDa schweren aminoterminalen Fragmentes der SREBP, welches in den Zellkern wandert und u.a. an das „Sterol-Responsive-Element“ (SRE-1) im Bereich der LDL-R-Promotor-Sequenz bindet. Zusammen mit dem positiven Transkriptionsfaktor Sp1 wird so die Transkription des Gens für den LDL-R in Gang gesetzt. SCAP wird über den Sterolgehalt der Membranen reguliert. Nimmt die Cholesterinkonzentration in der Membran zu, so wird SCAP beschleunigt abgebaut und SREBP-Proteolyse vermindert (Sakai und Rawson, 2001). Die Regulation der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität erfolgt außerdem auf translationaler und posttranslationaler Ebene. Hierdurch wird dieses Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese zu einem der am stärksten regulierten Enzyme der Zelle, seine Aktivität kann um den Faktor 200 variieren (Goldstein und Brown, 1990).

2.2.3 Intrazellulärer Stoffwechsel triglyzeridreicher Lipoproteine

Triglyzeride werden im Blut hauptsächlich in Form von Chylomikronen und VLDL transportiert, zusammenfassend spricht man auch von der Gruppe der triglyzeridreichen Lipoproteine (TRL). Während Chylomikronen die über die Nahrung aufgenommenen Lipide transportieren, werden die in der Leber synthetisierten VLDL für den Transport endogener Lipide eingesetzt.

Der intrazelluläre Metabolismus der TRL-Remnants weist einige Unterschiede zu dem der LDL auf (Tabas et al., 1990; Lombardi, Mulder et al., 1993). Nach Aufnahme über frühe Endosomen und Aufspaltung der TRL-Partikel in sortierenden Endosomen, unterscheidet sich der weitere intrazelluläre Stoffwechselweg der einzelnen TRL-Bestandteile. Während der Lipid-Anteil der TRL und ApoB zur hydrolytischen Degradation in lysosomale Kompartimente wandern, werden ApoE, ApoC und LPL über periphere Recycling-Kompartimente zurück zur Plasmamembran transportiert, wo sie in Form sogenannter „Surface-Remnants“ nachgewiesen wurden (Heeren et al., 1999). Dieser Weg scheint auch in vivo zu existieren, da eine relative Resistenz der ApoE-Moleküle gegenüber intrazellulärer Degradation im Mausmodell aufgezeigt wurde (Rensen et al., 2000). LPL-Assoziation mit den TRL-Remnants trägt zu dieser erhöhten Resistenz der ApoE bei und verstärkt so das ApoE-Recycling (Heeren et al., 2001). Die an dem ApoE- und LPL-Recycling zur Plasmamembran beteiligten peripheren Kompartimente stimmen nicht mit dem Transferrin-Recycling-Kompartiment überein (Heeren et al., 1999; Mamdouh et al., 2000), sondern wurden im Gegensatz zum perinukleären Transferrin-Recycling-Kompartiment als peripheres Rezeptor-Recycling-Kompartiment identifiziert (Heeren et al., 1999). Vermutlich verhindern hochaffine Bindungen zwischen ApoE und dem LDL-R oder LRP1 die intrazelluläre Dissoziation des Rezeptor-ApoE-Komplexes nach pH-Absenkung (Tabas et al., 1991; Fazio et al., 1999; Heeren et al., 1999). So ermöglicht das ApoE-Recycling im physiologischen Kontext möglicherweise die für die effiziente TRL-Remnant-Aufnahme über LRP1 nötige ApoE-Anreicherung im Disse-Raum (Linton et al., 1998). Recycling von ApoE scheint nicht nur über Recycling-Endosomen stattzufinden. So konnte über β -VLDL aufgenommenes ApoE in naszierenden VLDL und HDL aus dem Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Fazio et al., 1999; Farkas et al., 2003). Während ihrer intrazellulären Verstoffwechslung kommen die β -VLDL in weit über das Zytoplasma verteilten peripheren Kompartimenten vor, die nicht mit denen des LDL-Stoffwechsels identisch sind (Mukherjee et al., 1997). Der Nachweis des von internalisierten β -VLDL stammenden Cholesterins in intrazellulären Pools, die besonders effektiv die ACAT stimulieren, zeigt die mögliche Beteiligung dieses Lipoproteintyps an der Umwandlung von

Makrophagen zu atherosklerotischen Schaumzellen. Dem steht die Atherosklerose-protective Wirkung von endogen synthetisiertem ApoE in Makrophagen und Leberzellen und vor allem exogenem, über TRL transportiertem ApoE gegenüber (Kashyap et al., 1995; Linton et al., 1995; Stevenson et al., 1995). Die Rolle des ApoE für HDL-Synthese und Cholesterinefflux soll später eingehender beschrieben werden. Der Nachweis von Caveolin 1 - einem Lipid-Raft-assoziierten Protein - in Recycling-Endosomen könnte eine Verbindung zwischen TRL-Transport und spezialisierten Domänen der Plasmamembran darstellen (Gagescu et al., 2000; Simons und Ikonen, 2000).

2.2.4 Intrazellulärer HDL-Stoffwechsel

Der menschliche Organismus kann überschüssiges Cholesterin nur über die Leber ausscheiden. Exzessiv hohe intrazelluläre Cholesterinkonzentrationen wirken zytotoxisch, und Hypercholesterinämie gilt als Risikofaktor erster Ordnung für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen. Der HDL-vermittelte reverse Cholesterintransport wirkt diesen toxischen Effekten des Cholesterins entgegen.

Die Rolle der HDL als extrazelluläre Akzeptoren von Cholesterin ist gesichert. Für die genauen Mechanismen des HDL-induzierten zellulären Cholesterinefflux (Fielding und Fielding, 2001; von Eckardstein et al., 2001; Oram, 2002) und dessen Feinregulierung bestehen unterschiedliche Modelle. HDL-Interaktion mit Rezeptoren der Plasmamembran und anschließender Endozytose und Retroendozytose über Recycling-Kompartimente wurden beschrieben (Schmitz et al., 1985; Rogler et al., 1991; Garcia et al., 1996; Klinger et al., 1997; Silver et al., 2000). Der membranständige SR-BI bindet HDL und ist an der endozytotischen Aufnahme und Re-Sekretion der HDL-Partikel beteiligt (Silver et al., 2000; Silver et al., 2001). Es wurden in SR-BI-überexprimierenden Zellen markierte HDL - nach Rezeptorbindung - in Endosomen nachgewiesen (Gu et al., 1998). Auch eine mit der HDL-Aufnahme einhergehende SR-BI-Internalisierung konnte gezeigt werden (Silver et al., 2000). Ein weiteres HDL-bindendes Protein an der Zelloberfläche ist „ATP-Binding-Cassette-Transporter A1“ (ABCA1). Von den HDL stammendes ApoA-I wird nach ABCA1-Bindung internalisiert (Takahashi und Smith, 1999; Zheng et al., 2001) und kann in ApoE- und cholesterinhaltigen frühen Endosomen nachgewiesen werden (Heeren et al., 2003). ApoA-I vermag über diese Interaktion mit vorbestehenden ApoE-Cholesterin-Komplexen den zellulären Cholesterinefflux und ApoE-Recycling zu steigern (Bielicki et al., 1999; Rees et al., 1999; Heeren et al., 2003). Auch HDL-unabhängiges ApoE-Recycling steigert den zellulären Cholesterinefflux (Heeren et al., 2003). Die ApoA-I- und ApoE-induzierte

Cholesterinefflux-Steigerung peripherer Zellen scheint maßgeblich verantwortlich zu sein für den effizienten reversen Cholesterintransport zur Leber (Schwartz et al., 1978; Silver et al., 2001). Neben ihrer Funktion als extrazelluläre Cholesterinrezeptoren nehmen HDL auch die nach intrazellulärem Recycling sezernierten ApoE-Moleküle wieder auf (Heeren et al., 1999; Heeren et al., 2001; Heeren et al., 2003). Dieser Mechanismus führt über die Entstehung ApoE-angereicherter HDL-Partikel zur kontinuierlichen Bereitstellung einer ApoE-Quelle im Plasma, wie sie für den intravaskulären ApoE-Transfer von HDL zu TRL-Remnants und deren Clearance über die Leber benötigt wird (Heeren und Beisiegel, 2001). Auch für ABCA1 wurde die Aufnahme in die Zelle und eine Cholesterinefflux-steigernde Wirkung beschrieben (Chen et al., 2001; Oram, 2002). ABCA1 zirkuliert hierbei zwischen Plasmamembran und Endosomen (Neufeld et al., 2001) und vermittelt die Cholesterinanreicherung exozytischer Vesikel (Oram, 2002). SR-BI- und ABCA1-vermittelte Cholesterinefflux-Regulierung ist kompetitiv und verläuft wahrscheinlich unabhängig voneinander (Chen et al., 2000). Die Bedeutung von SR-BI und ABCA1 für das ApoE-Recycling in Zusammenhang mit dem Cholesterintransport ist allerdings noch nicht abschließend geklärt.

2.3 Regulation des intrazellulären Stoffwechsels durch Rab-Proteine

Die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase erfordert eine präzise Koordination des vesikulären Transportes. Rab-Proteine sind GTPasen, die durch die Regulierung von Endozytose, Exozytose, Vesikeltransport und Vesikelfusion eine bedeutende Rolle im intrazellulären Stoffwechsel spielen (Schimmöller et al., 1998; Gonzalez und Scheller, 1999; Mohrmann und van der Sluijs, 1999; Zerial und McBride, 2001). Von den etwa 40 beschriebenen Rab-Proteinen konnten 12 im endozytotischen Stoffwechsel von Säugerzellen nachgewiesen werden, von denen acht näher beschrieben wurden (Tab. 1).

Rab	Intrazelluläre Lokalisation	Funktion	Referenzen
Rab4	Frühe und Recycling-Endosomen	Endozytotisches Recycling zur Plasmamembran	(Daro et al., 1996) (Mohrmann und van der Sluijs, 1999)
Rab5	„Clathrin-Coated-Vesicles“ und frühe Endosomen	Endozytotische Aufnahme und Fusion früher Endosomen	(Gorvel et al., 1991) (Bucci et al., 1992)
Rab7	Späte Endosomen	Transport von frühen zu späten Endosomen	(Gorvel et al., 1991) (Feng et al., 1995) (Mukhopadhyay et al., 1997) (Vitelli et al., 1997)
Rab9	Späte Endosomen	Transport von späten Endosomen zum Trans-Golgi-Apparat	(Lombardi, Soldati et al., 1993) (Riederer et al., 1994)
Rab11	Golgi-Apparat und Recycling-Endosomen	Endosomaler Transport aus dem Golgi-Apparat, apikales und basolaterales endozytotisches Recycling	(Urbé et al., 1993) (Ullrich et al., 1996) (Goldenring et al., 1996) (Ren et al., 1998) (Chen et al., 1998) (Duman et al., 1999)
Rab15	Frühe und Recycling-Endosomen	Inhibierung der endozytotischen Aufnahme	(Zuk und Elferink, 1999)
Rab17	Epithel spezifisch; apikale Recycling-Endosomen	Transport durch apikale Recycling-Endosomen	(Hunziker und Peters, 1998) (Zacchi et al., 1998)
Rab18	Epithel spezifisch; Vorkommen im apikalen Bereich des renalen Tubulusepithels und im basolateralen Bereich von intestinalen Epithelzellen	-nicht näher beschrieben-	(Lütcke et al., 1994)
Rab20	Epithel spezifisch; Apikaler Bereich des renalen Tubulusepithels	-nicht näher beschrieben-	(Lütcke et al., 1994)
Rab22	Endosomen und Plasmamembran	-nicht näher beschrieben-	(Olkkonen et al., 1993)
Rab24	Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und späte Endosomen	-nicht näher beschrieben-	(Olkkonen et al., 1993)
Rab25	Epithel spezifisch, apikale Recycling-Endosomen	Transport durch apikale Recycling-Endosomen	(Casanova et al., 1999)

Tab. 1: Endosomale Rab-Proteine (Somsel Rodman und Wandinger-Ness, 2000)

Rab-Proteine scheinen spezifische, wenn auch funktionell sehr unterschiedliche Aufgaben des intrazellulären, vesikulären Transportes wahrzunehmen. So wurden Rab-Protein-Interaktionen mit Proteinkinasen, sowie mit zytoskelettalen Proteinen nachgewiesen (Shirataki et al., 1993; Stenmark et al., 1995; Ren et al., 1996; Sasaki et al., 1997; Echard et al., 1998; Gournier et al., 1998; Simonsen et al., 1998; Christoforidis, Miaczynska et al., 1999; Nielsen et al., 1999; Zeng et al., 1999). Weiterhin können einzelne Rab-Proteine den vesikulären Transport durch eine Vielzahl möglicher Effektorproteine und ihren ständigen Wechsel zwischen GTP-gebundener, aktiver und der inaktiven GDP-Form räumlich und zeitlich koordinieren (Christoforidis, McBride et al., 1999). Durch

Nukleotidaustausch und Hydrolyse gesteuert, bewegen sich Rab-Proteine in ihrer Vesikeltransport-regulierenden Funktion zwischen Zytosol und Zellmembran (Abb. 1).

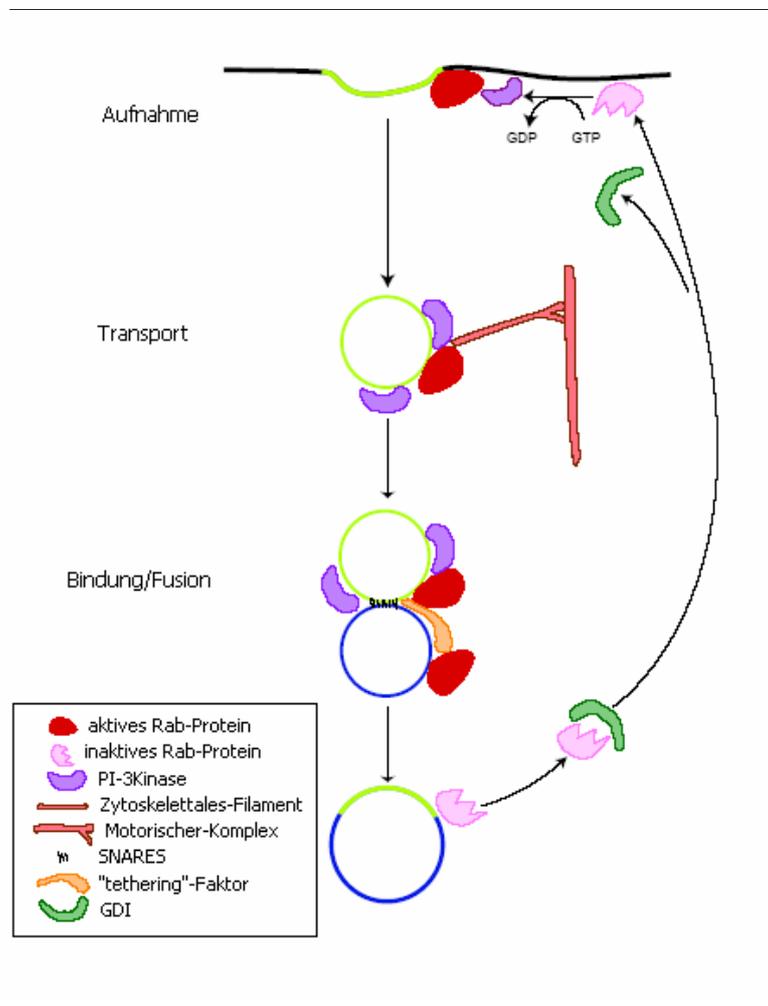


Abb. 1: Regulierung des vesikulären Transportes durch Rab-Proteine (Somsel Rodman und Wandinger-Ness, 2000). Das in der GTP-gebundenen Form aktive Rab-Protein steuert den vesikulären Transport von der Coated-Pit-Entstehung, über zytoskelettalen Transport, bis hin zur Bindung und Fusion mit anderen Organellen. Durch GTP-Hydrolyse inaktivierte Rab-Proteine werden von dem GDI gebunden und können durch Nukleotidaustausch erneut aktiviert werden.

Der Entstehung von Coated-Pits geht eine Rab-Protein-Verlagerung an die Zellmembran und Aktivierung voraus (Soldati et al., 1994). Rab-Proteine binden über ihren hypervariablen, isoprenylierten C-Terminus (Alexandrov et al., 1994) an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, wo sie über spezifische Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) (Horiuchi et al., 1997) mit GTP beladen und so in ihre aktive Form überführt werden. Aktiviertes Rab5 wird für die selektive Aufnahme von Liganden über Coated-Pits und Coated-Vesicles benötigt (McLauchlan et al., 1998). Bei diesem Prozess scheinen Adaptor-Effektor-Molekül-vermittelte Interaktionen zwischen Rab-Protein und dem zu transportierenden Metaboliten eine Rolle zu spielen (Carroll et al., 2001).

Vesikelfusion mit frühen Endosomen und auch die homologe Fusion früher Endosomen sind sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Rab5-abhängig (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992; Barbieri et al., 1996). An der Liganden-Aufnahme in die Zelle und gerichtetem intrazellulären Transport sind das Aktin-Zytoskelett und Mikrotubuli beteiligt (Sheetz, 1999). Aktives Rab5 bindet an Aktin (Kurzchalia et al., 1992; Kato et al., 1996; Ohya et al., 1998) und wird zusammen mit der Lipid-Kinase hVPS34 und Kinesin für den Transport früher Endosomen entlang der Mikrotubuli benötigt (Nielsen et al., 1999). Es wurden Rab-Protein-Bindung an Kinesin (Echard et al., 1998; Nielsen et al., 1999) und ihr regulierender Einfluss auf dieses Transportprotein beschrieben (Nielsen et al., 1999; Hill et al., 2000). Neben Regulierung des Vesikeltransportes über Mikrotubuli wurden für Rab6 Interaktionen mit Rabkinesin 6, einem für die Zytokinese wichtigen Protein, gezeigt (Hill et al., 2000). Nach gerichtetem Transport über das Zytoskelett treten frühe Endosomen mit anderen vesikulären Organellen in Kontakt und fusionieren mit diesen. Auch hier nehmen Rab-Proteine eine koordinierende Funktion ein (Schimmöller et al., 1998; Ungermann et al., 1998; Mohrmann und van der Sluijs, 1999). Rab5 wird an beiden zu fusionierenden Membranen benötigt (Barbieri et al., 1998; Rubino et al., 2000). Bei der homologen Bindung und Fusion früher Endosomen kommt es zur Rab5-induzierten Bildung eines oligomären Komplexes, bestehend aus EEA1, Rabaptin-5, Rabex-5 und NEM-sensitivem Faktor (NSF) (McBride et al., 1999). Das Rab5-Effektorprotein Rabaptin-5 (Stenmark et al., 1995) bindet Rabex-5, einen spezifischen GEF, der den aktivierenden Nukleotidaustausch von Rab5 katalysiert (Horiuchi et al., 1997). Aktiviertes Rab5 bindet vorübergehend die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) hVPS34 und sorgt über die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (PtdIns) zu PtdIns(3)Phosphat für die Entstehung einer EEA1-bindenden Mikrodomäne an der Vesikelmembran (Patki et al., 1997; Christoforidis, McBride et al., 1999). Vesikelbindung und für die Vesikelfusion vorausgesetzte „Target-SNAP-Receptor“ (t-SNARE)-Integration in den oligomären Komplex sind EEA1-vermittelt (McBride et al., 1999). EEA1 hat zwei PtdIns(3)Phosphat-bindende Zink-Finger mit FYVE-Motiv und zwei Rab5-bindende Domänen an seinem Amino- bzw. Carboxy-Ende, die als Brücken zwischen den Membranen dienen (Simonsen et al., 1998). Diese Oligomerisation unter Stabilisierung durch NSF führt zur Entstehung von sogenannten Rab5-Domänen, spezialisierten Funktionseinheiten an der Vesikelmembran (McBride et al., 1999; Roberts et al., 1999; Sönnichsen et al., 2000). Der Rab5-gesteuerten Fusion früher Endosomen steht die fusionshemmende Wirkung von Rab4 gegenüber (Chavrier et al., 1997). Rab4 und Rab5 scheinen durch ihre gegenläufigen Auswirkungen Exo- und Endozytose der frühen Endosomen zu koordinieren

(Mohrmann und van der Sluijs, 1999). Rab4 vermittelt sowohl einen direkten Weg des Rezeptor-Recyclings aus frühen Endosomen zur Plasmamembran (Daro et al., 1996) als auch über Recycling-Endosomen (Mohrmann und van der Sluijs, 1999). Ebenfalls in Recycling-Endosomen lokalisiert wurden Rab11 und Rab25. Rab11 reguliert den Rücktransport von Recycling-Endosomen zur Plasmamembran (Calhoun et al., 1998; Duman et al., 1999; Wilcke et al., 2000) und Vesikeltransport aus dem Golgi-Apparat (Urbé et al., 1993; Jedd et al., 1997; Chen et al., 1998). Aktiviertes Rab25 scheint Recycling-Endosomen-abhängigen Rücktransport zur Zellmembran zu vermindern (Casanova et al., 1999) und unterscheidet sich somit in seiner inhibitorischen Wirkung von den sonst überwiegend stimulierend wirkenden Rab-Proteinen. In frühe Endosomen aufgenommene, zur Degradation bestimmte Stoffe werden über späte Endosomen zu Lysosomen transportiert. Der Transport von frühen zu späten Endosomen ist Rab7-abhängig (Feng et al., 1995; Mukhopadhyay et al., 1997; Bucci et al., 2000) und kann nur unter Anwesenheit von Dynein stattfinden (Aniento et al., 1993). Es wird daher auch für Rab7 eine Interaktion mit dem Zytoskelett vermutet. Rab9 kontrolliert den Mikrotubuli- und Dynein-abhängigen Transport zwischen späten Endosomen und dem Golgi-Apparat (Lombardi, Soldati et al., 1993; Riederer et al., 1994; Mallet und Maxfield, 1999). Steuernde Rab-Proteine werden auch für den Transport zwischen späten Endosomen und Lysosomen, sowie bei homologer Lysosomenfusion vermutet, wurden jedoch noch nicht näher beschrieben. Bei der Transzytose von polymerischem Immunglobulin A (IgA) konnte erstmals eine direkte Interaktion zwischen einer Rab-GTPase und einem Transportmolekül nachgewiesen werden (van IJendoorn et al., 2002). An das IgA-Transportmolekül pIgR gebundenes Rab3b verhindert in seiner aktiven Form die Exozytose pIgR-angereicherter Vesikel und ist somit ein weiteres Beispiel inhibitorischer Wirkung aktivierter Rab-Proteine im exozytotischen Stoffwechsel. Ein anderes Beispiel für ein Rezeptormolekül mit gleichzeitiger Rab-Effektorprotein-Eigenschaft ist der Angiotensin-II-Typ-1A-Rezeptor (AT_{1A}R) mit Rab5a-Interaktion (Seachrist et al., 2002). Aktiviertes Rab5a zeigt positiv regulierende Wirkung auf den intrazellulären AT_{1A}R-Transport. Die Anwesenheit von Angiotensin II erhöht weiterhin AT_{1A}R-Rab5a-Assoziation, Rab5a-Expression sowie Rab5a-Aktivierung durch GTP-Beladung (Seachrist et al., 2002). Nach Koordinierung von Vesikeltransport und Membranfusion werden Rab-Proteine durch GTP-Hydrolyse inaktiviert. Hierbei interagieren sie mit sogenannten GTPase-aktivierenden Faktoren (GAPs), die die Nukleotidspaltung stimulieren. Der spezifisch Rab5-inaktivierende GAP Tuberin (Xiao et al., 1997) interagiert auch mit Rabaptin-5 α , einem Rab5-Effektorprotein (Horiuchi et al., 1997; Xiao et al., 1997). Dies verdeutlicht eine

übergreifende Koordination von Rab-Protein-Aktivierung/-Inaktivierung und Effektorprotein-Bindung. Überexpression eines weiteren Rab5-GAP, RN-Tre, führt zu verminderter Rab5-Aktivität und verhindert Rezeptor-Internalisierung (Lanzetti et al., 2000). Durch GTP-Hydrolyse inaktivierte Rab-Proteine werden von dem Rab-GDP-Dissoziations-Inhibitor (GDI) (Pfeffer et al., 1995; Wu et al., 1996) gebunden. Die Rab-Protein-GDI-Komplexe wandern im Sinne eines Rab-Protein-Recyclings zur Zellmembran, wo GDI mit Hilfe eines „Displacement-Factors“ (Dirac-Svejstrup et al., 1997) abdissoziiert und so erneute Rab-Protein-Bindung an die Zellmembran und GEF-vermittelte Aktivierung durch Nukleotidaustausch ermöglicht.

2.3.1 Rab-Proteine und Cholesterinhomöostase

Die Mechanismen der zellulären Cholesterinhomöostase sind von der Cholesterin-Aufnahme über den LDL-R bis hin zur Regulierung von Synthese, Veresterung und Rezeptorexpression beschrieben worden (Brown und Goldstein, 1986; Brown und Goldstein, 1999; Simons und Ikonen, 2000). Rab-Proteine kontrollieren intrazelluläre Stoffwechselwege auf vesikulärer Ebene (s.o.) und sind somit auch an der Regulierung intrazellulären Cholesterintransportes und der Cholesterinhomöostase beteiligt (Hölttä-Vuori et al., 2002). Während LDL-Cholesterin nach rezeptorvermittelter Endozytose zum größten Teil lysosomal abgebaut wird, wurde für TRL-Cholesterin ein durch HDL₃ induziertes Recycling über periphere Recycling-Kompartimente beschrieben, die nicht mit dem perinukleären Tf-Recycling-Kompartiment identisch sind (Heeren et al., 2003). DiI-LDL-Cholesterin kolokalisierte bei Rab5-Überexpression zusammen mit dem LDL-R in Rab5-positiven Organellen und Rab11-Überexpression führte zu LDL-Cholesterin-Akkumulation in perinukleären Recycling-Endosomen (Hölttä-Vuori et al., 2002). Da das in den Recycling-Endosomen akkumulierte Cholesterin jedoch nicht direkt von dem DiI-LDL-Cholesterin abstammte, wurde auch für LDL-Cholesterin ein von dem klassischen „LDL-Stoffwechselweg“ abweichender Cholesterin-Transportweg angenommen. Der Einfluss spezifischer Rab-Proteine auf den von ihnen kontrollierten vesikulären Transportweg kann durch Rab-Protein-Überexpression verdeutlicht werden. Hierzu eignet sich der Einsatz dominanter Formen von Rab-Proteinen, wie Rab5Q79L. In der Rab5Q79L-DNA liegt eine Punktmutation vor, die zu der stark reduzierten GTPase-Funktion von Rab5Q79L führt. Es liegt bei Überexpression dieser Mutante somit immer die GTP-gebundene, aktive Form von Rab5 vor. Überexpression von Rab5Q79L in COS-1-Zellen führte zu massiv vergrößerten frühen Endosomen (Stenmark et al., 1994) und inhibiertem Cholesterin-

Recycling zur Plasmamembran (Hölttä-Vuori et al., 2002). Rab5 reguliert den frühen endozytotischen Stoffwechselweg (Gorvel et al., 1991); so war auch bei Rab5-Effektorprotein-überexprimierenden Zellen (De Renzis et al., 2002) und bei Hemmung von Rab5-Effektorproteinen (van Dam und Stoorvogel, 2002) ein gestörter Transport aus frühen Endosomen zu erkennen. Rab6-Überexpression hingegen hatte einen gesteigerten Cholesterintransport aus dem Golgi-Apparat in das Endoplasmatische Retikulum zur Folge (Hölttä-Vuori et al., 2002). Von diesem Rab-Protein ist bekannt, dass es den retrograden Transport zwischen Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum kontrolliert (White et al., 1999). Auch die von Rab11 regulierten Recycling-Endosomen (Ullrich et al., 1996; Ren et al., 1998; Wilcke et al., 2000) sind für die zelluläre Cholesterinhomöostase von Bedeutung. Recycling-Endosomen sind cholesterinreich (Gagescu et al., 2000; Hao und Maxfield, 2000) und ihre Membranen weisen eine hohe Affinität für Cholesterin auf (Hao et al., 2001). Rab11-Überexpression in COS-1-Zellen führte, nach LDL-Cholesterin-Inkubation, zu Cholesterin-Akkumulation in perinukleären Recycling-Endosomen und Cholesterin-Recycling zur Plasmamembran war blockiert (Hölttä-Vuori et al., 2002). Die durch Rab11-Überexpression induzierten Veränderungen in der Cholesterinhomöostase schienen zum Großteil unabhängig von der LDL-Aufnahme zu sein; sie waren vielmehr Zeichen eines gestörten Cholesterin-Recyclings. Auch Eingriffe in die Feinregulation des Rab-gesteuerten Vesikeltransportes können die intrazelluläre Cholesterinhomöostase beeinflussen. So führte die Mikroinjektion des Rab-GDI (s.o.) zu einer Hemmung des Cholesterintransportes aus späten Endosomen und Lysosomen (Hölttä-Vuori et al., 2000).

2.4 Inhibitoren des intrazellulären Transportes

Endozytierte Membranproteine und ihre Liganden werden nach Aufnahme in die Zelle über Coated-Vesicles zunächst in frühe Endosomen aufgenommen. Von hier aus führt der weitere Transportweg zu späten Endosomen, Lysosomen, Trans-Golgi oder zurück zur Plasmamembran (Marsh und McMahon, 1999).

Bei der Beschreibung intrazellulärer Recyclingstoffwechselwege gelang anhand des TfR-Recyclingweges die Identifizierung des sogenannten perinukleären Transferrin-Recycling-Kompartimentes (Yamashiro et al., 1984; Tooze und Hollinshead, 1991). Der Transport zwischen den perinukleären Recycling-Endosomen und der Plasmamembran findet über eine Dynamin-abhängige Vesikelabschnürung aus den Recycling-Endosomen statt (van Dam und Stoorvogel, 2002). Brefeldin A (BFA) hemmt diese Dynamin-abhängige „Clathrin-Coated-Vesicle“-Abschnürung aus Recycling-Endosomen und vermindert Tf-

Recycling zur Plasmamembran (Stoorvogel et al., 1996; van Dam und Stoorvogel, 2002). Ein signifikanter Anteil des Tf recycelt jedoch auch direkt über frühe Endosomen zur Plasmamembran (Hopkins et al., 1994; Gruenberg und Maxfield, 1995; Sheff, Pelletier et al., 2002). PI-3-Kinasen steuern über die Phosphorylierung von PtdIns, das in der Zellmembran eukaryotischer Zellen gelegen ist, eine Vielzahl zellulärer Funktionen (Fruman et al., 1998; Simonsen et al., 2001). Sie nehmen so Einfluss auf Zellwachstum, Glukosetransport, zytoskelettale Organisation und Vesikeltransport. LY294002 und Wortmannin sind Substanzen, die über eine Hemmung der PI-3-Kinase in diesen Regelmechanismus eingreifen (Abb. 2).

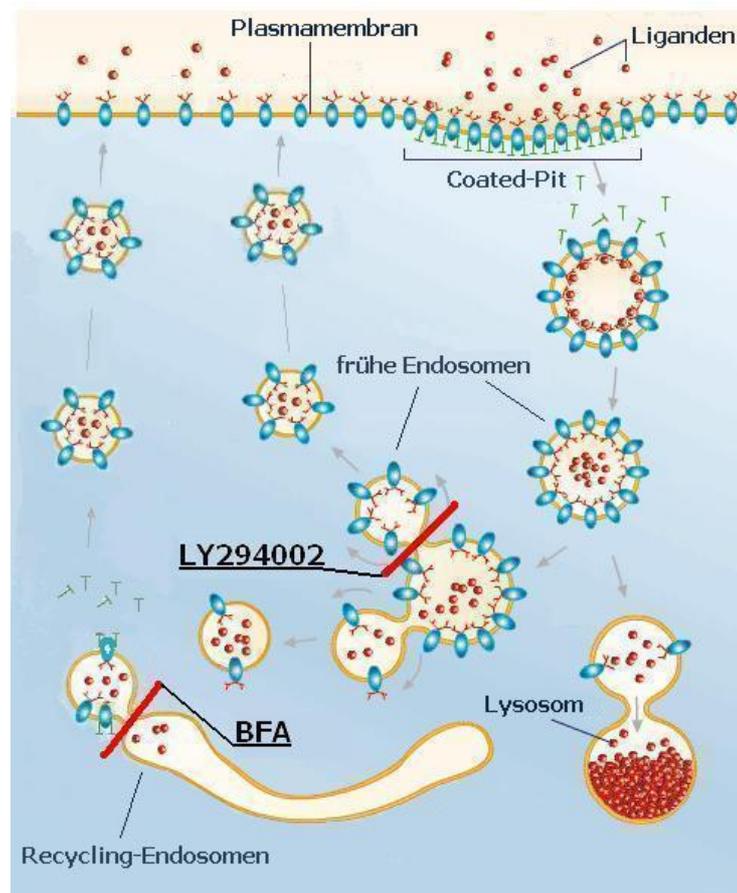


Abb. 2: LY294002 und BFA sind Inhibitoren intrazellulärer Recyclingwege. Nach der Endozytose über „Clathrin-Coated-Pits“ und Aufnahme in frühe Endosomen werden Liganden entweder in Lysosomen degradiert oder intrazellulären Recyclingwegen zugeführt. Aufgenommene Liganden können über Recycling-Endosomen zurück zur Plasmamembran transportiert werden. Recycling kann aber auch direkt aus frühen Endosomen stattfinden. LY294002 und Wortmannin hemmen die PI-3-Kinase und somit auch das von diesem Enzym abhängige Recycling aus frühen Endosomen. BFA hingegen hemmt die Dynamin-abhängige „Clathrin-Coated-Vesicle“-Abschnürung aus Recycling-Endosomen und blockiert so das Recycling aus diesem Kompartiment.

Der Einsatz dieser Inhibitoren führt zu reduziertem Tf-Recycling zur Plasmamembran und einer verminderten Fusion früher Endosomen (Li et al., 1995; Martys et al., 1996; Shpetner et al., 1996; Spiro et al., 1996). Wortmannin hemmt konzentrationsabhängig auch andere Kinasen und ist somit verglichen mit LY294002 weniger spezifisch für die PI-3-Kinase (Nakanishi et al., 1992; Meyers und Cantley, 1997). Weitere Eigenschaften von LY294002 sind, dass es in wässriger Lösung stabil ist und im Gegensatz zu Wortmannin keine irreversible Hemmung der PI-3-Kinase verursacht (Vlahos et al., 1994). Die verminderte Recyclingaktivität bei Einsatz von LY294002 scheint vor allem an der Blockade eines schnellen Recyclingweges aus frühen Endosomen zu liegen, während Recycling aus perinukleären Recycling-Endosomen nicht beeinflusst wird (Hunyady et al., 2002; van Dam und Stoorvogel, 2002). Hierbei ist von Bedeutung, dass die durch LY294002 gehemmte PI-3-Kinase ein Rab-Effektorprotein ist (Li et al., 1995), das über eine Interaktion mit Rab-Proteinen zu der Entstehung EEA1-bindender Mikrodomänen an der Vesikelmembran führt (s.o.) und so die Voraussetzung für den Vesikeltransport schafft. Der Einsatz von PI-3-Kinase-Inhibitoren kann aber auch über eine verminderte Aktivität GTPase-aktivierender Proteine, wie p120Ras, zu einem vermehrten Rab5-GTP-Vorkommen führen und bewirkt somit unter Umständen sogar eine verstärkte Vesikelfusion (Simonsen et al., 1998; Bright et al., 2001; Chen und Wang, 2001; Futter et al., 2001; Lawe et al., 2002). Auch HDL₃- und ApoE-induzierter Cholesterinefflux scheint hauptsächlich über periphere Recycling-Kompartimente stattzufinden, die sich von dem perinukleären TfR-Recycling-Kompartiment unterscheiden (Enrich et al., 1999; Heeren et al., 1999). Für das Tf-Recycling ergab sich bei Einsatz beider Inhibitoren - LY294002 und BFA – ein synergistischer Effekt. Durch die Blockade beider Recyclingwege wurde das Tf-Recycling entsprechend stärker vermindert als bei Einsatz nur eines Inhibitors des vesikulären Transportes (van Dam et al., 2002).

2.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollen die an dem HDL-induzierten Recycling von ApoE und dem Cholesterinefflux beteiligten endosomalen Kompartimente identifiziert werden.

Die Fragestellung soll mit verschiedenen Ansätzen mit im Labor bereits etablierten zellbiologischen Methoden bearbeitet werden. Bei diesen experimentellen Ansätzen werden zunächst triglyzeridreiche Chylomikronen aus dem Plasma von Patienten mit einer Hyperchylomikronämie mit Hilfe der Ultrazentrifugation isoliert und je nach Versuchsaufbau radioaktiv markiert. Weiterhin sollen LDL über Dichtegradientenzentrifugation aus dem Plasma gesunder Spender gewonnen und ebenfalls radioaktiv markiert werden. Im ersten Ansatz werden dann humane Hepatomazellen mit radioaktivem Cholesterin markiert und mit ApoE-enthaltenden Chylomikronen und HDL₃ inkubiert. Um den endosomalen Transport zu blockieren, sollen diese Pulse-Chase-Experimente mit spezifischen Inhibitoren (LY290004, BFA) des intrazellulären Membranverkehrs durchgeführt werden. Im Anschluss soll dann die Radioaktivität im Zellkulturüberstand und im Zellysate bestimmt werden. Im zweiten Ansatz werden Hepatomazellen genutzt, die die endosomalen Proteine Rab4 und Rab5 überexprimieren. Diese Proteine regulieren die Aufnahme und das Recycling von Endosomen. Mit diesen Zellen soll mit Pulse-Chase-Experimenten das HDL-induzierte Recycling und der Cholesterinefflux direkt im Zellkulturüberstand quantifiziert werden. Im dritten Ansatz sollen die an dem HDL-induzierten Cholesterinefflux beteiligten Strukturen direkt mittels konfokaler Mikroskopie sichtbar gemacht und auf Kollokalisierung untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

- Brutschrank (Binder)
- Zellkultur Werkbank „Hera Safe“ (Heraeus)
- Wärmebad GFL 1083
- Absaugpumpe Zellkultur
- Tischabsaugpumpe „ECOM-P 4153“ (Eppendorf)
- Neubauer Zählkammer
- Lichtmikroskop „Axiovert 25“ (Zeiss)
- Schüttler „Celloshaker Variospeed“ (Chemistron)
- Ultrazentrifuge „L7-55“ mit „Swing out Rotor SW 41“ und passenden Zentrifugationsröhrchen (Beckman)
- β -Counter „1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter“ (LKB Wallac)
- Photometer „Smart Spec 3000“ (Bio-Rad)
- Schüttler GFL 3020
- Laborzentrifuge „1-15K“ (Sigma)
- Laborzentrifuge „3200“ (Eppendorf)
- Elektrophoresekammer „Mini Sub Cell GT“ (Bio-Rad)
- UV-Kamera „Gel Doc 1000“ (Bio-Rad)
- Bio Photometer (Eppendorf)
- Mikroskop „Axiovert 100“ mit Fluoreszenzeinrichtung, Objektiv „Ph 3 Plan-Apochromat“ 63x1,40 Öl, Kamera „Axio Cam“, Software „Axio Vision Viewer“ (Zeiss)
- Konfokales Mikroskop „Axiovert 200M“ (Zeiss)
- Thermomixer „Compact“ (Eppendorf)
- Vortexer „Reax 1 DR“ (Heidolph)

3.2 Verbrauchsmittel

Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc und Falcon bezogen. Objektträger, 13 mm Deckgläschen, Coverslips und Pinzetten waren von der Firma Roth. Sterilfilter der Porengröße 0.45 μm lieferte die Firma Sarstedt. Dialyseschläuche mit der Porengröße 0.45 μm waren von Serva und die benutzten PD-10 Gelchromatographiesäulen Sepadex G25 von der Firma Amersham Biosciences. Parafilm

und alle Plastikwaren zur Inkubation waren von der Firma Wilke und Witzel, Hamburg. β -Counter Röhren lieferte die Firma Packard BioScience .

3.3 Chemikalien

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

3.4 Zellkultur

a) Material

- Humane Hepatomazellen HUH7 (UKE, Hamburg)
- Nährmedium
 - ⇒ Dulbecco´s Modified Eagle Medium mit Glutamax I (DMEM von Gibco)
 - ⇒ 10% Fötale Kälber-Serum (Gibco)
 - ⇒ 1% Penicillin Streptomycin (Gibco)
- PBS (Phosphate Buffered Saline von Gibco)
 - ⇒ 2.7 mM KCL, 1.5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4
- Trypsin-/EDTA-Lösung (Gibco)
- 10x Tryptanblaulösung (Gibco)
- Zellkulturflaschen T 75 (Nunc)
- DMSO (Sigma)

b) Methode

Alle Zellkulturarbeiten wurden zur Vermeidung mikrobieller Kontamination an einer speziellen Werkbank (Hood) mit sterilen Instrumenten durchgeführt.

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C in 2 ml Kryo-Röhren aufbewahrt. Bei Bedarf wurden eingefrorene Zellen der gewünschten Linie für 1 Minute bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut, in 10 ml frisches Nährmedium gegeben, auf zwei Zellkulturflaschen verteilt und durch weitere 8 ml Nährmedium ergänzt. Das Schwenken der Zellkulturflasche sollte eine gleichmäßige Verteilung der Zellen bewirken. Zur Lagerung in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Flaschen zur Sicherstellung einer ausreichenden Ventilation leicht geöffnet. Am ersten Tag nach dem Auftauen wurde jeweils ein Mediumwechsel durchgeführt. Mit einer ausreichenden

Konfluenz des Zellrasen-Monolayers konnte frühestens nach 48 Stunden gerechnet werden.

Bei Erreichen einer Konfluenz der Zellen wurden diese mittels Trypsinierung auf weitere Zellkulturflaschen verteilt oder zur Durchführung von Versuchen in definierter Zellzahl ausgesetzt. Hierzu wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt und die Zellen dann mit 10 ml PBS gewaschen. Auf den Zellrasen wurden dann 4 ml einer 1% Trypsinlösung gegeben und bei 37°C für 3 Minuten inkubiert. Das Beklopfen des Flaschenbodens in Kombination mit der Trypsinierung bewirkte ein Ablösen des Zellrasens von der Kunststoffoberfläche sowie die Lösung intrazellulärer Adhärenzen, was durch lichtmikroskopische Kontrolle bestätigt wurde. Um das Trypsin zu inhibieren, wurden die Zellen nun in ein 15 ml Röhrchen mit 6 ml vorgelegtem Medium gegeben. Aus diesem konnte nun Zelllösung zur Bestückung neuer Zellkulturflaschen entnommen oder die Zellzahl bestimmt werden.

Das Bestimmen der Zellzahl diente der Herstellung von Zelllösungen definierter Konzentration. Es wurden 50 µl der Zelllösung mit 50 µl Tryptanblau angefärbt und dann in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Die Tryptanblaufärbung ermöglicht das selektive Zählen lebender Zellen. Die errechnete Zellzahl in Zellen pro ml wird nach einer Formel errechnet (Mittelwert der Zellzahl der 4 Großquadrate x Verdünnung x 10⁴) und ermöglicht das Herstellen von Versuchsansätzen definierter Zelldichte.

3.5 Proteinbestimmung

a) Material

- Probe: 100 µl Zelllysat, gelöst in 0.1 N NaOH
- Albumin Standardreihe (Pierce):
 - 1) 0.0625 mg/ml
 - 2) 0.125 mg/ml
 - 3) 0.250 mg/ml
 - 4) 0.500 mg/ml
 - 5) 1.000 mg/ml
 - 6) 2.000 mg/mlin 0.1 N NaOH
- NaOH 0.1 N (Merck)
- Lösung A:
 - ⇒ 2% Na₂CO₃
 - ⇒ 0.02% Natriumkaliumtartrat

- ⇒ in 0.1M NaOH
- Lösung B:
 - ⇒ 0.5% CuSO₄
 - ⇒ 5% SDS
 - ⇒ mit H₂O
- Lösung C: Lösung A+B im Verhältnis 49:1
- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck)
- Testtubes (Nunc)

b) Methode

Die Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951) beruht auf der Bildung von blaugefärbten Komplexen zwischen Kupfertartrat und der Peptidbindung sowie zwischen Folin-Reagenz und Tyrosyl-Tryptophanylresten, die bis zu 2 Stunden stabil bleiben und photometrisch bei 750 nm quantifiziert werden können. Um den Proteingehalt der Testlösung zu ermitteln, werden die Absorptionswerte einer Standardproteinreihe bekannter Konzentration bei 750 nm herangezogen.

Es wurden der Leerwert und die Standardreihe in Doppelmessungen bestimmt, die zu messenden Proben in einfacher Messung. In die zur Leerwertmessung vorgesehenen Testtubes wurden zunächst 100 µl NaOH pipettiert. Die Standardreihe wurde jeweils aus 80 µl NaOH mit 20 µl Standardprotein hergestellt. Anschließend wurde 1 ml Lösung C (Lsg.A:Lsg.B= 49:1) den Testtubes der Leerwertbestimmung, der Standardreihe und den die 100 µl Zelllysate enthaltenden Testtubes der zu messenden Proben hinzugegeben. Es folgte die 10minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 10 µl eines Gemisches aus Folin und destilliertem Wasser (1:1) jeweils Leerwert, Standardreihe und Proben zugegeben, die Testtubes gevortext und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Durch die entstehende Blaufärbung konnte dann abschließend die Proteinkonzentration der Proben photometrisch bestimmt werden. Bei 760 nm Wellenlänge des eingesetzten Lichtes sind die gemessenen Extinktionswerte der Proteinkonzentration proportional. Mit Hilfe der Standardkurve konnten so die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt werden.

3.6 Cholesterinefflux in Abhängigkeit von Rab4 und Rab5

3.6.1 DNA-Präparation

a) Material

- Vektoren
 - ⇒ pCMV: B5 Rab4a
 - ⇒ pFROG: B3 Rab5Q79L-myc
 - ⇒ pFROG: B2 Rab5-myc
- Restriktionsenzyme
 - ⇒ HindIII (BioLabs)
 - ⇒ EcoRI (BioLabs)
- Restriktionspuffer: Neb2 (BioLabs)
- Gelelektrophorese-Marker „1KB DNA Ladder“ (Invitrogen)
- 6fach Puffer (6xpp) (MBI Fermentas)
- Agarosegel (zwei mal 15 Kamm)
 - ⇒ 60 ml Agarose (Gibco)
 - ⇒ 3 µl Ethidiumbromid (Sigma)
- NucleoSpin® Plasmid der Firma Machery-Nagel
 - ⇒ Cat.No.: 740588.250
 - ⇒ Batch: 202/125

b) Methode

E-coli-Bakterien wurden mit den o.g. Vektoren transformiert und auf Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen. Nach Heranwachsen der Bakterienkolonien wurden diese markiert, mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, in 2 ml Nährmedium gegeben und über Nacht im Wärmerraum bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die DNA-Präparation wurde nun nach Vorschrift des DNA-Präparationskit „NucleoSpin® Plasmid“ der Firma MACHEREY-NAGEL durchgeführt. Zur Überprüfung des Präparationserfolges wurde mit jeweils 5 µl Plasmid-DNA, 2 µl Restriktionspuffer und den entsprechenden Restriktionsenzymen ein Restriktionsverdau für drei Stunden bei 37°C durchgeführt. Die Restriktionsenzyme für die Rab5- und Rab5Q79L-DNA enthaltenden Plasmide waren pro Ansatz je 1 µl HindIII und 1 µl EcoRI. Die Rab4a-Plasmide wurden pro Ansatz mit 2 µl EcoRI geschnitten. Der Verdau wurde dann nach Hinzugabe von 6xPuffer gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit der UV Kamera sichtbar gemacht und das Bandenmuster anhand des mitgelaufenen Markers interpretiert. Mit 1 µl DNA pro Probe wurde dann nach 1:99 Verdünnung mit destilliertem

Wasser die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (Bio Photometer, Eppendorf) und die Proben bei -20°C gelagert.

3.6.2 Transfektionsvektoren / Restriktionsverdau

Durch den Einsatz spezifischer Vektoren konnte - wie oben beschrieben - Rab4a-, Rab5- und Rab5GTP-DNA präpariert werden, die dann der Transfektion von HUH7-Zellen diente. Zu diesem Zweck wurden die von Prof. Jentsch (ZMNH, Hamburg) zur Verfügung gestellten Vektoren benutzt und die Plasmid-DNA präpariert. Zur Überprüfung des Präparationserfolges wurde jeweils eine Probe der präparierten Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen (Tab. 2) geschnitten und die spezifischen Bandenmuster in der Gelelektrophorese (Abb. 3) analysiert.

	Vektoren	Restriktionsenzyme
Rab5	Hum rab5-myc pFROG	HinDIII / EcoRI
Rab5Q79L	Hum rab5Q79L- myc pFROG	HinDIII / EcoRI
Rab4a	pCMV rab4a	EcoRI

Tab. 2: Eingesetzte Transfektionsvektoren und Restriktionsenzyme

Zur Überprüfung des DNA-Präparationserfolges erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der mit Restriktionsenzymen behandelten Plasmid-DNA (Abb. 3).

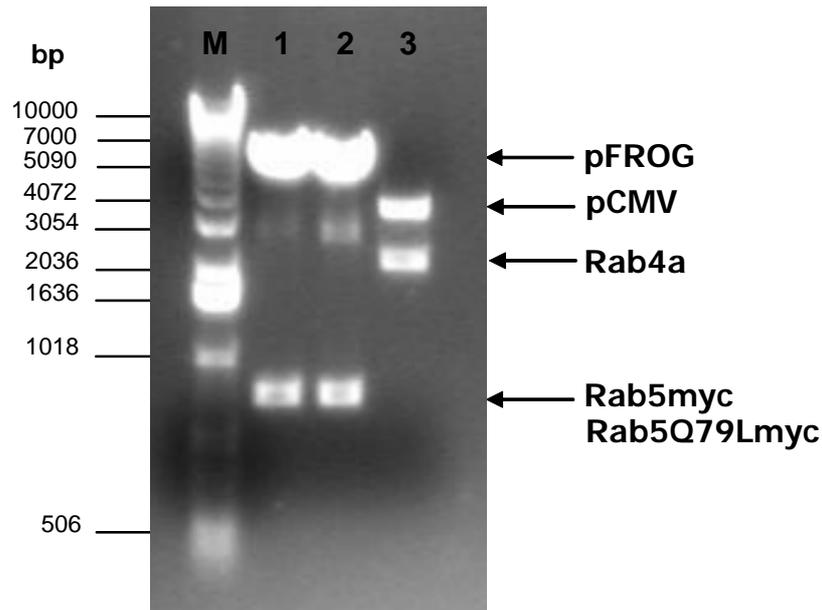


Abb. 3: Gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmid-DNA. Der Marker (M) weist ein spezifisches Bandenmuster definierter Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp) auf. Dies ermöglicht die Größenanalyse der von den Restriktionsenzymen (Tab. 2) spezifisch geschnittenen Plasmid-DNA. Die so aus der Plasmid-DNA (Tab. 2) herausgetrennten Rab5 (1)-, Rab5Q79L (2)- und Rab4a (3)-DNA-Fragmente ordnen sich in Banden definierter Größe an und zeigen damit den Präparationserfolg. Die übrigen Banden entsprechen den mitgewanderten Vektoren. Fragmentgrößen: Rab5/Rab5Q79L=1000bp, pFROG=5720bp; Rab4a=2640bp, pCMV=3540bp.

3.6.3 Transfektion von HUH7-Zellen

a) Material

- HUH7-Zellen, Wildtyp
- Plasmid DNA
 - ⇒ GFP: 1.7 µg/µl (Kontrollvektor)
 - ⇒ Rab5 (B2): 0.43 µg/µl
 - ⇒ Rab5Q79L (B3): 0.41 µg/µl
 - ⇒ Rab4a (B5): 0.19 µg/µl
- DMEM with Glutamax I (Gibco)
- FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche)

b) Methode

Die in definierter Zellzahl (siehe 3.4) ausgesäten und in 24 Stunden bis zur Subkonfluenz gewachsenen HUH7-Zellen wurden nach erfolgtem Mediumwechsel gemäß den Transfektionsvorschriften der Firma Roche (Molecular Biochemicals; 9115 Hague Road;

PO Box 50414; Indianapolis, IN 46250-0414) mit FuGENE 6 Transfection Reagent (Cat.No.1 814 443; Version 5, September 2000) transfiziert. Es wurde je nach Versuchsansatz im Verhältnis 1 µg DNA zu 3 µl FuGENE oder 2 µg DNA zu 6 µl Fugene transfiziert. Bis zum Beginn des angestrebten Versuches wurde ein Zeitintervall von 24 Stunden eingehalten.

3.7 Isolierung von Liganden und radioaktive Markierung

3.7.1 Isolierung von Chylomikronen

a) Material

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

b) Methode

Die Chylomikronen wurden aus dem Plasma von Patienten mit Hypertriglyzeridämie Typ-I isoliert. Der erheblichen Akkumulation von Chylomikronen bei diesen Patienten liegt das kongenitale Fehlen des ApoC-II mit einhergehender Verminderung der LPL-Aktivität zugrunde. Das Plasma wurde für 60 Minuten bei 4°C in einem Swing-out-Rotor (SW 41, Beckman) ultrazentrifugiert. Die geringe Dichte der Chylomikronen führt nach der Zentrifugation zu einer Akkumulation am oberen Rand des Zentrifugationsröhrchens. Nach Resuspension dieser obersten Schicht in 3 ml PBS wurde die Lösung mit Sucrose beschwert, unter PBS geschichtet und drei weitere Male ultrazentrifugiert. Vor der Aufbewahrung bei 4°C wurden die so gereinigten Chylomikronen mit PIC und Na-Azid versetzt.

3.7.2 Isolierung von LDL und HDL

a) Material

- Plasma einer Normalperson
- 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 (Calbiochem) (s.o.)
- Na-Azid (Sigma)

b) Methode

Plasma gesunder Spender wurde, um die Lipoproteine vom Plasma zu trennen, mit Kaliumbromid (KBr) auf eine Dichte von 1.21 g/ml eingestellt und dann über Nacht in einem Swing-out-Rotor bei 38.000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Lipoproteine wurden anschließend abgenommen und unter einen Dichtegradienten geschichtet. Der Dichtegradient bestand aus Lösungen abnehmender Dichte (1.063 g/ml, 1.019 g/ml, 1.006 g/ml), wobei die Schichtung mit der Lösung geringster Dichte begann, welche dann jeweils durch die nächste Lösung höherer Dichte unterschichtet wurde. Als letztes wurde die Probe ($\delta=1.21$ g/ml) unterschichtet und der Dichtegradient dann über Nacht bei 38.000rpm und 4°C in einem Swing-Out-Rotor (SW41 Beckman) zentrifugiert. HDL und LDL konnten dann jeweils aus dem Bereich ihrer spezifischen Dichte (HDL=1.063 g/ml; LDL=1.019 g/ml) abgenommen und durch Über-Nacht-Dialyse in PBS von KBr-Rückständen gereinigt werden. Nach Sterilfiltration wurden die Proben mit PIC und Na-Azid versetzt, um dann bei 4°C gelagert zu werden.

3.7.3 ³H-Cholesterin-Markierung von LDL und Chylomikronen

a) Material

- [1 α , 2 α (n)-³H]-Cholesterol (Amersham)
- LDL
- Chylomikronen
- DMEM with Glutamax I (Gibco) mit 2% BSA (Sigma)
- PBS (Gibco)
- 1 mM EDTA PBS (Gibco)

- PD-10-Säule Sepadex G25 (Pharmacia)
- Stickstoff-N₂ (Linde)

b) Methode

Um die Stoffwechselwege von Cholesterin verfolgen zu können, wurde mit Tritium (³H) - dem radioaktiven Isotop des Wasserstoffs - markiertes Cholesterin eingesetzt. Für den Transport des so markierten Cholesterins in die Zelle wurden LDL und Chylomikronen benutzt, welche mit dem ³H-Cholesterin versetzt wurden:

100 µl der ³H-Cholesterin-Ursprungslösung wurden in ein Eppendorf-Tube pipettiert und dann unter der Abzugshaube für 5 Minuten mit Stickstoff abgedampft, um das Lösemittel aus der ³H-Cholesterin-Lösung zu eliminieren. Das sich nun an der Innenwand des Eppendorf Tube befindende radioaktive Cholesterin wurde dann mit 100 µl DMEM 2% BSA und 400 µl 1mM EDTA PBS gelöst, gevortext und kurz zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 500 µl LDL bzw. Chylomikronen hinzugegeben und die Lösung dann bei 30°C und 300rpm über Nacht im Thermomixer belassen. Zur Elimination des nicht in LDL oder Chylomikronen integrierten ³H-Cholesterins wurde die Lösung über eine vorher dreimal mit PBS gespülte PD-10-Säule gewaschen. Hierzu wurde zunächst 1 ml der radioaktiven Lösung auf die Säule gegeben, dann mit 1.8 ml PBS nachgespült und die nun durch die Säule gewanderte ³H-Cholesterin-LDL- bzw. Chylomikronen-Lösung mit 1.5 ml PBS eluiert und in einem Kryo-Röhrchen aufgefangen. Vor Lagerung bei -20°C in einem entsprechend gekennzeichneten Behälter wurde noch die Aktivität der ³H-LDL- bzw. Chylomikronen-Lösung bestimmt. 10 µl Probe, 500 µl PBS und 7 ml Szintillationsflüssigkeit wurden in ein β-Counter-Röhrchen pipettiert und die Aktivität im β-Counter in „counts per minute“ (cpm) gemessen.

3.8 Pulse-Chase-Experimente

a) Material

- Humane Hepatomazellen HUH7 (UKE, Hamburg)
 - ⇒ Wildtyp
 - ⇒ GFP-Kontrolle
 - ⇒ Rab5-myc (Vektor pFROG)
 - ⇒ Rab5Q79L-myc (RAB5GTP) (Vektor pFROG)
 - ⇒ Rab4a (Vektor pCMV)

- Nährmedien
 - ⇒ Lipoprotein-Defizientes-Medium: DMEM mit Glutamax (Gibco), 50% Lipoprotein-Defizientes-Serum (LPDS), 1% Penicillin Streptomycin (Gibco)
 - ⇒ DMEM mit 2% Bovinem Serum-Albumin (BSA Fraktion V von Sigma)
 - ⇒ DMEM mit 0.1% Bovinem Serum-Albumin (BSA Fraktion V von Sigma)
- Waschpuffer
 - ⇒ PBS (Gibco)
 - ⇒ PBS mit Heparin (Liquemin, 100 U/ml) (Roche)
- Isotope
 - ⇒ ^3H -Cholesterin-LDL
 - ⇒ ^3H -Cholesterin-Chylomikronen
- Liganden
 - ⇒ THL-Tetrahydrolipstatin (Orlistat[®])
 - ⇒ LPL
 - ⇒ Chylomikronen
 - ⇒ ApoE
 - ⇒ HDL₃
- Inhibitoren
 - ⇒ Brefeldin A
 - ⇒ LY294002 (BIOMOL)
- NaOH 0.1 N (Merck)
- Szintillatorflüssigkeit-Aqua-Sol (Packard BioScience)
- β -Counter-Polyethylene-Röhrchen (Packard BioScience)
- 6-Well-Platten (Nunc)

b) Methode

In den durchgeführten Pulse-Chase-Experimenten wurden ^3H -Cholesterin-markierte Chylomikronen und LDL eingesetzt, um Aufschluss über Aufnahme und Recycling des Liganden unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu erlangen.

Hierzu wurden, wie unter 3.4 beschrieben, HUH7-Zellen definierter Zellzahl in 6-Well-Platten ausgesetzt. Die Zellzahl der ausgesetzten Zellen lag dabei zwischen 150.000 und 250.00 Zellen pro Well. In einem Versuch wurden jeweils drei Wells einer 6-Well-Platte identischen Versuchsbedingungen ausgesetzt, um dann Mittelwerte bilden zu können. Die Zeit zwischen Aussetzen der Zellen und Versuchsbeginn betrug meist 24 Stunden, wobei

die Subkonfluenz des Zellrasens als Kriterium für einen idealen Versuchsbeginn galt. Je nach Versuchsansatz wurde ein Teil der Zellen vor Versuchsbeginn in den 6-Well-Platten wie unter 3.6.3 beschrieben transfiziert, um eine Überexpression an Rab5, Rab5Q79L oder Rab4 zu erreichen. Zwischen Transfektion und Versuchsbeginn wurde ein 24-Stunden-Zeitfenster eingehalten. Das gesamte Pulse-Chase-Experiment wurde bis zur Auswertung am Ende komplett in 6-Well-Platten durchgeführt.

Versuchsansatz mit ^3H -Cholesterin-LDL-Markierung

Die in den 6-Well-Platten subkonfluent gewachsenen Zellen wurden zu Versuchsbeginn mit 100.000 cpm/well ^3H -Cholesterin-LDL in LPDS über Nacht inkubiert, was die Aufnahme des markierten Liganden in die Zelle bewirken sollte. Die eingesetzte ^3H -Cholesterin-LDL-Menge variierte abhängig von der bei der Herstellung gemessenen Aktivität (siehe 3.7.3 Herstellung der radioaktiven Liganden). Vor der ^3H -Cholesterin-LDL-Inkubation wurde das Nährmedium abgesaugt und pro Well einmal mit 2 ml auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen.

Nach der Über-Nacht-Inkubation wurde das radioaktive Inkubationsmedium abgesaugt und entsorgt. Um nicht in die Zelle eingedrungene Reste des radioaktiven Liganden zu entfernen, wurde erneut zweimal mit je 2 ml auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen. Es folgte die auch als „Pulse“ bezeichnete Aufnahmephase, in der die Aufnahme von ApoE in die mit ^3H -Cholesterin beladenen Zellen geschehen sollte. Pro Well wurde 1 ml des Pulse-Mediums hinzugegeben, welches aus DMEM mit 2% BSA und je nach Versuch aus unterschiedlicher weiterer Zusammensetzung bestand. Auf die Pulse-Phase von 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank folgten nach dem Absaugen der Pulse-Lösung mehrere Waschschriffe auf Eis. Zunächst wurde mit 2 ml kaltem PBS pro Well gespült, dann erneut mit kaltem PBS gespült, mit einer 5minütigen Einwirkphase. Um die spezifischen Bindungen zu lösen, wurde anschließend für 10 Minuten mit 100 U/ml heparinisiertem PBS unter leichtem Schütteln gewaschen. Im letzten Schritt wurde erneut mit 2 ml PBS gespült und dieses dann sofort abgesaugt.

Auf die Waschschriffe folgte die einstündige Inkubation bei 37°C mit Chase-Lösung, bestehend aus DMEM mit 0.1% BSA und versuchsspezifischen Zusätzen. Im „Chase“ wurde der Efflux des radioaktiv markierten Cholesterins aus der Zelle in An- und Abwesenheit von HDL beobachtet. Weiterhin wurde der Einfluss von Inhibitoren des intrazellulären Transportes auf den zu messenden Efflux untersucht. Hierzu wurden der Chase-Lösung in bestimmten Ansätzen wahlweise Brefeldin A (2 µg/ml), LY294002 (2 µg/ml) oder beide Inhibitoren (je 2 µg/ml) hinzugefügt. Nach Beendigung des

60minütigen Chase wurde der Überstand abgenommen, in ein β -Counter-Röhrchen pipettiert, mit 7 ml Szintillatorflüssigkeit kräftig gemischt und dann im β -Counter gemessen. Die Zellen wurden mit je 1 ml 0.1 M NaOH pro Well für 30 Minuten auf dem Schüttler lysiert, um dann den Anteil des in der Zelle verbliebenen ^3H -Cholesterin bestimmen zu können. Um die gemessene Radioaktivität in Bezug auf die in jedem Well enthaltene Zellmenge bringen zu können, wurden aus jedem Well noch 100 μl Zelllysate für die spätere Proteinbestimmung nach Lowry entnommen (siehe Punkt 3.5). Die verbleibenden 900 μl Zelllysate wurden wie oben beschrieben in ein β -Counter Röhrchen pipettiert, mit 7 ml Szintillatorflüssigkeit gemischt und die Radioaktivität im β -Counter bestimmt.

Versuchsansatz mit ^3H -Cholesterin-Chylomikronen-Markierung

Die spezifische Markierung intrazellulärer Kompartimente, die an dem TRL-Cholesterin-Efflux beteiligt sind, wurde mittels ^3H -Cholesterin-Chylomikronen vorgenommen und fand während der Pulse-Phase statt. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Das Pulse-Medium bestand aus DMEM mit Glutamax I, 2% BSA und dem von der radioaktiven Aktivität der ^3H -Cholesterin-Chylomikronen-Lösung und dem Gesamtvolumen abhängigen Zusatz an ^3H -Cholesterin-Chylomikronen, der zu einer Gesamtaktivität von 100.000 cpm/well führte. Alle weiteren Schritte sind mit den unter „Versuchsansatz mit ^3H -Cholesterin-LDL-Markierung“ beschriebenen identisch.

3.9 Immunfluoreszenz

a) Material

- Zellen: HUH7 auf Coverslips
- Aufnahme-Lösung:
 - ⇒ DMEM with Glutamax I (Gibco) mit 2.5% BSA (Sigma)
 - ⇒ ApoE mit Chylomikronen (je nach Versuchsansatz)
 - ⇒ Cy3-gelabelte LDL/Chylomikronen (je nach Versuchsansatz)
- Chase-Lösung:
 - ⇒ DMEM with Glutamax I (Gibco) mit 2.5% BSA (Sigma)
 - ⇒ HDL₃ (6.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (von Prof. F. Rinninger zur Verfügung gestellt)
- Fixationslösung: 4% PFA (Paraformaldehyd) (Sigma) in PBS

- Waschlösungen:
 - ⇒ DMEM with Glutamax I (Gibco)
 - ⇒ DMEM with Glutamax I mit 100 U/ml Heparin (Liquemin) (Roche)
 - ⇒ PBS (Gibco)
- Blocklösung: 2% BSA in PBS; 0.5% Glycin; 0.05% Saponin
- 1. Antikörper-Lösung:
 - ⇒ Blocklösung mit 1:100 Verdünnung von anti-myc (Sigma), anti-Rab4 (Santa Cruz, Biotechnology, Inc.), anti-Rab5 (Santa Cruz, Biotechnology, Inc.), anti-His (Pharmacia Biotech), anti-EEAI (Transduction Laboratories), anti-ApoE (Dako), anti-ApoE (Boehringer), anti-Lamp1 (Transduction Laboratories)
- 2. Antikörper-Lösung:
 - ⇒ Blocklösung mit anti-Rabbit (Jackson)-Cy2 (1:100 Verdünnung), anti-Maus (Jackson)-Cy3 (1:200)
- Filipin (1:10 oder 1:20 verdünnt, je nach Ansatz)
- 0.1% PPD (1,2 Phenylendiamin) (Merck) in Mowiol (Calbiochem)
- Nagellack
- Filterpapier (Schleicher und Schuell)
- Objektträger

b) Methode

3.9.1 Aufnahmeexperimente

HUH7-Zellen wurden in definierter Zellzahl (siehe 3.4) auf autoklavierte Coverslips in 6-Well-Platten ausgesetzt und für 24 Stunden im Brutschrank belassen. Nach Erreichen einer Semikonfluenz des Zellrasens wurden die Zellen wie unter 3.6.3 beschrieben transfiziert und am nächsten Tag die entsprechenden Aufnahmen- oder Pulse-Chase-Experimente durchgeführt. Die mit den Zellen beschichteten Coverslips wurden mittels einer Pinzette kurz in PBS gespült, auf Filterpapier abgetupft und dann in eine Schachtel mit Parafilm verbracht, wo sie mit 100 µl der Aufnahmelösung überschichtet wurden. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Coverslips in DMEM und heparinisiertem DMEM gewaschen, um Rückstände der Aufnahmelösung zu entfernen. Nach kurzem Spülen in PBS wurden die Zellen nun für 30 Minuten in einer 4% PFA-PBS-Lösung mit 1 ml pro Coverslip fixiert. Nach fünf mal fünf Minuten Waschen in PBS wurde für fünf Minuten mit einer PBS-, 0.5% Glycin- und 0.05% Saponin-

enthaltenden-Lösung inkubiert, um die fixierten Zellmembranen permeabel für später einzusetzende Antikörper zu machen und störende Aldehydgruppen abzusättigen. Die Zellen wurden dann mit 60 µl Blockinglösung pro Coverslip für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert, um auf diese Weise unspezifische Kreuzreaktionen der Antikörper zu vermindern. Zur Inkubation mit dem 1. Antikörper wurden die Coverslips für 60 Minuten mit 50 µl der in Blocklösung angesetzten 1. Antikörper und Filipin bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in PBS-, 0.5% Glycin-, 0.05% Saponin-Lösung und reinem PBS wurden pro Coverslip 50 µl des Zweitantikörpers aufgetragen und für 45 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS konnten die Coverslips nun mit der die Zellen enthaltenden Seite nach unten auf einen Objektträger gegeben werden. Wichtig war hierbei das luftblasenfreie Auflegen der Coverslips auf einen - dem Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes dienenden - Tropfen 0.1% PPD in Mowiol. Zum luftdichten Abschluß wurden die Coverslips mit Nagellack umrandet. Je nach verwendetem Antikörper und Wellenlänge des Lichtes im Fluoreszenzmikroskop bzw. im konfokalen Mikroskop können nun die markierten Strukturen unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden.

3.9.2 Pulse-Chase-Experimente

Bei den Pulse-Chase-Inkubationen folgte auf das oben beschriebene Aufnahmeexperiment eine 60 Minuten dauernde Efflux-Phase, in der die Coverslips mit 60 µl Chase-Lösung bei 37°C inkubiert wurden. Alle weiteren Schritte sind mit den unter 3.8 beschriebenen identisch.

4 Ergebnisse

HDL im extrazellulären Medium induziert den zellulären Cholesterinefflux und vermittelt ApoE-Recycling über periphere Recycling-Endosomen. Ziel dieser Arbeit war es, das an der Cholesterinhomöostase beteiligte periphere Recycling-Kompartiment zu identifizieren und die Regulierung dieses Stoffwechselweges näher zu beschreiben.

Hierzu wurde mit radioaktiven Pulse-Chase-Experimenten untersucht, wie sich der zelluläre Cholesterinefflux unter bestimmten Versuchsbedingungen verhält. Zunächst wurde der Cholesterinefflux nach Inkubation der Zellen mit Inhibitoren des zytoskelettalen Transportes in unterschiedlichen Ansätzen bestimmt. In weiteren Ansätzen wurden - mittels Transfektion - Rab-Protein-überexprimierende Zellen hergestellt und die Auswirkungen auf den Cholesterinstoffwechsel untersucht. Der Einsatz der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie ermöglichte abschließend eine direkte Analyse der Lokalisation von Markern des endosomalen Stoffwechselweges.

4.1 Charakterisierung der Lipoproteine

Chylomikronen wurden aus dem Plasma von Patienten mit Hypertriglyzeridämie Typ-I isoliert. Der Akkumulation von Chylomikronen bei diesen Patienten liegt das kongenitale Fehlen des essentiellen Kofaktors ApoC-II mit einhergehendem Verlust der LPL-Aktivität zugrunde (Beil et al., 1992). Die mittels Dichtegradientenultrazentrifugation isolierten Chylomikronen wurden mit standardisierten photometrischen Methoden auf ihre Protein- und Lipidzusammensetzung untersucht. Abbildung 4 zeigt die absolute und die prozentuale Zusammensetzung der Chylomikronen aus zwei unterschiedlichen Präparationen.

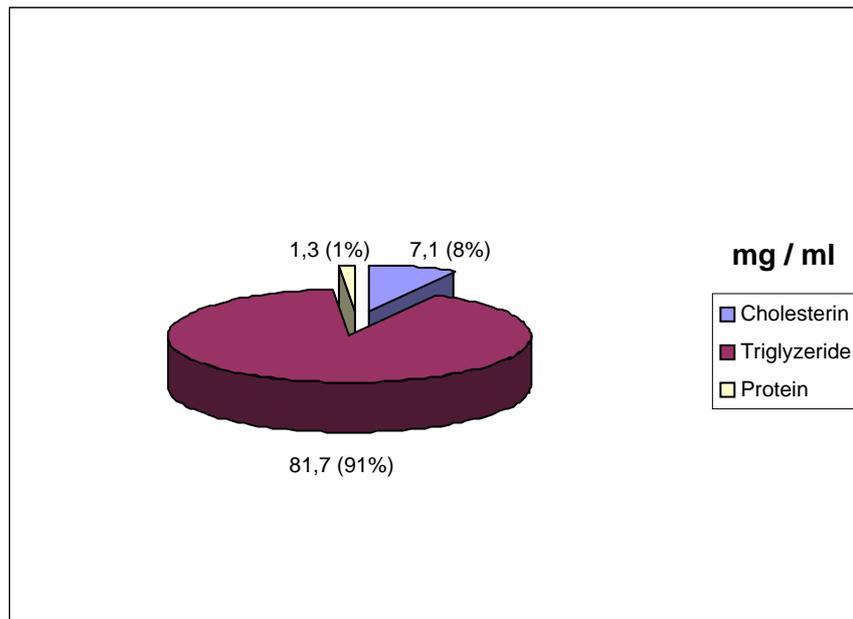


Abb. 4: Zusammensetzung humaner Chylomikronen. Aus zwei unabhängigen Präparationen wurden der Mittelwert für die absolute Masse und der prozentuale Anteil der Lipoprotein-Bestandteile an der Gesamtzusammensetzung der Chylomikronen bestimmt. Der Phospholipid-Anteil der Chylomikronen wurde in den durchgeführten Präparationen nicht bestimmt.

Wie in Abb. 4 dargestellt, setzen sich die Chylomikronen zu 1% aus Proteinen und zu 99% aus Lipiden zusammen, wobei Triglyzeride mit 91% hier den Hauptanteil bilden und 8% auf Cholesterin und Cholesterinester entfallen. Die Zusammensetzung der eingesetzten Chylomikronen ist somit mit den aus der Literatur bekannten Angaben nahezu identisch (Havel et al., 1955; Gotto et al., 1986; Kane, 1996).

4.2 Markierung der Liganden

Bei den durchgeführten Pulse-Chase-Experimenten wurde mit Tritium (^3H) markiertes Cholesterin eingesetzt, um Aufschluß über die unterschiedlichen intrazellulären Stoffwechselwege des Cholesterins zu erlangen. Wie unter 3.7.3 im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben, mussten hierzu zunächst Chylomikronen und LDL mit ^3H -Cholesterin inkubiert werden, um so eine Aufnahme des radioaktiven Markers in die Liganden zu erreichen. Je nach Aktivität der so hergestellten Inkubationslösung unterschieden sich die zum Erreichen der gewünschten Zielmenge von 100.000 cpm pro 6-Well benötigten Volumina (Tab. 3). In den unterschiedlichen Versuchsansätzen mit Inhibitoren des zytoskelettalen Transportes oder Rab4-/Rab5-überexprimierenden Zellen war jeweils noch zwischen der Inkubation mit ^3H -Cholesterin-Chylomikronen und ^3H -Cholesterin-LDL zu unterscheiden. Der von dem klassischen LDL-Cholesterin-

Stoffwechselweg abweichende Efflux für TRL-Cholesterin konnte so vergleichend untersucht werden (Heeren et al., 1999; Heeren et al., 2003).

Versuch	Aktivität (cpm/ μ l)	Zielmenge (cpm)	Eingesetzt (μ l)
V1-V4 Inhibitoren* +CM (Abb.5.1-5.3)	15.000	100.000	173 bei 26 ml Gesamtvolumen
V1-V4 Inhibitoren* +LDL (Abb.6.1-6.3)	15.500	100.000	168 bei 26 ml Gesamtvolumen
V1-V3 Rab4/Rab5 +CM (Abb.7.1-7.3)	16.191	100.000	161 bei 26 ml Gesamtvolumen
V1-V4 Rab4/Rab5 +LDL (Abb.8.1-8.3)	27.409	100.000	95 bei 26 ml Gesamtvolumen

Tab. 3: Radioaktive Inkubationslösungen. Dargestellt sind die Ausgangsaktivität der radioaktiven Inkubationslösungen und die eingesetzte Menge an [1 α , 2 α (n)-³H]-Cholesterol-Chylomikronen (CM) bzw.-LDL bei einer vorgegebenen Gesamtaktivität pro Well von 100.000 cpm. *LY294002, BFA

4.3 Cholesterinefflux unter Hemmung des vesikulären Transportes

Um den Einfluss und die Bedeutung intrazellulär vesikulären Transportes auf das HDL-induzierte Recycling von ApoE und den Cholesterinefflux zu untersuchen, wurden die HUH7-Zellen - nach ³H-Cholesterin-Chylomikronen-Inkubation - mit Inhibitoren des vesikulären Transportes inkubiert. LY294002 und BFA hemmen spezifische vesikuläre Recyclingwege. Während LY294002 über eine Interaktion mit PI-3-Kinasen den Transportweg zwischen frühen Endosomen und der Plasmamembran hemmt, wurde für BFA die Blockierung des Dynamin-abhängigen Recyclings aus dem perinukleären Transferrin-Recycling-Kompartiment beschrieben. Die Inkubation mit Chylomikronen führte neben einer spezifischen TRL-Cholesterin-Anreicherung der Zellen auch zu einer Anreicherung mit ApoE. Hierdurch sollten optimale Bedingungen für die Untersuchung von

HDL-induziertem ApoE-Recycling und Cholesterinefflux (Heeren et al., 2003) geschaffen werden.

Dargestellt ist im Folgenden der gemessene ^3H -Cholesterin-Efflux aus HUH7-Wildtyp-Zellen mit und ohne Zugabe von HDL und den Inhibitoren LY294002 und BFA.

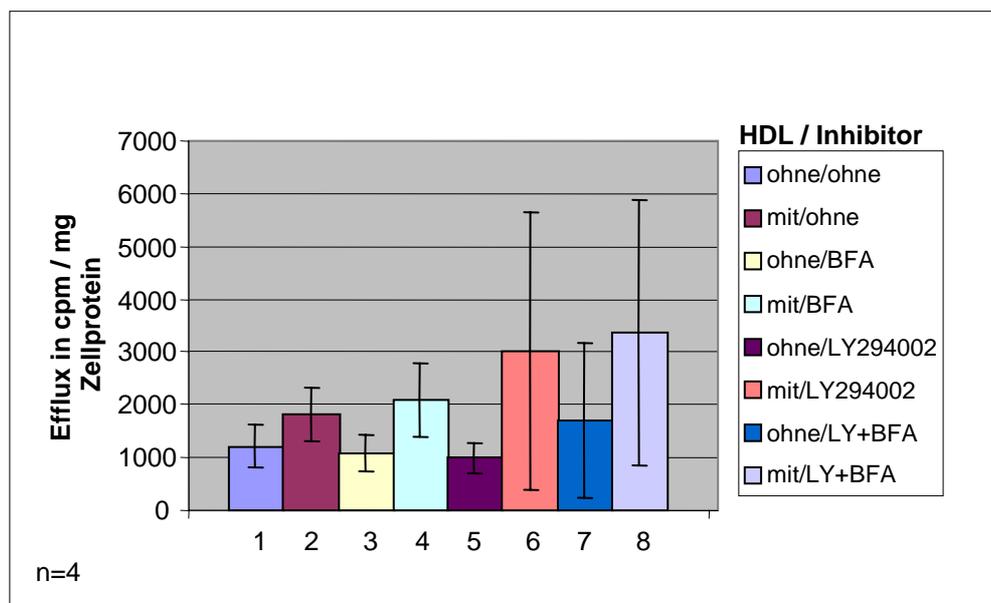


Abb. 5.1: TRL-Cholesterin-Efflux unter Hemmung des vesikulären Transportes. Dargestellt ist der Cholesterinefflux aus HUH7-Wildtyp-Zellen nach 60minütiger Inkubation mit ^3H -Cholesterin-Chylomikronen mit LPL (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)-/THL (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)-Zusatz. Auf mehrere Waschschriffe mit PBS, zum Entfernen nicht in die Zelle aufgenommenener Liganden, folgte die 60minütige Inkubation mit wahlweise HDL (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)- und/oder LY294002 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)- bzw. BFA (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)-enthaltender Nährlösung. Die im Überstand gemessene Radioaktivität, als Ausdruck des ^3H -Cholesterin-Effluxes, wurde im β -Counter bestimmt. Die Abszisse zeigt die mit 1-8 durchnummerierten unterschiedlichen Ansätze, die Ordinate den Cholesterinefflux in „counts per minute“ (cpm) pro mg Zellprotein. (LY=LY294002)

Die zusätzliche LPL-Inkubation im Pulse sollte eine verbesserte Ligandenaufnahme in die Zelle mit effektiverem ApoE-Recycling und Cholesterinefflux bewirken. LPL kann mit hoher Affinität LRP1 binden (Beisiegel et al., 1991; Heeren et al., 2002) und führt zu verstärktem ApoE-Recycling (Heeren et al., 2001). Die hydrolytische Aktivität der LPL wurde durch gleichzeitige THL-Inkubation unterbunden. Erkennbar ist ein absolut gesteigerter ^3H -Cholesterin-Efflux in den Ansätzen mit HDL-Zugabe (2,4,6,8). Die LY294002- oder BFA-enthaltenden Ansätze lassen in dieser Darstellung keinen richtungsweisenden Einfluss auf den ^3H -Cholesterin-Efflux erkennen. Eine Vergleichbarkeit der absoluten Efflux-Werte der verschiedenen Ansätze ist nur gegeben, wenn alle Zellen die gleiche Gesamtmenge ^3H -Cholesterin aufgenommen haben. Es ist daher sinnvoll, den

^3H -Cholesterin-Efflux als prozentualen Anteil der von den Zellen aufgenommenen Gesamtradioaktivität darzustellen.

Die folgende Abbildung stellt den ^3H -Cholesterin-Efflux aus HUH7-Wildtyp-Zellen unter wahlweiser HDL- und LY294002- bzw. BFA-Inkubation als prozentualen Anteil der in die Zelle aufgenommenen Radioaktivität dar.

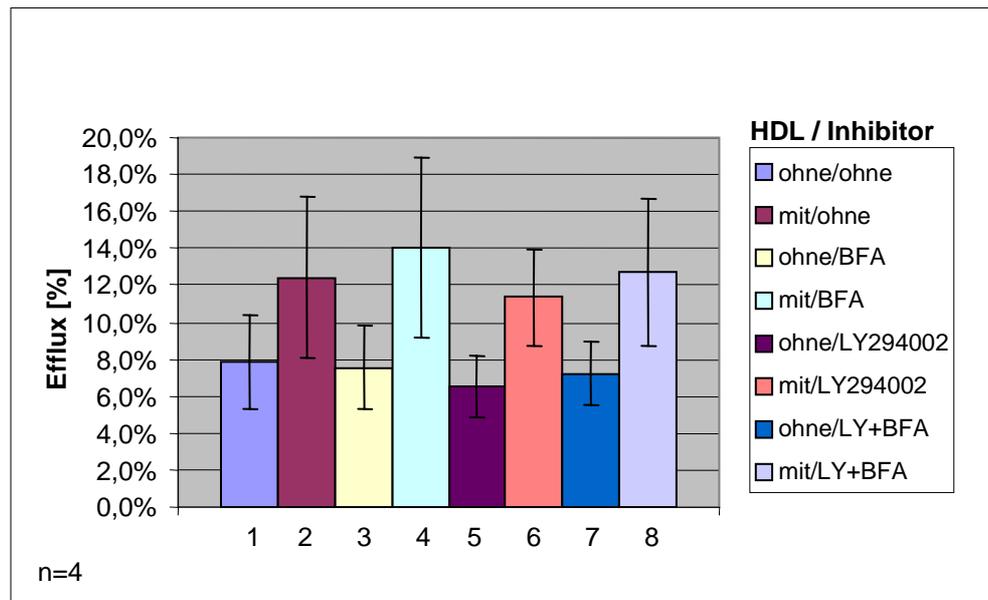


Abb. 5.2: TRL-Cholesterin-Efflux unter Hemmung des vesikulären Transportes. Die Abbildung zeigt den ^3H -Cholesterin-Efflux aus HUH7-Wildtyp-Zellen nach ^3H -Cholesterin-Chylomikronen-Inkubation. Der Efflux ist dargestellt als prozentualer Anteil in Bezug auf die aufgenommene Gesamtradioaktivität. Die Versuchsbedingungen waren mit den unter Abb. 5.1 beschriebenen identisch. (LY=LY294002)

Eine prozentuale Steigerung des radioaktiven Effluxes in den Ansätzen mit HDL-Zusatz (2,4,6,8) ist unabhängig von LY294002- oder BFA-Inkubation erkennbar. Die Kombination HDL mit BFA (4) bewirkt den größten prozentualen Cholesterinefflux aus den HUH7-Zellen. HDL mit LY294002 (6) hingegen führt zu einem leicht verminderten Cholesterinefflux, verglichen mit dem nur mit HDL, ohne Inhibitor, inkubierten Ansatz 2. Die Kombination HDL mit beiden Inhibitoren (8) hatte keinen deutlichen Effekt auf die Cholesterinverteilung. In allen Ansätzen ohne HDL-, mit LY294002- und/oder BFA-Inkubation (3,5,7) ist ein im Vergleich mit der in Ansatz 1 gezeigten Kontrolle prozentual verminderter ^3H -Cholesterin-Efflux erkennbar. Die Effluxminderung ist hier für LY294002 (5) am deutlichsten. Ohne HDL-Inkubation zeigen die mit den Inhibitoren inkubierten Ansätze somit tendenziell die stärkste Cholesterinefflux-Minderung. Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Zur Verdeutlichung der von HDL, LY294002 und BFA hervorgerufenen Effekte auf den zellulären Cholesterinefflux, soll im Folgenden der zelluläre Cholesterinefflux der verschiedenen Ansätze als ein Vielfaches des Ansatzes ohne jegliche Zusätze dargestellt werden. Durch diese Darstellungsweise soll eine bessere Vergleichbarkeit der gemessenen Effluxwerte erreicht werden.

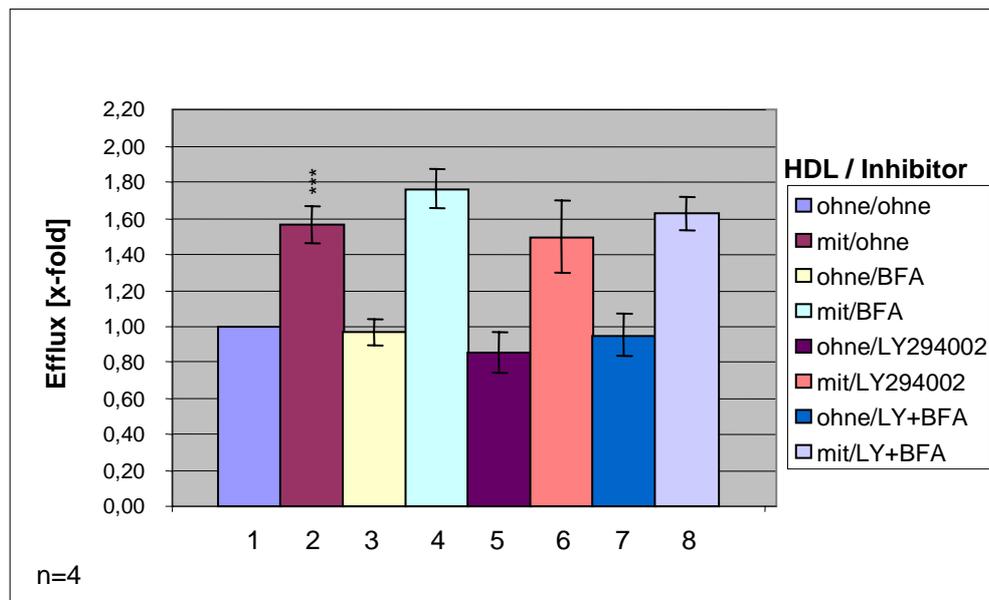


Abb. 5.3: TRL-Cholesterin-Efflux unter Hemmung des vesikulären Transportes. Die Abbildung zeigt den ^3H -Cholesterin-Efflux aus HUH7-Wildtyp-Zellen nach ^3H -Cholesterin-Chylomikronen-Inkubation. Der Efflux der unterschiedlichen Versuchsansätze ist als ein Vielfaches der in Ansatz 1 bestimmten Kontrolle dargestellt. Die Versuchsbedingungen waren mit den unter Abb. 5.1 beschriebenen identisch. *** Signifikanter Unterschied der gemessenen Werte zur Kontroll-Gruppe (1), $p < 0.001$. (LY=LY294002)

Auch in dieser Darstellung ist die Steigerung des radioaktiven Effluxes in allen Ansätzen mit HDL-Zusatz unabhängig von LY294002- und/oder BFA-Inkubation erkennbar (2,4,6,8). Bei alleiniger Inkubation mit HDL im Chase lässt sich hier eine signifikante Steigerung des zellulären Cholesterineffluxes erkennen (2). Während die Kombination HDL mit BFA (4) die größte Effluxsteigerung zeigt, bewirkte die Hinzugabe von LY294002 bei gleichzeitiger HDL-Inkubation (6) eine Efflux-Verminderung, verglichen mit dem nur mit HDL, ohne Inhibitor, inkubierten Ansatz 2. Die Kombination HDL mit beiden Inhibitoren (8) lässt auch hier, verglichen mit der alleinigen HDL-Inkubation (2), keinen ausgeprägten Effekt auf die Cholesterinmobilisierung erkennen. Ohne Inkubation mit HDL im Chase führt LY294002- und/oder BFA-Inkubation, verglichen mit der in Ansatz 1 gezeigten Kontrolle, zu einer Verminderung des ^3H -Cholesterin-Effluxes (3,5,7). Am deutlichsten ist dieser Effekt bei

alleiniger LY294002-Inkubation (5). Ohne HDL führte auch die Kombination beider Inhibitoren zu einer Cholesterinefflux-Verminderung (7), wenn auch weniger ausgeprägt. In den folgenden Versuchsansätzen wurde für die intrazelluläre Cholesterin-Markierung ^3H -Cholesterin-LDL eingesetzt, um so vor allem prälysosomale Pools zu markieren. Die Bestimmung des radioaktiven Effluxes in An- und Abwesenheit von HDL und den Inhibitoren des Vesikeltransportes LY294002 und BFA sollte anschließend Aufschluß über die am Cholesterinefflux beteiligten endosomalen Kompartimente und deren Regulierung geben.

In der nächsten Abbildung ist der ^3H -Cholesterin-Efflux aus HUH7-Wildtyp-Zellen mit und ohne Zugabe von HDL und den Inhibitoren LY294002 und BFA dargestellt. Im Unterschied zu den vorangehenden Abbildungen wurde ^3H -Cholesterin-markiertes LDL eingesetzt, um so prälysosomal-späte Endosomen mit Cholesterin zu markieren. Der Zusatz von Chylomikronen im Pulse diente der zellulären Aufsättigung mit ApoE.

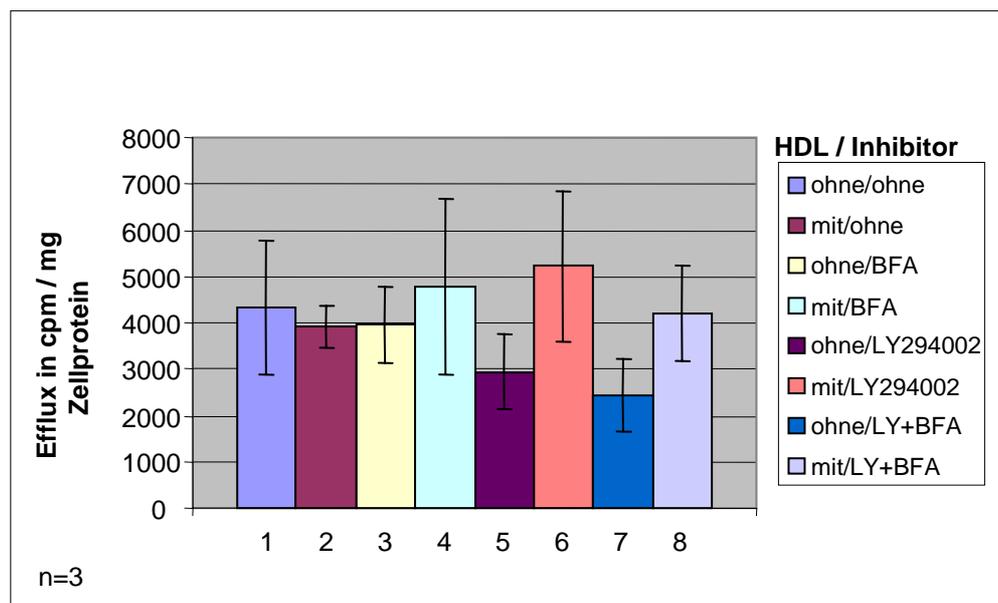


Abb. 6.1: LDL-Cholesterin-Efflux unter Hemmung des vesikulären Transportes. Dargestellt ist der radioaktive Efflux aus HUH7-Wildtyp-Zellen nach Über-Nacht-Inkubation mit ^3H -Cholesterin-LDL und einer 60minütigen Pulse-Phase unter Chylomikronen (5.0 $\mu\text{g/ml}$)-, LPL (1.0 $\mu\text{g/ml}$)-/THL (0.5 $\mu\text{g/ml}$)-Zusatz. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS, zum Entfernen nicht in die Zellen aufgenommener Liganden, folgte die 60minütige Chase-Phase mit Inkubation in wahlweise HDL (5 $\mu\text{g/ml}$)- und/oder LY294002 (2 $\mu\text{g/ml}$)- bzw. BFA (2 $\mu\text{g/ml}$)-enthaltender Nährlösung. Die Abszisse zeigt die mit 1-8 durchnummerierten unterschiedlichen Ansätze, die Ordinate den Efflux in „counts per minute“ (cpm) pro mg Zellprotein. (LY=LY294002)

Erkennbar ist ein absolut gesteigerter ^3H -Cholesterin-Efflux in den Ansätzen 4 und 6 mit HDL-Zugabe. In den LY294002 oder BFA enthaltenden Ansätzen ohne HDL-Zugabe zeigen

die absoluten Werte eine tendenzielle Verminderung des zellulären Cholesterineffluxes (3,5,7). Dieser Effekt ist für LY294002 (5) ausgeprägter als für BFA (3). Beide Inhibitoren kombiniert bewirken die stärkste Efflux-Minderung (7). Dieser Effekt fehlt bei gleichzeitiger HDL-Inkubation (8).

Die zelluläre ^3H -Cholesterin-Aufnahme in den unterschiedlichen Ansätzen ist nicht konstant. Um die absoluten Efflux-Werte unter den verschiedenen Bedingungen vergleichen zu können, ist es daher auch hier sinnvoll, den ^3H -Cholesterin-Efflux als prozentualen Anteil der zuvor in die Zellen aufgenommenen Gesamtradioaktivität darzustellen.

In der folgenden Abbildung wird der ^3H -Cholesterin-Efflux aus HUH7-Wildtyp-Zellen als prozentualer Anteil der aufgenommenen Gesamtradioaktivität unter den verschiedenen Versuchsbedingungen dargestellt.

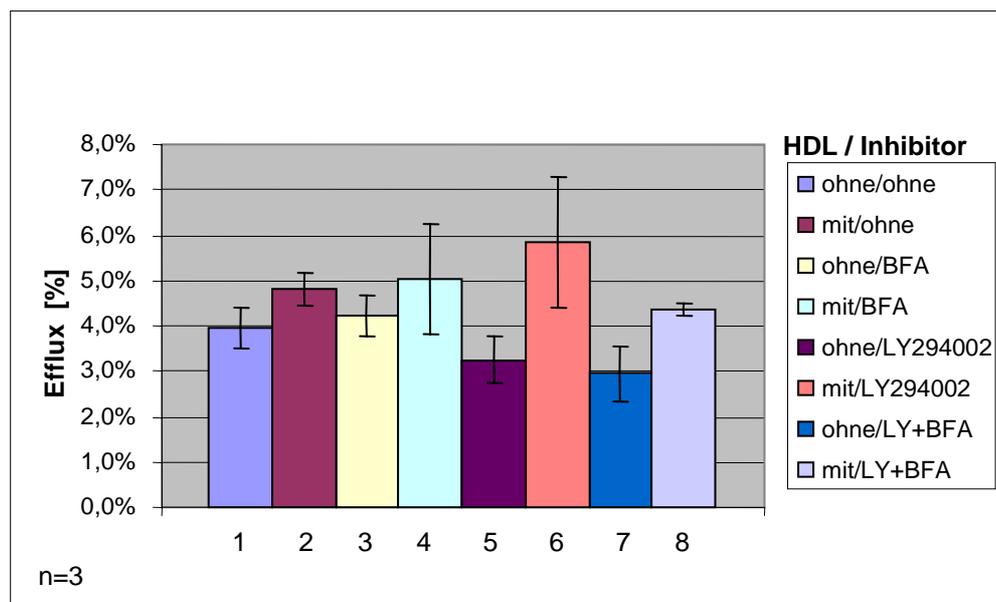


Abb. 6.2: LDL-Cholesterin-Efflux unter Hemmung des vesikulären Transportes
 Prozentuale Darstellung des ^3H -Cholesterin-Effluxes aus HUH7-Wildtyp-Zellen nach ^3H -Cholesterin-LDL-Inkubation. Der Efflux ist in Bezug auf die aufgenommene Gesamtradioaktivität dargestellt. Die Versuchsbedingungen sind unter Abb. 6.1 beschrieben. (LY=LY294002)

Erkennbar ist ein prozentual gesteigerter ^3H -Cholesterin-Efflux in allen Ansätzen mit HDL-Zugabe (2,4,6,8). Die Kombination HDL mit LY294002 (6) zeigt den stärksten Cholesterinefflux. Auch in dem Ansatz HDL mit BFA (4) war verglichen mit dem Kontrollansatz 1 und der Probe mit alleiniger HDL-Inkubation (2) ein gesteigerter Efflux erkennbar. Die Kombination beider Inhibitoren mit HDL-Inkubation (8) zeigte den

geringsten Cholesterinefflux aller mit HDL inkubierten Ansätze. Die Balken 3, 5 und 7 stellen die nicht mit HDL inkubierten Ansätze dar. Der Cholesterinefflux der mit BFA inkubierten Zellen (3) ist in HDL-Abwesenheit nicht vermindert. LY294002-Inkubation hingegen verursachte eine deutliche Effluxabnahme (5), die durch Kombination beider Inhibitoren (7) noch verstärkt wird.

In der nächsten Abbildung wird der nach ^3H -LDL-Inkubation gemessene ^3H -Cholesterin-Efflux der unterschiedlichen Proben als ein Vielfaches des Ansatzes ohne HDL-, LY294002- oder BFA-Inkubation dargestellt. Der Einfluss von HDL und den Inhibitoren auf den zellulären Cholesterinefflux soll verdeutlicht werden, indem die hervorgerufenen Effluxveränderungen bezogen auf die Kontrollprobe ohne Zusätze dargestellt werden.

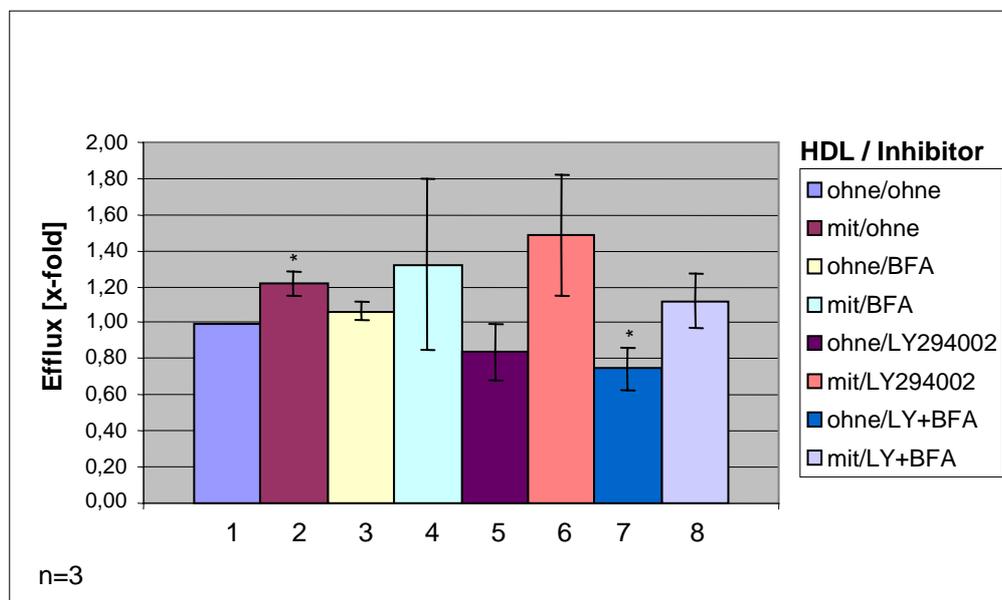


Abb. 6.3: LDL-Cholesterin-Efflux unter Hemmung des vesikulären Transportes.

Dargestellt ist der ^3H -Cholesterin-Efflux aus HUH7-Wildtyp-Zellen nach ^3H -Cholesterin-LDL-Inkubation. Die unterschiedlichen Versuchsansätze werden als ein Vielfaches der in Ansatz 1 bestimmten Kontrolle dargestellt. Die Versuchsbedingungen waren mit den unter Abb. 6.1 beschriebenen identisch. * Signifikanter Unterschied der gemessenen Werte zur Kontroll-Gruppe (1), $p < 0.05$. (LY=LY294002)

Auch in dieser Darstellung wird die Cholesterinefflux-steigernde Wirkung der HDL-Inkubation deutlich (2,4,6,8). Signifikant erhöht war der Cholesterinefflux jedoch nur bei alleiniger HDL-Inkubation, ohne Inhibitoren (2). Bei gleichzeitiger Inkubation mit den beiden Inhibitoren des vesikulären Transportes ohne HDL-Inkubation war der Cholesterinefflux hingegen signifikant vermindert (7). Wie auch in Abb. 6.2 gezeigt, verursachte LY294002-Inkubation ohne HDL eine Cholesterinefflux-Abnahme (5), die

jedoch bei Kombination mit HDL den stärksten Cholesterinefflux aller Ansätze aufweist (6). Auch eine Blockade mittels BFA (4) konnte den Cholesterinefflux unter HDL-Inkubation nicht signifikant mindern und ließ sogar, verglichen mit der Probe mit alleiniger HDL-Inkubation (2), einen gesteigerten Efflux erkennen. Werden beide Wege bei gleichzeitiger HDL-Inkubation blockiert (8), so ist der Cholesterinefflux noch gesteigert; er liegt jedoch auch in dieser Darstellung unterhalb der Werte, die bei individuellem Einsatz der Inhibitoren (4,6) oder bei alleiniger HDL-Inkubation (2) gemessen wurden. Die Balken 3, 5 und 7 stellen die nicht mit HDL inkubierten Ansätze dar. Während der Cholesterinefflux der mit BFA inkubierten Zellen (3) nicht vermindert war, führte LY294002-Inkubation zu vermindertem Recycling (5) und die Kombination beider Inhibitoren zu einer signifikanten Verminderung des Cholesterineffluxes (7).

Zusammenfassend hat jedoch weder die Inkubation mit LY294002 noch mit BFA zu einer signifikanten Veränderung des HDL-induzierten-Cholesterineffluxes geführt. Somit scheint der in Abhängigkeit von ApoE-Recycling untersuchte Cholesterintransport unter diesen Versuchsbedingungen nicht direkt durch PI-3-Kinase oder Dynamamin-Interaktion beeinflusst zu werden.

4.4 ApoE-abhängiger Cholesterintransport in Rab4-/Rab5-überexprimierenden Zellen

Zur weiteren Identifizierung der an dem HDL-induzierten Cholesterinefflux beteiligten endosomalen Kompartimente wurden HUH7-Zellen mit Rab5-, Rab5Q79L- und Rab4a-DNA transfiziert (Tab.2, Abb.3). Der ³H-Cholesterin-Efflux aus den nun Rab-Protein-überexprimierenden Zellen wurde dann in verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt (Abb. 7.1-8.3). Rab-Proteine sind in ihrer Vesikeltransport-koordinierenden Funktion an einer Vielzahl intrazellulärer Transport- und Stoffwechselprozesse beteiligt. Rab5 reguliert den frühen endozytotischen Stoffwechselweg über die Steuerung selektiver Ligandenaufnahme in die Zelle und die Vermittlung des gerichteten Transportes und der Fusion früher Endosomen (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992; Barbieri et al., 1996; McLauchlan et al., 1998). Rab4 hingegen ist an Recyclingvorgängen aus frühen Endosomen und aus Recycling-Endosomen beteiligt (Daro et al., 1996; Mohrmann und van der Sluijs, 1999) und scheint somit zusammen mit Rab5 Endo- und Exozytose zu koordinieren. Die durch Rab-Proteine regulierten Stoffwechselwege können bei Rab-Protein-Überexpression Veränderungen aufweisen (Hölttä-Vuori et al., 2002). Bei dem im Folgenden gezeigten Einsatz Rab-Protein-überexprimierender Zellen sollten die hervorgerufenen Veränderungen des Cholesterineffluxes verdeutlichen, welche intrazellulären Kompartimente an dem HDL-induzierten ApoE-Recycling und Cholesterinefflux beteiligt sind.

In der folgenden Abbildung ist der Cholesterinefflux aus Rab4-/Rab5-überexprimierenden HUH7-Zellen nach ^3H -Cholesterin-Chylomikronen-Inkubation dargestellt.

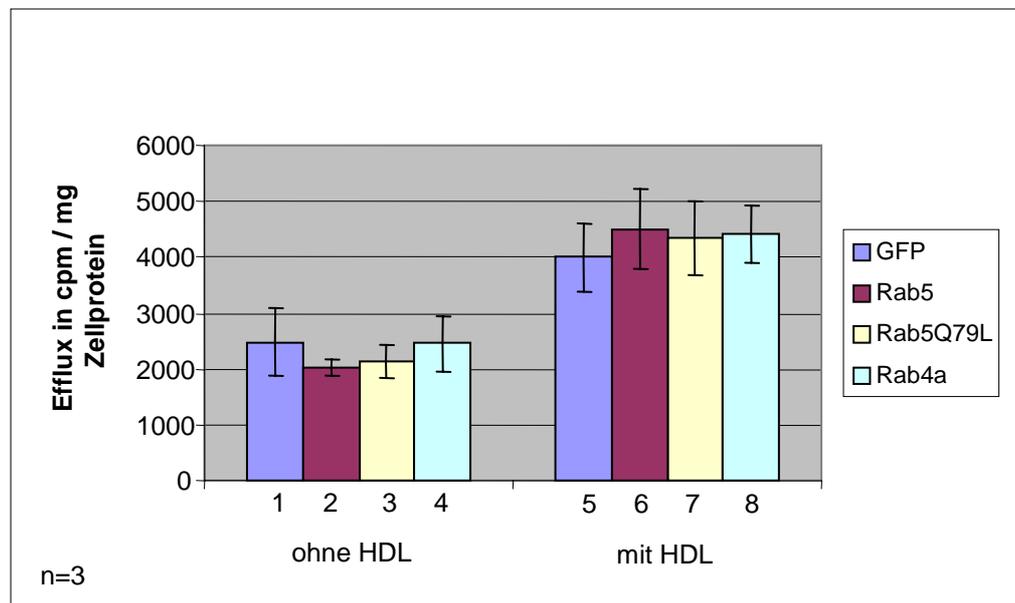


Abb. 7.1: TRL-Cholesterin-Efflux aus Rab4- und Rab5-überexprimierenden Zellen. Dargestellt ist der ^3H -Cholesterin-Efflux aus den GFP- (Kontrolle), Rab4a-, Rab5- und Rab5Q79L-überexprimierenden HUH7-Zellen. Die in 24 Stunden bis zur Subkonfluenz gewachsenen HUH7-Zellen wurden nach Transfektionsbeginn und einem weiteren Zeitintervall von 24 Stunden unter den verschiedenen Versuchsbedingungen inkubiert. Nach 60minütiger Inkubation mit ^3H -Cholesterin-Chylomikronen unter LPL (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/THL (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)-Zusatz wurden nicht in die Zellen aufgenommene Liganden mit PBS entfernt. Anschließend folgte die Chase-Phase mit 60minütiger Inkubation in Nährlösung mit und ohne HDL (9.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die Abszisse zeigt in 1-4 die ohne HDL inkubierten Ansätze, die Ansätze 5-8 wurden im Pulse mit HDL inkubiert. Auf der Ordinate ist der radioaktive Efflux in „counts per minute“ (cpm) pro mg Zellprotein dargestellt.

Die ^3H -Cholesterin-Chylomikronen-Inkubation hatte die spezifische TRL-Cholesterin-Anreicherung intrazellulärer Kompartimente zur Folge. Es sollten Veränderungen im Cholesterinefflux aus diesen Kompartimenten bei Rab-Protein-Überexpression untersucht werden, um so Rückschlüsse auf den am TRL-Cholesterin-Transport beteiligten Stoffwechselweg ziehen zu können.

Die absoluten Werte zeigen in den Inkubationen ohne HDL-Zusatz eine tendenzielle Verminderung des Cholesterineffluxes aus den Rab-Protein-überexprimierenden Zellen. In den Ansätzen mit Rab5 (2)- und Rab5Q79L (3)-Überexpression ist der ^3H -Cholesterin-Efflux im Vergleich zu der GFP-Kontrolle (1) und den Rab4a-überexprimierenden Zellen gemindert. Die Ansätze 6-8 zeigen unter HDL-Inkubation einen im Vergleich zu der GFP-Kontrolle erhöhten ^3H -Cholesterin-Efflux. Da davon auszugehen ist, dass nicht alle Zellen die gleiche Menge an Cholesterin aufgenommen haben, und um transfektionsbedingte

Unterschiede auszugleichen, wird der Cholesterinefflux im Folgenden in Bezug auf die in die Zellen aufgenommene Gesamtradioaktivität prozentual dargestellt.

Die nächste Abbildung zeigt den prozentualen Anteil des ^3H -Cholesterin-Efflux an der in die Rab4-/Rab5-überexprimierenden HUH7-Zellen aufgenommenen Gesamtradioaktivität.

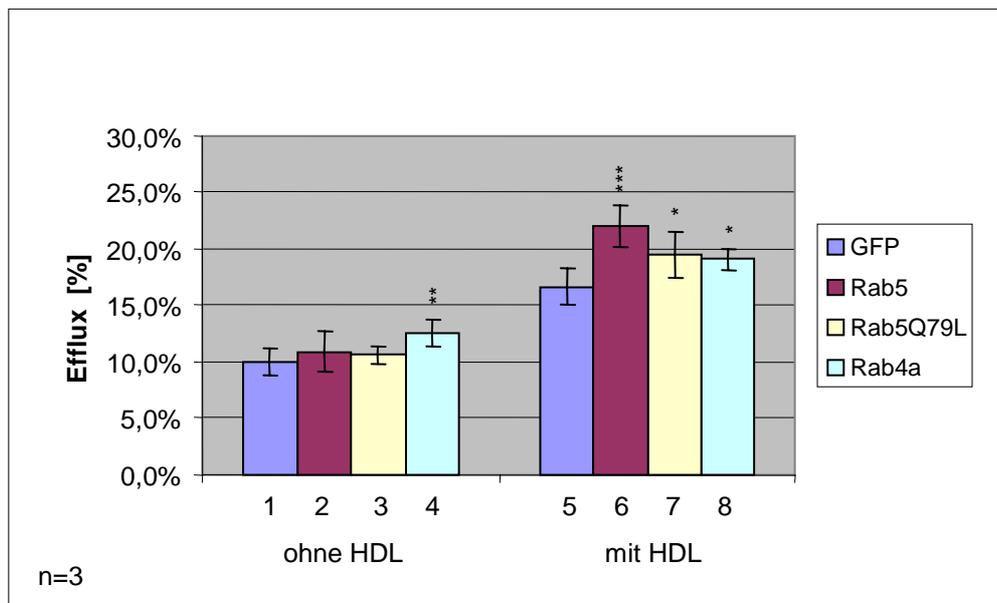


Abb. 7.2: TRL-Cholesterin-Efflux aus Rab4- und Rab5-überexprimierenden Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil des Cholesterineffluxes - nach ^3H -Cholesterin-Chylomikronen-Inkubation - aus den GFP- (Kontrolle), Rab4a-, Rab5- und Rab5Q79L-überexprimierenden HUH7-Zellen. Versuchsdurchführung und die Versuchsbedingungen sind unter Abb. 7.1 beschrieben. Ein Stern zeigt einen signifikanten Unterschied der gemessenen Werte zur GFP-Kontrolle (1 bzw. 5) an. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

In dieser prozentualen Darstellung des zellulären Cholesterineffluxes ist für die Inkubation von Rab4a-transfizierten Zellen ohne HDL (4), verglichen mit der GFP-Kontrolle (1), eine signifikante Effluxsteigerung zu erkennen. Die Effluxwerte von Rab5 (2)- und Rab5Q79L (3)-überexprimierenden Zellen liegen, ohne HDL-Inkubation, unterhalb des Rab4a-Ansatzes und sind, verglichen mit der GFP-Kontrolle, kaum verändert. Unter HDL-Inkubation weisen alle Ansätze, verglichen mit den nicht transfizierten Zellen (5), einen signifikant gesteigerten Cholesterinefflux auf (6-8). Für Rab5-transfizierte Zellen (6) ist die Effluxsteigerung am stärksten ausgeprägt. Der gemessene radioaktive Efflux der Rab5Q79L- und Rab4a-Ansätze ist auch signifikant gesteigert, liegt jedoch unterhalb der für Rab5 gemessenen Werte.

Um die Veränderung im Cholesterinstoffwechsel bei Rab-Überexpression besser zu verdeutlichen, sollen die Effluxwerte nun als ein Vielfaches der nicht-Rab-transfizierten Kontrollprobe dargestellt werden. In der folgenden Abbildung bezieht sich deshalb der ^3H -Cholesterin-Efflux aus den Rab4-/Rab5-überexprimierenden HUH7-Zellen auf die mit GFP transfizierte Kontrollprobe.

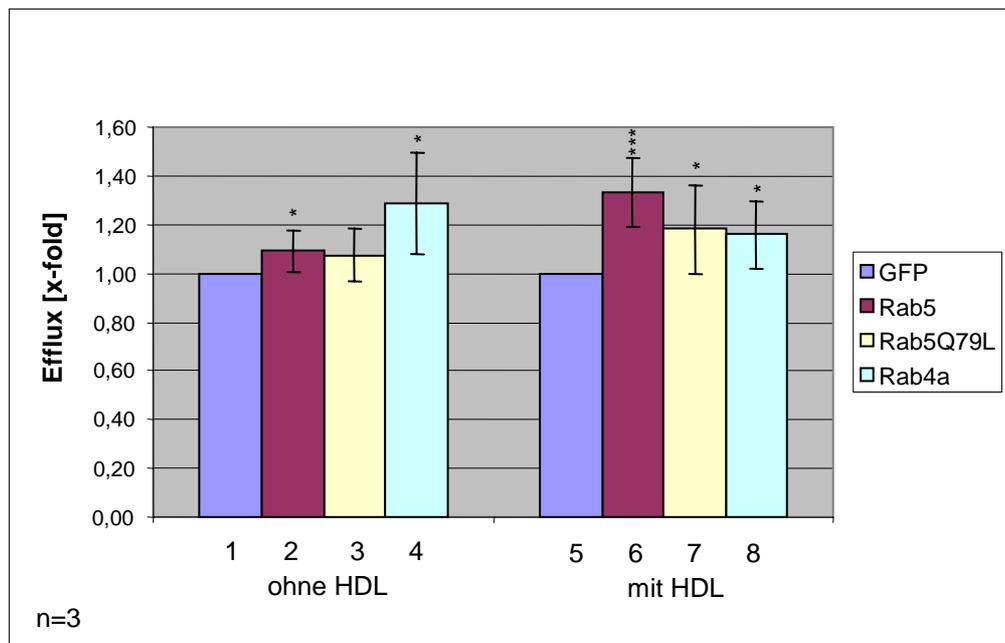


Abb. 7.3: TRL-Cholesterin-Efflux aus Rab4- und Rab5-überexprimierenden Zellen.

Dargestellt ist der ^3H -Cholesterin-Efflux - nach ^3H -Cholesterin-Chylomikronen-Inkubation - aus Rab4-/Rab5-überexprimierenden Zellen. Gezeigt werden die Effluxunterschiede der einzelnen Ansätze in Bezug auf die nicht-Rab-transfizierte Kontrolle 1 bzw. 5. Versuchsdurchführung und die Versuchsbedingungen sind unter Abb. 7.1 beschrieben. Ein Stern zeigt einen signifikanten Unterschied der gemessenen Werte zur GFP-Kontrolle (1 bzw. 5) an. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Der Cholesterinefflux in den Ansätzen mit Rab-transfizierten Zellen, ohne HDL-Zusatz, ist verglichen mit der GFP-Kontrolle gesteigert (2-4). Die Rab4a überexprimierenden Zellen weisen einen gegenüber der GFP-Kontrolle signifikant gesteigerten Cholesterinefflux auf (4), der auch verglichen mit den Rab5- und Rab5Q79L-Ansätzen deutlich erhöht ist. Rab5- und Rab5Q79L-Überexpression (2,3) führte auch zu einer verstärkten Cholesterinmobilisierung. Diese war für Rab5, verglichen mit der GFP-Kontrolle, signifikant erhöht (2). Unter HDL-Inkubation war der Cholesterinefflux aller Rab-Protein-überexprimierenden Ansätze signifikant gesteigert (6-8). Rab5-transfizierte Zellen (6) zeigten in Anwesenheit von HDL die stärkste Cholesterinefflux-Steigerung. Der ebenfalls signifikant gesteigerte Efflux bei Rab5Q79L- und Rab4a-Überexpression (7,8) war weniger deutlich ausgeprägt, betrug aber noch etwa das 1,2fache der GFP-Kontrolle (5).

In den folgenden Darstellungen wurden die transfizierten HUH7-Zellen mit ^3H -Cholesterin-LDL inkubiert und so vor allem späte Endosomen und prälysosomale Pools mit ^3H -Cholesterin gesättigt. Der radioaktive Efflux in An- und Abwesenheit von HDL sollte anschließend Aufschluß über den Einfluss von Rab-Protein-Überexpression auf den zellulären Cholesterinefflux und die daran beteiligten endosomalen Kompartimente geben. Weiterhin sollten die Unterschiede zu der spezifischen zellulären Aufsättigung mit TRL-Cholesterin und dem HDL-induzierten ApoE-Recycling und Cholesterinefflux aus TRL-Cholesterin-spezifischen Recycling-Kompartimenten (Abb. 7.1-7.3) herausgestellt werden.

In der nächsten Abbildung ist der Cholesterinefflux aus Rab4-/Rab5-überexprimierenden HUH7-Zellen nach ^3H -Cholesterin-LDL-Inkubation dargestellt.

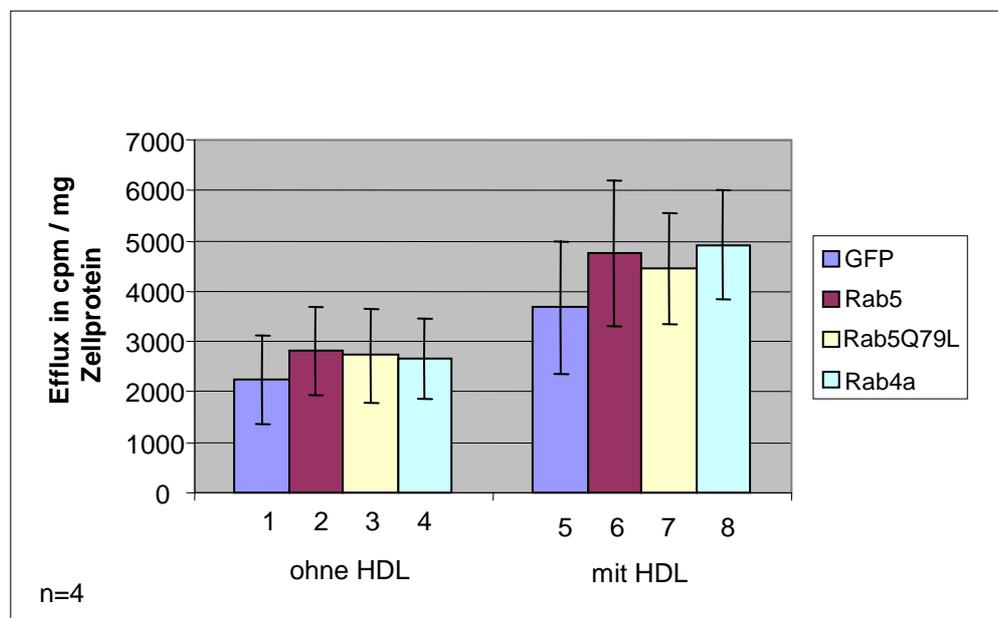


Abb. 8.1: LDL-Cholesterin-Efflux aus Rab4- und Rab5-überexprimierenden Zellen. Gezeigt wird der radioaktive Efflux aus den GFP- (Kontrolle), Rab4a-, Rab5- und Rab5Q79L-überexprimierenden HUH7-Zellen. Auch in diesem Versuchsansatz wurde nach subkonfuentem Wachstum der Zellen mit der Transfektion begonnen und ein 24stündiges Zeitintervall zum Versuchsbeginn eingehalten. Die intrazelluläre ^3H -Cholesterin-LDL-Aufsättigung wurde für 12 Stunden mit 100.000 cpm/well vorgenommen. Auf diese Inkubationsphase folgte das Entfernen des nicht in die Zelle aufgenommenen ^3H -Cholesterins mittels PBS. Nach der 60minütigen Pulse-Phase unter Chylomikronen (5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)-, LPL (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)-/ THL (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)-Zusatz erfolgte die 60minütige Inkubation in Nährlösung mit und ohne HDL (9.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$), dem sogenannten Chase. Die Abszisse zeigt in 1-4 die ohne HDL inkubierten Ansätze, die Ansätze 5-8 wurden im Pulse mit HDL inkubiert. Auf der Ordinate ist der radioaktive Efflux in „counts per minute“ (cpm) pro mg Zellprotein dargestellt.

Im Vergleich mit der GFP-Kontrolle sind die absoluten ^3H -Cholesterin-Efflux-Werte ohne HDL-Zugabe in allen Ansätzen mit Rab-Protein-Überexpression gesteigert (2-4). Auch

unter HDL-Inkubation weisen die Ansätze mit Rab-Protein-transfizierten Zellen eine Steigerung des radioaktiven Effluxes auf (6-8). Rab5 (6)- und Rab4a (8)-überexprimierende Zellen zeigen, verglichen mit Rab5Q79L (7), einen etwas deutlicheren Cholesterinefflux. Cholesterinefflux kann von verschiedenen Stationen des endozytotischen Transportweges aus stattfinden. In dem hier gezeigten Versuchsansatz wurden vor allem prälysosomal-späte endosomale Cholesterin-Pools zunächst aufgefüllt und dann HDL- und ApoE-vermittelter Cholesterinefflux induziert. Es ist nun interessant, den Cholesterinefflux als prozentualen Anteil von der aufgenommenen Gesamtmenge an Cholesterin darzustellen. Hierdurch kann vergleichend untersucht werden, wie gut sich Cholesterin bei allgemeiner (Abb. 8.1-8.3) und TRL-spezifischer (Abb. 7.1-7.3) intrazellulärer Anreicherung HDL- und ApoE-vermittelt mobilisieren lässt. Weiterhin lassen sich die Ergebnisse des Cholesterineffluxes aus einem Versuchsansatz besser untereinander vergleichen, wenn sie prozentual dargestellt werden, da es zu transfektions- und versuchsbedingten Unregelmäßigkeiten in der zellulären Cholesterinaufnahme kommen kann.

Die folgende Abbildung zeigt den HDL-induzierten Cholesterinefflux aus Rab4-/Rab5-überexprimierenden HUH7-Zellen als prozentualen Anteil der aufgenommenen ^3H -Cholesterin-LDL-Gesamtcholesterinmenge.

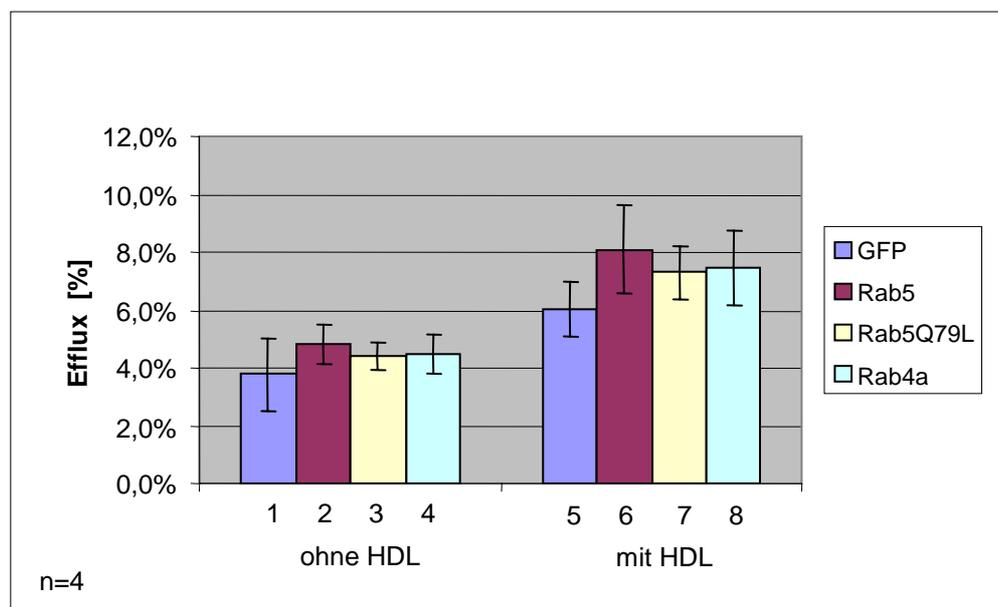


Abb. 8.2: LDL-Cholesterin-Efflux aus Rab4- und Rab5-überexprimierenden Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil des ^3H -Cholesterin-Effluxes - nach ^3H -Cholesterin-LDL-Inkubation - aus den GFP- (Kontrolle), Rab4a-, Rab5- und Rab5Q79L-überexprimierenden HUH7-Zellen. Versuchsdurchführung und die Versuchsbedingungen sind unter Abb. 8.1 beschrieben.

Auch in dieser Darstellung zeigt sich bei Rab-Protein-Überexpression, auch ohne HDL-Inkubation, ein prozentual verstärkter Cholesterinefflux (2,3,4). Dieser Effekt ist bei den Rab5-überexprimierenden Zellen (2) etwas stärker als bei Rab5Q79L (3) und Rab4a (4). Auch in den Ansätzen mit HDL-Inkubation zeigen die Rab-Protein-transfizierten Zellen einen stärkeren Cholesterinefflux als die GFP-Kontrolle (6-8). Rab5-Überexpression (6) führte zu dem stärksten HDL-induzierten Efflux. Die Effluxwerte der Rab5Q79L (7)- und Rab4a (8)-transfizierten Zellen waren, verglichen mit dem Rab5-Ansatz, vermindert.

Bezieht man den ^3H -Cholesterin-Efflux der Rab4-/Rab5-überexprimierenden HUH7-Zellen auf die nicht-Rab-transfizierte GFP-Kontrolle, so lassen sich die Auswirkungen der Rab-Proteine auf den zellulären Cholesterinefflux besonders verdeutlichen. In der nächsten Abbildung beziehen sich daher die Effluxwerte bei Rab-Überexpression auf die für die GFP-Kontrolle gemessenen Werte.

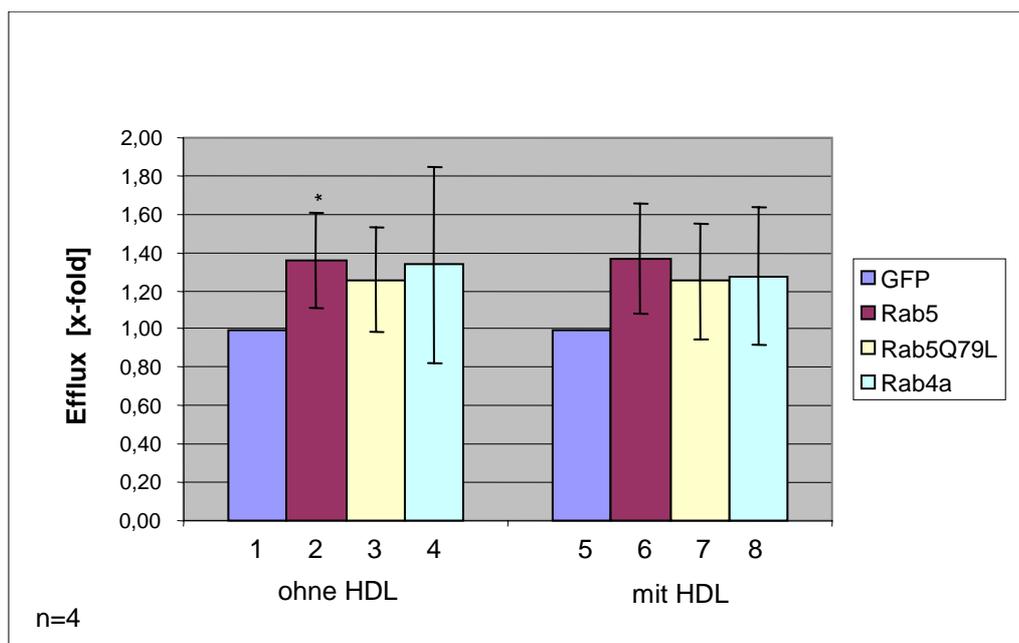


Abb. 8.3: LDL-Cholesterin-Efflux aus Rab4- und Rab5-überexprimierenden Zellen. Gezeigt wird der Cholesterinefflux - nach ^3H -Cholesterin-LDL-Inkubation - in Rab4-/Rab5-überexprimierenden HUH7-Zellen. Die GFP-transfizierten Zellen dienen der Kontrolle, auf die sich der Efflux der Rab-Protein-transfizierten Zellen bezieht. Versuchsdurchführung und Versuchsbedingungen waren wie unter Abb. 8.1 beschrieben. * Signifikanter Unterschied der gemessenen Werte zur GFP-Kontrolle (1), $p < 0.05$.

Rab-Protein-Überexpression hat in den Versuchsansätzen ohne HDL-Inkubation zu gesteigertem Cholesterinefflux geführt (2-4). Die Steigerung ist am deutlichsten in Rab5-überexprimierenden Zellen (2). Hier ist der Cholesterinefflux, bezogen auf die GFP

Kontrolle (1), signifikant gesteigert und liegt oberhalb der Rab5Q79L (3)- und Rab4a (4)-transfizierten Ansätze. Rab5Q79L-überexprimierende Zellen (3) weisen in dieser Darstellung den geringsten Cholesterinefflux auf. Auch in den Ansätzen mit HDL-Zusatz (5-8) zeigen die Rab-Protein-überexprimierenden Zellen einen gesteigerten Cholesterinefflux. Bei Rab5-Überexpression (6) ist diese Steigerung am deutlichsten, während die Rab5Q79L (7)- und Rab4a (8)-Ansätze einen auf Rab5 bezogen geringeren Efflux zeigen.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass Rab4-/Rab5-Überexpression Veränderungen der zellulären Cholesterinhomöostase zur Folge hat. Auffallend war, dass die absoluten Effluxwerte der Rab-überexprimierenden Zellen bei ^3H -Cholesterin-Chylomikronen-Markierung zum Teil vermindert waren, während sich prozentual ein verstärkter Efflux darstellte. Dies könnte an einer verminderten Cholesterin-Aufnahme der transfizierten Zellen liegen. Nach ^3H -Cholesterin-Chylomikronen-Inkubation ließ sich Cholesterin aus den Rab-überexprimierenden Zellen jedoch zum Teil signifikant besser mobilisieren, als aus den nicht transfizierten Zellen. Dieser Effekt war nach ^3H -Cholesterin-LDL-Markierung nicht so ausgeprägt zu beobachten. Der Cholesterinefflux war hier nicht signifikant verändert und auch der prozentuale Anteil des mobilisierten Cholesterins war nach ^3H -Cholesterin-LDL-Markierung geringer als nach ^3H -Cholesterin-Chylomikronen-Inkubation.

4.5 Lokalisation von Rab5 und Cholesterin in intrazellulären Kompartimenten

HDL induziert TRL-Cholesterin-Efflux und ApoE-Recycling über EEA1-positive Endosomen (Heeren et al., 2003). Von den HDL stammendes ApoA-I wandert hierbei zu vorbestehenden Cholesterin-ApoE-Komplexen in EEA1-positiven Strukturen und vermittelt so den Cholesterinefflux und das ApoE-Recycling. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie werden in den folgenden Abbildungen zunächst Cholesterin und Rab5 in intrazellulären Kompartimenten dargestellt. Es sollen dann diese Kompartimente identifiziert und die intrazelluläre Cholesterinverteilung nach HDL-Inkubation in den Rab5- und Rab5Q79L-überexprimierenden Zellen beschrieben werden.

Die nächste Abbildung zeigt die Immunfluoreszenzmarkierung von Rab5, Cholesterin und dem myc-tag in Rab5Q79L-überexprimierenden HUH7-Zellen. Die Untersuchung auf Kolo­kalisierung mit dem konfokalen Mikroskop und die Beschreibung der intrazellulären Verteilung der markierten Strukturen dienen zunächst der Überprüfung des Transfektionserfolges und der Charakterisierung der Rab5-enthaltenden intrazellulären Kompartimente.

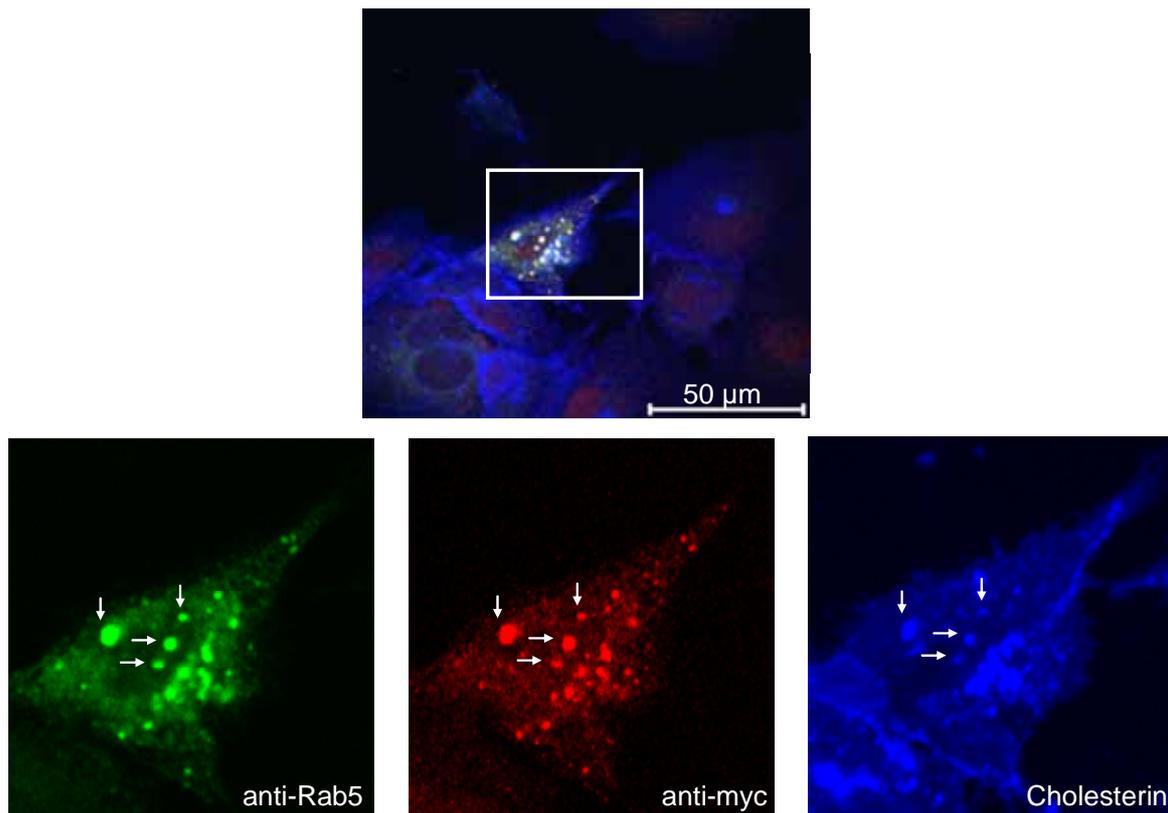


Abb. 9: Lokalisation von Rab5 und Cholesterin in intrazellulären Kompartimenten. HUH7-Zellen wurden in 6-Well-Platten auf Coverslips ausgesetzt und am Folgetag mit Rab5Q79L-myc-Plasmid-DNA transfiziert. Hierbei wurde 1 µg DNA zu 3 µl FuGENE eingesetzt und gemäß den Transfektionsvorschriften der Firma Roche vorgegangen. Zwischen Transfektionsbeginn und Versuchsbeginn wurde ein Zeitintervall von 24 Stunden eingehalten. Es folgte die einstündige Inkubation mit der LDL-Cholesterin-enthaltenden Aufnahmelösung. Anschließend wurden die Coverslips nach mehreren Waschschr­itten mit PFA/PBS fixiert und dann in Blockinglösung blockiert. Es folgte die 60minütige Erstantikörperinkubation mit anti-Rab5 (1:100), anti-myc (1:100) und Filipin. Die Inkubation mit Filipin diente der Visualisierung von freiem Cholesterin. Vor der 45minütigen Zweitantikörperinkubation mit anti-Maus-Cy3 (1:200) und anti-Rabbit-Cy2 (1:100) waren erneute Waschschr­itte nötig. Zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes wurden die Coverslips nun in 0.1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Die abgebildete HUH7-Zelle zeigt je nach eingesetztem Antikörper und Wellenlänge des konfokalen Mikroskopes unterschiedlich angefärbte intrazelluläre Strukturen. Die mit einem Pfeil markierten Strukturen kolo­kalisieren in der „Overlay-Darstellung“.

Die Transfektion der HUH7-Zellen erfolgte mit Rab5Q79L-myc-Plasmid-DNA. Die Kolo­kalisierung der mit Pfeilen markierten endosomalen Strukturen in der anti-Rab5- und

anti-myc-Markierung zeigen den Transfektionserfolg. Rab5Q79L und Cholesterin kolokalisieren in großen, über die Zelle verteilten Vesikeln. In der Overlay-Darstellung wird außerdem deutlich, dass Rab5, myc und Cholesterin kolokalisieren. Das Vorkommen von Rab5 in frühen Endosomen und die regulierende Funktion dieser GTPase im frühen endozytotischen Stoffwechselweg wurden beschrieben (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992). Rab5Q79L stellt die GTPase-defekte Form von Rab5 dar und ist somit immer aktiv. Die bei Rab5Q79L-Überexpression zu beobachtende Cholesterin-Akkumulation in großen Vesikeln könnte durch die verstärkte Fusion früher Endosomen bedingt sein, wie sie bei Rab5Q79L-Überexpression auch in COS-1-Zellen beobachtet wurde (Hölttä-Vuori et al., 2002).

Es sollen im Folgenden diese an dem frühen endozytotischen Stoffwechselweg beteiligten Rab5- und Cholesterin-positiven Vesikel näher beschrieben werden. In den nächsten Immunfluoreszenzdarstellungen wurden daher Rab5-Wildtyp-überexprimierende Zellen mit TRL-Cholesterin und anschließend mit HDL inkubiert, um die an dem HDL-induzierten ApoE-Recycling und Cholesterinefflux beteiligten Strukturen näher zu identifizieren.

Es wurde hierzu die Immunfluoreszenzmarkierung von Rab5-Wildtyp, EEA1 - dem Marker früher Endosomen - und Cholesterin in Rab5-Wildtyp-überexprimierenden Zellen vorgenommen (Abb. 10).

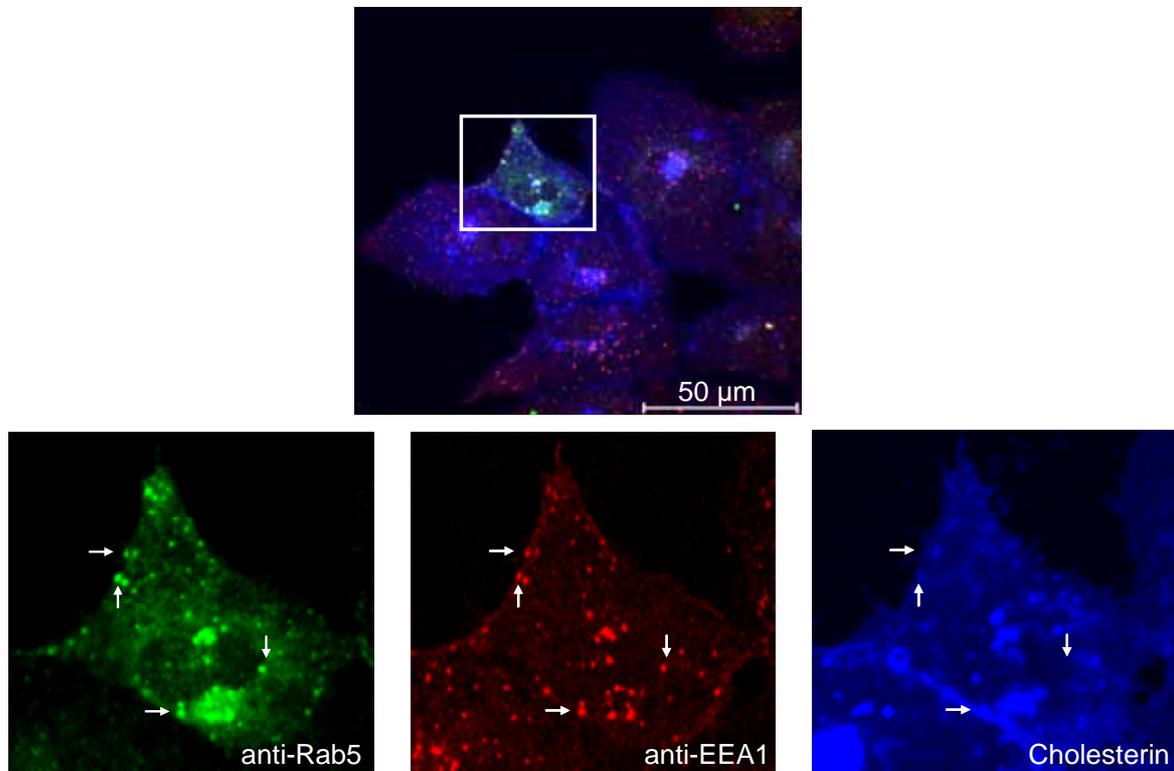


Abb. 10: Lokalisation von Rab5 und Cholesterin in intrazellulären Kompartimenten. Die Transfektion der HUH7-Zellen mit Rab5-Wildtyp-myc-Plasmid-DNA wurde wie unter Abb. 9 beschrieben vorgenommen. Auf die einstündige Pulse-Phase unter Inkubation bei 37°C mit der ApoE- und Chylomikronen-enthaltenden Aufnahmelösung folgte die 60minütige Chase-Phase, in der die Coverslips mit 6.6 µg/ml HDL₃ inkubiert wurden. Die Coverslips wurden dann nach mehreren Waschschritten mit PFA/PBS fixiert und in Blockinglösung blockiert. Es folgte die 60minütige Erstantikörperinkubation mit anti-Rab5 (1:100), anti-EEA1 (1:100) und Filipin. Die Inkubation mit Filipin diente der Visualisierung von freiem Cholesterin. Vor der 45minütigen Zweitantikörperinkubation mit anti-Maus-Cy3 (1:200) und anti-Rabbit-Cy2 (1:100) waren erneute Waschschriffe nötig. Zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes wurden die Coverslips nun in 0.1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Die abgebildete HUH7-Zelle zeigt je nach eingesetztem Antikörper und Wellenlänge des konfokalen Mikroskopes unterschiedlich angefärbte intrazelluläre Strukturen. Die mit einem Pfeil markierten Strukturen kolokalisieren in der „Overlay-Darstellung“.

Nach Chylomikronen-, ApoE- und HDL-Inkubation kolokalisieren in den Rab5-Wildtyp-überexprimierenden Zellen Rab5, Cholesterin und EEA1 in über das Zytoplasma verteilten vesikulären Strukturen. Diese Kolokalisation spricht für einen TRL-Cholesterin-Transport über Rab5- und EEA1-positive Strukturen, die am ehesten frühen Endosomen entsprechen. Der Lipid-Anteil der TRL und ApoB wandert zur hydrolytischen Degradation in lysosomale Kompartimente. ApoE, ApoC und LPL hingegen werden über periphere Recycling-Kompartimente zurück zur Plasmamembran transportiert, wo sie in Form

sogenannter „Surface-Remnants“ nachgewiesen wurden (Heeren et al., 1999). Das HDL-vermittelte ApoE-Recycling läuft über periphere, EEA1-positive Endosomen und geht mit einem verstärkten Cholesterinefflux einher (Heeren et al., 2003). Die hier gezeigte Kollokalisierung verdeutlicht die Lokalisation von Rab5 in frühen Endosomen und deren Funktion in der Vermittlung von direktem Cholesterinefflux.

In der nächsten Darstellung wurden HUH7-Zellen mit der GTPase-defizienten Mutante von Rab5, Rab5Q79L, transfiziert und der Effekt auf die intrazelluläre Cholesterinverteilung nach HDL-Inkubation untersucht. Rab5Q79L-Überexpression in COS-1-Zellen hatte Cholesterin-Akkumulation in EEA1-positiven-Endosomen zur Folge, dies wurde mit einer vermehrten Fusion früher Endosomen und vermindertem Cholesterin-Recycling zur Plasmamembran erklärt (Stenmark et al., 1994; Hölttä-Vuori et al., 2002).

Die folgende Abbildung zeigt die Immunfluoreszenzmarkierung von Rab5Q79L, EEA1 und Cholesterin in Rab5Q79L-überexprimierenden Zellen.

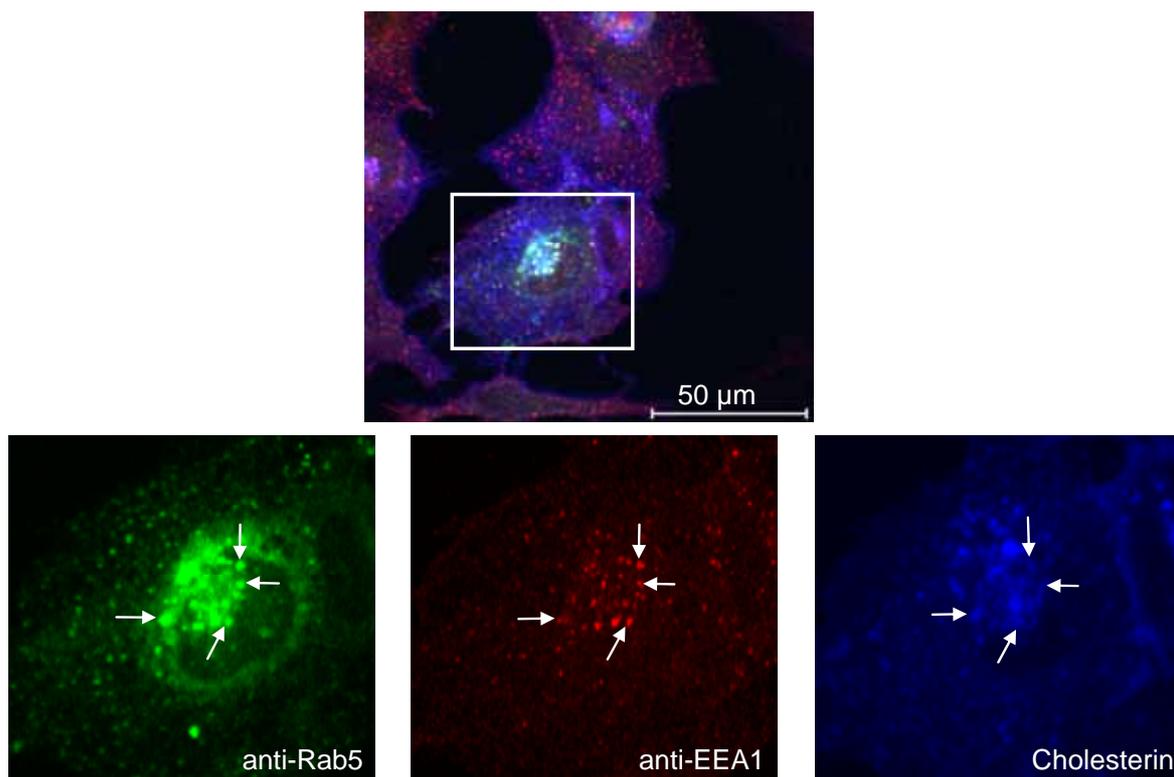


Abb. 11: Lokalisation von Rab5 und Cholesterin in intrazellulären Kompartimenten. Der Versuchsaufbau und die Transfektionsbedingungen sind mit den unter Abb. 9 beschriebenen identisch. Nach der Transfektion mit Rab5Q79L-myc-Plasmid-DNA erfolgte die einstündige Inkubation bei 37°C mit der ApoE- und Chylomikronen-enthaltenden Aufnahmelösung. Anschließend folgte die 60minütige Chase-Phase, in der die Coverslips mit 6.6 µg/ml HDL₃ inkubiert wurden. Die Fixierung und Antikörperinkubation wurden wie unter Abb. 10 beschrieben durchgeführt. Die abgebildete HUH7-Zelle zeigt je nach eingesetztem Antikörper und Wellenlänge des konfokalen Mikroskopes unterschiedlich angefärbte intrazelluläre Strukturen. Die mit einem Pfeil markierten Strukturen kolokalisieren in der „Overlay-Darstellung“.

Die Rab5Q79L-überexprimierenden HUH7-Zellen zeigen eine deutliche Anhäufung großer vesikulärer Organellen, in denen Rab5, EEA1 und Cholesterin kolokalisieren. Cholesterin scheint in diesen EEA1-positiven Vesikeln zu akkumulieren. Die Verteilung der Vesikel über das Zytoplasma ist, verglichen mit dem Rab5-Wildtyp, etwas lokalisierter mit einer Anhäufung großer Vesikel in der Zellperipherie. In COS-1-Zellen war diese Akkumulation in großen Vesikeln noch ausgeprägter (Hölttä-Vuori et al., 2002), jedoch war hier der Cholesterinefflux auch nicht durch HDL induziert worden. Rab5Q79L ist die GTPase-defiziente Form von Rab5. Rab5Q79L liegt daher immer in aktiver Form vor, so dass die homologe Verschmelzung früher Endosomen nicht durch die hydrolytische Spaltung von GTP gestoppt werden kann. Die Kolokalisation von EEA1 und Cholesterin spricht für eine Cholesterin-Akkumulation in frühen Endosomen.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass TRL-Cholesterin über Rab5-enthaltende Organellen transportiert wird, die sich als frühe Endosomen identifizieren lassen. Da diese Beobachtung auch nach HDL-Inkubation gemacht wurde und sich die Kolokalisation größtenteils in der Zellperipherie zeigte, lässt sich eine Beteiligung früher Endosomen an dem HDL-induzierten TRL-Cholesterin-Efflux vermuten.

5 Diskussion

Chylomikronen und VLDL gehören zur Gruppe der triglyzeridreichen Lipoproteine (TRL). Nach hydrolytischer Spaltung durch die LPL bilden sie die TRL-Remnants, die nach HDL-vermittelter ApoE-Anreicherung über den LDL-R und LRP1 aus dem Plasma entfernt werden. Der weitere intrazelluläre Stoffwechselweg der einzelnen TRL-Bestandteile unterscheidet sich von dem ausführlich beschriebenen Weg der LDL (Brown und Goldstein, 1986). Während der Lipidanteil der TRL in lysosomalen Kompartimenten degradiert wird, werden ApoE, LPL und andere Proteine über Recycling-Kompartimente wieder zur Plasmamembran transportiert und dort re-sezerniert (Heeren et al., 1999; Heeren et al., 2001).

Der intrazelluläre Stoffwechsel von Transferrin (Tf) und dem Transferrin-Rezeptor (TfR) gilt als Prototyp für die Erforschung von Recycling-Stoffwechselwegen. Anhand von TfR-Recyclingwegen gelang die Identifizierung von Recycling-Endosomen, die als perinukleäres Netzwerk tubulärer Membranen das so genannte Transferrin-Recycling-Kompartiment bilden (Yamashiro et al., 1984; Tooze und Hollinshead, 1991). Recycling-Endosomen sind reich an Cholesterin (Gagescu et al., 2000) und scheinen eine zentrale Rolle in der Regulierung zellulärer Cholesterin-Homöostase einzunehmen (Hölttä-Vuori et al., 2002). Für TRL-Cholesterin-Efflux und ApoE-Recycling wurde das Vorhandensein peripherer Recycling-Kompartimente beschrieben, die nicht mit dem perinukleären Transferrin-Recycling-Kompartiment identisch sind (Enrich et al., 1999; Heeren et al., 1999). HDL₃-induziertes ApoE-Recycling geht mit der Internalisierung von ApoA-I und gesteigertem Cholesterinefflux einher (Heeren et al., 2003). ApoA-I konnte hierbei in frühen Endosomen nachgewiesen werden, die später extrazellulär an HDL gebundenes ApoE und Cholesterin enthielten. Die Unterscheidung zwischen frühen Endosomen (EE) und Recycling-Endosomen (RE) erfolgt hauptsächlich anhand morphologischer Gesichtspunkte, dem gerichteten Transport von Metaboliten und der räumlichen Aufteilung der unterschiedlichen Kompartimente in der Zelle. Für die Beziehungen zwischen den Kompartimenten und für den genauen Mechanismus des Austausches von Stoffen bestehen unterschiedliche Modelle. Einerseits werden EE und RE als getrennt voneinander bestehende Kompartimente gesehen, die über vesikulären Transport miteinander verbunden sind (Yamashiro et al., 1984; Ghosh und Maxfield, 1995). RE könnten aber auch aus tubulären Ausläufern der EE hervorgehen, die dann in die perinukleäre Gegend wandern. Der Nachweis der De-Novo-Synthese von RE in der Zellperipherie (Sönnichsen et al., 2000; Sheff, Pelletier et al., 2002) und das Vorkommen

des RE-spezifischen Markers Rab11 in EE (Sönnichsen et al., 2000) scheinen dieses Modell zu unterstützen. Der TfR-Transport aus RE zur Plasmamembran findet über „Clathrin-Coated-Vesicle“-Abschnürung aus den RE statt und ist Dynamin-abhängig (van Dam und Stoorvogel, 2002). Tf-Recycling findet jedoch nicht ausschließlich über RE statt, ein signifikanter Anteil des Tf wird direkt über EE zur Plasmamembran recycelt (Hopkins und Trowbridge, 1983; Mayor et al., 1993; Presley et al., 1993; Hopkins et al., 1994; Gruenberg und Maxfield, 1995; Sheff, Pelletier et al., 2002). Dieses direkte Recycling über EE ist PI-3-Kinase-abhängig und kann durch Inhibitoren dieses Enzymes wie LY294002 und Wortmannin gehemmt werden. LY294002-Inkubation von HeLa-Zellen etwa führte zu Tf-Akkumulation in EE (van Dam und Stoorvogel, 2002). BFA inhibiert die Vesikelabschnürung aus RE und somit den Transportweg zwischen RE und der Plasmamembran (Stoorvogel et al., 1996). Zusammen eingesetzt haben LY294002 und BFA einen synergistischen Effekt, da beide Tf-Recyclingwege blockiert werden (van Dam et al., 2002). Auch der Cholesterinefflux in HUH7-Wildtyp-Zellen ließ sich durch die Inhibitoren des intrazellulär vesikulären Transportes beeinflussen (Abb. 5.1-6.3). Nach Inkubation mit ³H-Cholesterin-Chylomikronen und LPL-vermittelter Aufnahme in die Hepatozyten wurde der radioaktive Efflux unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Die mit LY294002, BFA und beiden Inhibitoren versetzten Ansätze zeigten eine Verminderung des zellulären Cholesterineffluxes, der jedoch nicht signifikant war (Abb. 5.3). Bei Inkubation mit LY294002, ohne HDL-Zugabe, verminderte sich der Cholesterinefflux auf das 0,85fache des Ausgangswertes. Ein synergistischer Effekt beider Inhibitoren konnte in den mit ³H-Cholesterin-Chylomikronen inkubierten Ansätzen nicht beobachtet werden. Die Cholesterinefflux-hemmende Wirkung war bei alleiniger LY294002-Inkubation jedoch immer stärker ausgeprägt, als bei bloßer BFA-Zugabe (Abb. 5.3). Hierzu passt die Beobachtung, dass Tf-Recycling aus HeLa-Zellen durch alleinige BFA-Inkubation kaum beeinflusst wurde, obwohl die „Clathrin-Coated-Vesicle“-Bildung komplett durch BFA inhibiert war (van Dam et al., 2002). Als mögliche Erklärung galt das Ausweichen des Recyclingweges auf PI-3-Kinase-abhängiges Recycling über EE, unter Umgehung des durch BFA gehemmten Recyclings über RE. Die sich aus diesem Zusammenhang ergebende synergistische Wirkung der Inhibitoren LY294002 und BFA auf den zellulären Tf-Efflux (van Dam et al., 2002) konnte für HDL-induzierten Cholesterinefflux aus intrazellulären TRL-Cholesterin-reichen Kompartimenten nicht bestätigt werden (Abb. 5.1-5.3). Dies könnte damit zusammenhängen, dass HDL- und ApoE-gesteuerte Cholesterin-Recycling-Kompartimente nicht mit dem perinukleären Transferrin-Recycling-Kompartiment identisch sind (Enrich et al., 1999; Heeren et al.,

1999) und somit einer anderen Regulierung und Kinetik unterliegen. Bei nicht TRL-spezifischer Cholesterin-Anreicherung später Endosomen und prälysosomaler Cholesterin-Pools mit ^3H -Cholesterin-LDL bewirkte die BFA/LY294002-Kombination jedoch einen signifikant verminderten Cholesterinefflux (Abb. 6.3). Auch unter HDL-Zugabe zeigte die Inkubation mit beiden Inhibitoren ein Absinken des Cholesterineffluxes, verglichen mit dem Ansatz ohne Inhibitoren. Der nicht signifikanten Wirkung von LY294002 und BFA auf den HDL-induzierten Cholesterinefflux könnte ebenso zugrunde liegen, dass für die Inkubation mit LY294002 in manchen Fällen auch eine Zunahme der Vesikelverschmelzung beobachtet wurde (Simonsen et al., 1998; Bright et al., 2001; Chen und Wang, 2001; Futter et al., 2001; Lawe et al., 2002). Weiterhin könnten technische Fehler oder eine zu geringe Versuchszahl eine Rolle spielen. Die teilweise Hemmung des Cholesterineffluxes durch LY294002 steht im Widerspruch zu dem sogar gesteigerten HDL-induzierten TRL-Cholesterin-Efflux der mit BFA inkubierten Zellen (Abb. 5.3). Nach ^3H -Cholesterin-LDL-Inkubation ist dieser Effekt umgekehrt; der Efflux bei Inhibition durch LY294002 ist, verglichen mit der BFA-Probe, gesteigert. Recycling kann von verschiedenen Stationen des endozytotischen Stoffwechselweges aus stattfinden. Für Tf werden zwei unterschiedlich regulierte Recycling-Stoffwechselwege beschrieben (s.o.). Eine durch BFA induzierte Hemmung der „Clathrin-Coated-Vesicle“-Bildung könnte beispielsweise - über Blockierung des RE-Cholesterin-Effluxweges - zu gesteigertem Efflux über einen zweiten, effektiveren und durch HDL besser zu steigernden TRL-Cholesterin-Effluxweg führen. Für Tf-Recycling in CHO-Zellen wurde gezeigt, dass 25% des endozytierten Tf über RE recyceln, während 75% mit hoher Geschwindigkeit direkt über EE recyceln (Sheff, Kroschewski et al., 2002). Der durch LY294002 inhibierte direkte TfR-Transport von EE zur Plasmamembran hatte auch den deutlichsten negativen Effekt auf TfR-Recycling (van Dam et al., 2002). Fehlender Synergismus der Inhibitoren auf die unterschiedlichen ^3H -Cholesterin-TRL-Recyclingwege wäre in modifizierten Ansätzen erneut zu überprüfen, könnte aber auch erklärt werden durch die BFA-induzierte Verlagerung des Recyclings auf einen zweiten, effektiveren Weg, bei nur teilweiser Hemmung dieses Weges durch LY294002. Diese gegenläufigen Effekte und die nur inkomplette Hemmung durch LY294002 würde die in Abb.5.2-5.3 gezeigte Annäherung der BFA-/LY294002-Ansätze an die entsprechenden Proben ohne Inhibitoren erklären. Die Cholesterinefflux-induzierende Wirkung von HDL ist bekannt (Fielding und Fielding, 2001; von Eckardstein et al., 2001; Oram, 2002). HDL-induzierter Cholesterinefflux war nach ^3H -Cholesterin-TRL-Markierung deutlich stärker ausgeprägt, als nach ^3H -Cholesterin-LDL-Inkubation (Abb. 5.3, 6.3). Dies könnte an einer TRL-spezifischen Anreicherung intrazellulärer Kompartimente liegen, die

besonders effektiv HDL-vermittelt Cholesterin recyceln. Nach ^3H -Cholesterin-LDL-Anreicherung später Endosomen und prälysosomaler Cholesterin-Pools konnte jedoch durch HDL-Inkubation folglich prozentual weniger Cholesterin mobilisiert werden. Ein direktes, effektives Recycling aus EE zur Plasmamembran, das einer Hemmung durch LY294002 unterliegt, wurde beschrieben (Sheff, Pelletier et al., 2002; van Dam et al., 2002). LY294002 reduzierte, wenn auch nicht deutlich, den HDL-induzierten Cholesterinefflux aus ^3H -Cholesterin-TRL-markierten Zellen (Abb. 5.3). Dieser Effekt blieb nach ^3H -Cholesterin-LDL-Inkubation aus (Abb. 6.3). Recycling über einen zweiten, schnelleren und Recycling-Endosomen-unabhängigen Stoffwechselweg wurde neben Tf (Iacopetta und Morgan, 1983; Sheff, Pelletier et al., 2002) auch für fluoreszierende Lipidanaloga (Hao und Maxfield, 2000), den AT_1 -Angiotensin-Rezeptor (Hunyady et al., 2002) und HDL (Takahashi und Smith, 1999) beschrieben. HDL-induzierter Cholesterinefflux geht mit der Internalisierung des von den HDL stammenden ApoA-I einher (Takahashi und Smith, 1999; Bortnick et al., 2000; Oram et al., 2000; Zheng et al., 2001; Heeren et al., 2003). ApoA-I kolokalisiert mit Cholesterin und ApoE in EEA1-positiven Endosomen und vermittelt somit die Entstehung ApoE- und Cholesterin-angereicherter HDL-Partikel (Heeren et al., 2003). EEA1 ist als Rab5-Effektorprotein an Transport und Fusion früher Endosomen beteiligt (Christoforidis, McBride et al., 1999) und gilt wegen seines exklusiven Bindungsverhaltens als spezifischer Marker früher Endosomen (Rubino et al., 2000; Wilson et al., 2000). Auch die deutlich veränderte intrazelluläre Cholesterinverteilung in Rab5-überexprimierenden COS-1-Zellen ließ eine maßgebliche Beteiligung früher Endosomen am endozytotischen Cholesterinstoffwechsel vermuten (Hölttä-Vuori et al., 2002).

Neben Rho (Imamura et al., 1998) und ARF (Chavrier und Goud, 1999; Gu und Gruenberg, 1999; Donaldson und Jackson, 2000) bilden Rab-Proteine eine Gruppe von GTPasen, die über die intrazelluläre Regulierung von Vesikelentstehung, Vesikeltransport und Vesikelfusion eine bedeutende Rolle im endozytotischen Stoffwechsel spielen (Schimmöller et al., 1998; Gonzalez und Scheller, 1999; Mohrmann und van der Sluijs, 1999; Zerial und McBride, 2001). In ihrer Vesikeltransport-regulierenden Funktion zirkulieren Rab-Proteine zwischen Zellmembran und Zytoplasma und können in einer aktiven, GTP-gebundenen und einer inaktiven, GDP-gebundenen Form vorliegen (Soldati et al., 1994; Pfeffer et al., 1995; Wu et al., 1996). Über eine Vielzahl komplexer Interaktionen mit unterschiedlichen Effektorproteinen reguliert, nehmen Rab-Proteine spezifische Aufgaben im intrazellulären Stoffwechsel wahr (Christoforidis, McBride et al., 1999). Überexpression von Rab-Proteinen greift in diese komplexen Regelmechanismen

ein und kann zu Veränderungen Rab-kontrollierter Stoffwechselwege führen. Rab-Protein-überexprimierende HUH7-Zellen zeigten, verglichen mit nicht transfizierten HUH7-Zellen, Veränderungen des zellulären Cholesterineffluxes (Abb. 7.1-8.3). Nach ³H-Cholesterin-Chylomikronen-Inkubation hatten Rab5-überexprimierende Zellen einen signifikant gesteigerten Cholesterinefflux und die deutlichste Effluxsteigerung aller Ansätze unter HDL-Inkubation (Abb. 7.3). Rab5 reguliert den frühen endozytotischen Stoffwechselweg von der Coated-Pit-Abschnürung bis zur homologen Fusion früher Endosomen (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992; McLauchlan et al., 1998) und deren zytoskelettalen Transport über Mikrotubuli (Nielsen et al., 1999). Das bereits erwähnte EEA1 ist spezifisch für frühe Endosomen und nur eines der über 20 unterschiedlichen Effektorproteine, über die Rab5 seine Wirkung entfaltet (Christoforidis, McBride et al., 1999; Rubino et al., 2000). HDL vermittelt TRL-Cholesterin-Efflux über ApoA-I-Internalisierung in EEA1-positive Vesikel (Heeren et al., 2003). Eine mögliche Erklärung für HDL-induziert gesteigerten Cholesterinefflux aus Rab5-überexprimierenden Zellen könnte vermehrter Cholesterintransport oder vermehrte ApoA-I-Internalisierung in diese Vesikel sein. Auch Überexpression der Rab5-Effektorproteine Rabaptin-5 und Rabenosyn-5 hatte eine Hochregulierung des schnellen Recyclingweges über frühe Endosomen zur Folge, während Transport in das perinukleäre Recycling-Kompartiment vermindert war (De Renzis et al., 2002). Inhibiertes Cholesterin-Recycling, bei massiv vergrößerten frühen Endosomen, in Rab5Q79L-überexprimierenden COS-1-Zellen, ließ ebenfalls eine Beteiligung dieser Kompartimente am Cholesterinefflux vermuten (Hölttä-Vuori et al., 2002). Die mit der GTPase-defizienten Rab5-Mutante - Rab5Q79L - transfizierten Zellen wiesen insgesamt den geringsten TRL-Cholesterin-Efflux der transfizierten Ansätze auf und zeigten eine geringere Effluxsteigerung durch HDL-Inkubation, als die Rab5-Normvariante (Abb. 7.3). Diese relative Effluxhemmung passt zu der Beobachtung, dass Rab5Q79L-Überexpression zur bereits erwähnten Entstehung stark vergrößerter früher Endosomen führte (Stenmark et al., 1994) und dieser Effekt in COS-1-Zellen mit massiver Cholesterin-Akkumulation in frühen Endosomen und reduziertem Recycling zur Plasmamembran einherging (Hölttä-Vuori et al., 2002). Hemmung des Rab5-Effektorproteines PI-3-Kinase (Christoforidis, Miaczynska et al., 1999) (s.o.) führte ebenfalls zu defektem Recycling und hatte TfR-Akkumulation in frühen Endosomen zur Folge (van Dam und Stoorvogel, 2002). Der ohne HDL im Vergleich zu Rab4 verminderte Efflux in den Rab5-überexprimierenden Ansätzen könnte auch als relative Cholesterin-Akkumulation in Rab5-enthaltenden Recycling-Kompartimenten gewertet werden (Abb. 7.2). Die für Rab4 beschriebene hemmende Wirkung auf die Fusion früher Endosomen (Chavrier et al., 1997) und die den Transport

aus frühen Endosomen steigernde Funktion von Rab4 (Mohrmann und van der Sluijs, 1999) könnten hierbei eine Rolle spielen. Auffällig war, dass der absolute Cholesterinefflux der Rab5- und Rab5Q79L-transfizierten Zellen ohne HDL-Inkubation unter dem der nicht transfizierten Zellen lag (Abb. 7.1), während die prozentualen Werte (Abb. 7.2) einen für die Rab-überexprimierenden Zellen stärkeren Efflux zeigten. Eine verminderte TRL-Cholesterin-Aufnahme durch Rab5-bedingte Akkumulation in TRL-Cholesterin-spezifischen Kompartimenten, die wirksam Cholesterin recyceln, könnte dies erklären. Der für den AT_{1A}-Rezeptor beschriebene schnelle Recyclingweg aus frühen Endosomen (Hunyady et al., 2002) und die direkte Interaktion von Rab5a mit diesem Rezeptor (Seachrist et al., 2002) sind ebenfalls ein möglicher Hinweis auf Rab5-Regulation eines schnellen Recyclingweges. Unter HDL-Inkubation liegen absolute (Abb. 7.1) und prozentuale (Abb. 7.2) Cholesterineffluxwerte der Rab-überexprimierenden Ansätze oberhalb der nicht transfizierten Zellen und sind zum Teil signifikant gesteigert. Akkumuliertes TRL-Cholesterin scheint sich aus den beteiligten Kompartimenten besonders effektiv HDL-vermittelt mobilisieren zu lassen. Auch Rab6-Überexpression hatte einen gesteigerten Cholesterintransport zur Folge (Hölttä-Vuori et al., 2002). Cholesterin-Recycling zur Plasmamembran war jedoch nicht erhöht, da dieses Rab-Protein den retrograden Transport aus dem Golgi-Apparat in das Endoplasmatische Retikulum reguliert (White et al., 1999). Rab4 ist an direktem Rezeptor-Recycling aus frühen Endosomen beteiligt (Daro et al., 1996) und wurde auch in Recycling-Endosomen nachgewiesen (Mohrmann und van der Sluijs, 1999). Rab4-überexprimierende Zellen wiesen ebenfalls einen deutlich gesteigerten Grundefflux auf, der sich jedoch, verglichen mit Rab5, weniger stark durch HDL-Inkubation erhöhen ließ. Während Rab4 überwiegend Transport in das perinukleäre Transferrin-Recycling-Kompartiment reguliert (van der Sluijs et al., 1992; Sheff et al., 1999), findet HDL- und ApoE-vermittelter Cholesterinefflux über periphere Recycling-Endosomen statt, die von dem Transferrin-Recycling-Kompartiment abzugrenzen sind (Enrich et al., 1999; Heeren et al., 1999; Heeren et al., 2003). Rab4-abhängiger Cholesterintransport zu Recycling-Endosomen könnte erklären, warum sich Cholesterin aus Rab4-überexprimierenden Zellen, verglichen mit Rab5, schlechter HDL-vermittelt mobilisieren lässt (Abb. 7.2, 7.3). Das zu Recycling-Endosomen transportierte Cholesterin entzieht sich anscheinend zum Teil der Kontrolle durch HDL. Die De-Novo-Synthese von RE in der Zellperipherie (Sönnichsen et al., 2000; Sheff, Pelletier et al., 2002) und das parallele Vorkommen unterschiedlicher Rab-Domänen in endosomalen Membranen (Trischler et al., 1999; Sönnichsen et al., 2000) sprechen für eine dynamische, Rab-Protein-vermittelte Kommunikation endosomaler Kompartimente, ohne vesikuläre

Zwischenstufen. Rab-Domänen können hierbei, über Effektorproteine reguliert, in Kontakt treten und so den Transport zwischen intrazellulären Kompartimenten kontrollieren (Miaczynska und Zerial, 2002). Aufgenommene Metabolite wurden zuerst in Rab5-positiven Endosomen lokalisiert und dann über Rab5- und Rab4-enthaltende Vesikel in Rab4- und Rab11-positiven Endosomen transportiert (Sheff et al., 1999; Trischler et al., 1999; Sönnichsen et al., 2000; Wilson et al., 2000). Überexpression von Rab-Effektoren verdeutlicht die hohe Variabilität des Rab-regulierten Transportes. Rabaptin-5 und Rabenosyn-5 sind divalente Rab-Effektoren, die sowohl mit aktivem Rab5 als auch mit aktivem Rab4 interagieren können. Überexpression dieser Effektoren bewirkte eine vermehrte Assoziation von Rab4- und Rab5-Domänen mit folglich gesteigertem Recycling über frühe Endosomen, während der Anteil Rab4- und Rab11-enthaltender Strukturen und Transport in perinukleäre Recycling-Endosomen vermindert waren (De Renzis et al., 2002). Bei isolierter Rab4-Überexpression wären demnach, abhängig von Rab-Effektoren und den zu transportierenden Molekülen (s.u.), Veränderungen beider Recyclingwege denkbar. Dies könnte variierenden Cholesterinefflux und uneinheitliche Ergebnisse bei diesem Zelltyp erklären. Nach TRL-Cholesterin-Markierung signifikant gesteigertes Recycling aus Rab4-überexprimierenden Zellen (Abb. 7.2) und die nicht signifikante Steigerung nach LDL-Cholesterin-Markierung (Abb. 8.2) könnte Ausdruck des LDL-spezifischen Transportes zu Lysosomen sein (Brown und Goldstein, 1986) oder an einem Rab4-vermittelten LDL-spezifischen Transport in das weniger effektive perinukleäre Recycling-Kompartiment liegen. Das in Recycling-Endosomen Rab11-überexprimierender Zellen akkumulierte freie Cholesterin jedoch stammte nicht direkt von LDL, obwohl auch diese Zellen zuvor mit LDL-Cholesterin inkubiert worden waren (Hölttä-Vuori et al., 2002). Recycling-Endosomen scheinen dennoch eine bedeutende Rolle in der Regulierung zellulärer Cholesterinhomöostase zu spielen. RE sind reich an Cholesterin (Gagescu et al., 2000; Hao und Maxfield, 2000) und werden von Rab11 reguliert (Ullrich et al., 1996; Ren et al., 1998; Wilcke et al., 2000). Rab11-überexprimierende Zellen speicherten vermehrt Cholesterin in RE, und Cholesterin-Recycling zur Plasmamembran war blockiert (Hölttä-Vuori et al., 2002). Eine hohe Affinität der RE-Membran für Cholesterin (Hao et al., 2001) und der im Vergleich zu anderen Endosomen plastischere Charakter von RE (Wilcke et al., 2000) könnten sie als Speichervesikel prädisponieren. In keinem der gezeigten Ansätze (Abb. 7.1-7.3) mit Rab-Überexpression kam es zu einem total blockierten TRL-Cholesterin-Efflux. Das meist sogar gesteigerte Recycling könnte Ausdruck einer Rab-vermittelten TRL-Cholesterin-Akkumulation in schnellen Recycling-Kompartimenten sein, die besonders unter HDL- und ApoE-Inkubation signifikant gesteigert Cholesterin recyceln (Abb. 7.3).

TRL- und LDL-spezifischer Cholesterinefflux könnte auch damit zusammenhängen, dass transportierte Moleküle selbst Rab-Effektoren sein können und so über direkte Interaktion mit Rab-Proteinen ihr eigenes intrazelluläres Schicksal steuern (Seachrist et al., 2002; van IJzendoorn et al., 2002). Zu beachten ist weiterhin, dass die Transfektionseffizienz in HUH7-Zellen nur ca. 5-10% beträgt. In modifizierten Versuchsansätzen wäre daher weiterhin zu klären, ob mit steigender Transfektionsrate graduelle Effekte auf den Cholesterinefflux einhergehen können, von gesteigerter Akkumulation bis hin zu einem totalen Effluxblock. Außerdem wäre der Einfluß eines anderen Zelltypes auf die Transfektionseffizienz und das Cholesterinefflux-Verhalten zu überprüfen. Bei Markierung durch ^3H -Cholesterin-LDL-Inkubation (Abb. 8.1-8.3) könnte der im Gegensatz zur TRL-Markierung leicht gesteigerte absolute Efflux (Abb. 8.1) die Markierung später Endosomen und prälysosomaler Cholesterin-Pools und einen damit verbundenen Anstieg an aufgenommener Radioaktivität widerspiegeln. Die prozentualen Werte des recycelten Cholesterins waren jedoch bei TRL-Markierung, verglichen mit den LDL-markierten Ansätzen, mehr als doppelt so hoch (Abb. 7.2, 8.2). Akkumulation von DiI-LDL-Cholesterin und dem LDL-R in Rab5-positiven Organellen (Hölttä-Vuori et al., 2002) zeigt, dass LDL-Cholesterin auch über frühe Endosomen aufgenommen wird, wo es HDL-Recycling unterliegen könnte. Der weitere intrazelluläre Transportweg des LDL-Cholesterins unterscheidet sich jedoch von dem der TRL (Tabas et al., 1990; Lombardi, Mulder et al., 1993). Verminderte lysosomale Degradation von TRL-Cholesterin (Rensen et al., 2000; Heeren et al., 2001) könnte TRL-Cholesterin Recyclingschritten länger zugänglich machen. Die TRL-markierten Ansätze zeigten auch ohne HDL-Zugabe einen gesteigerten Grundefflux und zusätzliche HDL-Inkubation führte zu signifikant gesteigertem Cholesterinefflux aus den TRL-Cholesterin-enthaltenden Kompartimenten (Abb. 7.2, 8.2). Auch hier könnten TRL-spezifischer Cholesterinefflux aus HDL-sensitiven Recycling-Kompartimenten (Heeren et al., 2003) und der für HDL beschriebene schnelle Recyclingweg (Takahashi und Smith, 1999) eine bedeutende Rolle spielen. Durch die klassische intrazelluläre Degradation von LDL-Cholesterin (Brown und Goldstein, 1986) hingegen könnten Cholesterin-Recyclingwege zum Teil umgangen werden. Durch Mikroinjektion des Rab-GDP-Dissoziations-Inhibitors (GDI) (Pfeffer et al., 1995; Wu et al., 1996) konnte die Cholesterinmobilisation aus späten Endosomen und Lysosomen unterbunden werden (Hölttä-Vuori et al., 2000). Interessant wäre es daher auch, die Auswirkungen von Rab7-Überexpression auf den Cholesterin-Stoffwechsel und den möglicherweise von diesem Rab-Protein regulierten Transport zwischen frühen

Endosomen und Lysosomen zu untersuchen (Mullock et al., 1994; Méresse et al., 1995; Ward et al., 1997; Press et al., 1998; Bucci et al., 2000).

Welche endosomalen Kompartimente aber sind an dem HDL- und ApoE-vermittelten TRL-Cholesterin-Efflux (Heeren et al., 2003) beteiligt? Bekannt ist, dass dieses Recycling über periphere Recycling-Kompartimente läuft, die von dem klassischen Transferrin-Recycling-Kompartiment abzugrenzen sind (Enrich et al., 1999; Heeren et al., 1999; Mamdouh et al., 2000). LY294002 hemmt über Interaktion mit der PI-3-Kinase schnelles Recycling aus frühen Endosomen (Hunyady et al., 2002; van Dam und Stoorvogel, 2002) und vermindert HDL-induzierten Cholesterinefflux (Abb. 5.3). Auch Rab5 kommt hauptsächlich in frühen Endosomen vor und reguliert den frühen endozytotischen Stoffwechselweg (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992). EEA1 ist wie die PI-3-Kinase ein spezifisch in frühen Endosomen vorkommendes Rab5-Effektorprotein (Christoforidis, McBride et al., 1999; Christoforidis, Miaczynska et al., 1999). Rab5, EEA1 und Cholesterin kolokalisierten nach HDL₃-Inkubation in über das Zytoplasma verteilten vesikulären Strukturen (Abb. 10). HDL₃-Inkubation führt über ApoA-I-Internalisierung in EEA1-positive Endosomen zu gesteigertem TRL-Cholesterin-Efflux (Heeren et al., 2003). Passend zu diesen Beobachtungen führt Rab5Q79L-Überexpression zu deutlich vermindertem Cholesterin-Recycling zur Plasmamembran und Cholesterin-Akkumulation in großen peripheren Vesikeln (Stenmark et al., 1994; Hölttä-Vuori et al., 2002). In Rab5Q79L-überexprimierenden Zellen konnte neben dieser deutlichen Cholesterin-Akkumulation peripherer Vesikel auch Kolokalisation für Rab5, EEA1 und Cholesterin in diesen Endosomen gezeigt werden (Abb. 11). Ein Hinweis auf blockiertes Recycling aus den Rab5Q79L-überexprimierenden Kompartimenten könnte neben der beobachteten Akkumulation auch die im Vergleich zum Rab5-Wildtyp (Abb. 10) weniger diffuse intrazelluläre Verbreitung der Cholesterin-beladenen Vesikel sein.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass ApoE- und Cholesterintransport über periphere Recycling-Endosomen zurück zur Plasmamembran geführt werden. Da das HDL-induzierte Recycling nicht durch PI-3-Kinase-Inhibitoren blockiert werden konnte, wird die Hypothese eines eigenständigen peripheren Recycling-Endosoms bestätigt. Die genaue Charakterisierung dieses spezifischen Recycling-Endosoms verspricht neue Erkenntnisse für den intrazellulären ApoE-abhängigen Cholesterintransport.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die an dem HDL-induzierten ApoE-Recycling und Cholesterinefflux beteiligten endosomalen Kompartimente identifiziert und die Regulierung dieses Stoffwechselweges untersucht. Dazu wurden Chylomikronen aus dem Plasma von Patienten mit Hyperchylomikronämie mit radioaktivem Cholesterin markiert und der HDL-induzierte Cholesterinefflux in humanen Hepatomazellen untersucht. Um den Efflux aus späten Endosomen zu untersuchen, wurden die Zellen mit radioaktiv-markierten LDL inkubiert. Der Cholesterinefflux wurde im ersten Teil der Arbeit unter Einsatz von LY294002 und Brefeldin A bestimmt. Während LY294002 spezifisch die an der Fusion früher Endosomen beteiligte PI-3-Kinase hemmt, verhindert Brefeldin A den Vesikeltransport aus dem Trans-Golgi-Netzwerk. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Inhibitoren weder den HDL-vermittelten Cholesterinefflux noch das HDL-induzierte ApoE-Recycling beeinflussen, so dass die molekularen Mechanismen des HDL-vermittelten vesikulären ApoE-Recyclings und des Cholesterineffluxes nicht genauer definiert werden konnten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die endosomalen Kompartimente, die am HDL-induzierten Cholesterinefflux und ApoE-Recycling beteiligt sind, näher charakterisiert. Der Fokus bei diesen Untersuchungen lag auf Rab4 und Rab5, beides Proteine die den Transport früher Endosomen regulieren. Um die Bedeutung von Rab4 und Rab5 für den Cholesterinefflux zu untersuchen, wurden die oben erläuterten Pulse-Chase-Experimente in Hepatomazellen durchgeführt, die Rab4 bzw. Rab5 überexprimieren. Der in diesen Zellen teilweise signifikant veränderte Cholesterinefflux zeigt die Beteiligung dieser Proteine an der Regulierung des zellulären Cholesterineffluxes. Vor allem für Rab5 konnte nach TRL-Cholesterin- und ApoE-Anreicherung eine signifikante Steigerung des HDL-induzierten Cholesterineffluxes gezeigt werden. Rab5-Überexpression scheint zu einer Cholesterin-Akkumulation in frühen endosomalen Kompartimenten zu führen, aus denen sich Cholesterin besonders effektiv HDL-vermittelt mobilisieren lässt. Diese endosomalen Kompartimente konnten abschließend als frühe Endosomen identifiziert werden, da eine Kolo-kalisation von Rab5, Cholesterin und EEA1 in peripheren Recycling-Endosomen mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie gezeigt werden konnte. Zusammenfassend wurde somit im zweiten Teil der Arbeit eine Beteiligung von Rab5 und Rab4 an der Regulation des HDL-induzierten Cholesterineffluxes im Zusammenhang mit dem ApoE-Recycling bewiesen.

7 Literaturverzeichnis

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. und Krieger, M. (1996). "Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor." *Science* **271**(5248): 518-20.
- Ahle, S., Mann, A., Eichelsbacher, U. und Ungewickel, E. (1988). "Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane." *Embo J* **7**: 919-929.
- Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M. C. und Zerial, M. (1994). "Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes." *Embo J* **13**(22): 5262-73.
- Altmann, S. W., Davis, H. R., Jr., Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N. und Graziano, M. P. (2004). "Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption." *Science* **303**(5661): 1201-4.
- Anderson, R. G., Brown, M. S. und Goldstein, J. L. (1977). "Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts." *Cell* **10**(3): 351-64.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G. und Gruenberg, J. (1993). "Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes." *J Cell Biol* **123**(6 Pt 1): 1373-87.
- Barbieri, M. A., Hoffenberg, S., Roberts, R., Mukhopadhyay, A., Pomrehn, A., Dickey, B. F. und Stahl, P. D. (1998). "Evidence for a symmetrical requirement for Rab5-GTP in in vitro endosome-endosome fusion." *J Biol Chem* **273**(40): 25850-5.
- Barbieri, M. A., Roberts, R. L., Mukhopadhyay, A. und Stahl, P. D. (1996). "Rab5 regulates the dynamics of early endosome fusion." *Biocell* **20**(3): 331-8.
- Beil, F. U., Fojo, S. S., Brewer, H. B., Jr., Greten, H. und Beisiegel, U. (1992). "Apolipoprotein C-II deficiency syndrome due to apo C-II Hamburg: clinical and biochemical features and HphI restriction enzyme polymorphism." *Eur J Clin Invest* **22**(2): 88-95.
- Beisiegel, U. (1995). "Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism." *Curr Opin Lipidol* **6**(3): 117-22.
- Beisiegel, U., Weber, W. und Bengtsson-Olivecrona, G. (1991). "Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(19): 8342-6.
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. und Stanley, K. K. (1989). "The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein." *Nature* **341**(6238): 162-4.
- Bielicki, J. K., McCall, M. R. und Forte, T. M. (1999). "Apolipoprotein A-I promotes cholesterol release and apolipoprotein E recruitment from THP-1 macrophage-like foam cells." *J Lipid Res* **40**(1): 85-92.

- Bortnick, A. E., Rothblat, G. H., Stoudt, G., Hoppe, K. L., Royer, L. J., McNeish, J. und Francone, O. L. (2000). "The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines." *J Biol Chem* **275**(37): 28634-40.
- Bradley, W. A. und Gianturco, S. H. (1986). "ApoE is necessary and sufficient for the binding of large triglyceride-rich lipoproteins to the LDL receptor; apoB is unnecessary." *J Lipid Res* **27**(1): 40-8.
- Brady, R. O., Filling-Katz, M. R., Barton, N. W. und Pentchev, P. G. (1989). "Niemann-Pick disease types C and D." *Neurol Clin* **7**(1): 75-88.
- Bright, N. A., Lindsay, M. R., Stewart, A. und Luzio, J. P. (2001). "The relationship between luminal and limiting membranes in swollen late endocytic compartments formed after wortmannin treatment or sucrose accumulation." *Traffic* **2**(9): 631-42.
- Brodsky, F. M. (1988). "Living with clathrin: its role in intracellular membrane traffic." *Science* **242**(4884): 1396-402.
- Brown, M. S. und Goldstein, J. L. (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." *Science* **232**(4746): 34-47.
- Brown, M. S. und Goldstein, J. L. (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." *Cell* **89**(3): 331-40.
- Brown, M. S. und Goldstein, J. L. (1999). "A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11041-8.
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B. und Zerial, M. (1992). "The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway." *Cell* **70**(5): 715-28.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. und van Deurs, B. (2000). "Rab7: a key to lysosome biogenesis." *Mol Biol Cell* **11**(2): 467-80.
- Calhoun, B. C., Lapierre, L. A., Chew, C. S. und Goldenring, J. R. (1998). "Rab11a redistributes to apical secretory canaliculus during stimulation of gastric parietal cells." *Am J Physiol* **275**(1 Pt 1): C163-70.
- Carroll, K. S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P. und Pfeffer, S. R. (2001). "Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47." *Science* **292**(5520): 1373-6.
- Casanova, J. E., Wang, X., Kumar, R., Bhartur, S. G., Navarre, J., Woodrum, J. E., Altschuler, Y., Ray, G. S. und Goldenring, J. R. (1999). "Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells." *Mol Biol Cell* **10**(1): 47-61.
- Chavrier, P. und Goud, B. (1999). "The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport." *Curr Opin Cell Biol* **11**(4): 466-75.
- Chavrier, P., van der Sluijs, P., Mishal, Z., Nagelkerken, B. und Gorvel, J. P. (1997). "Early endosome membrane dynamics characterized by flow cytometry." *Cytometry* **29**(1): 41-9.

- Chen, W., Feng, Y., Chen, D. und Wandinger-Ness, A. (1998). "Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor." *Mol Biol Cell* **9**(11): 3241-57.
- Chen, W., Silver, D. L., Smith, J. D. und Tall, A. R. (2000). "Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1- mediated cholesterol efflux in macrophages." *J Biol Chem* **275**(40): 30794-800.
- Chen, W., Sun, Y., Welch, C., Gorelik, A., Leventhal, A. R., Tabas, I. und Tall, A. R. (2001). "Preferential ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux from late endosomes/lysosomes." *J Biol Chem* **276**(47): 43564-9.
- Chen, W. J., Goldstein, J. L. und Brown, M. S. (1990). "NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor." *J Biol Chem* **265**(6): 3116-23.
- Chen, X. und Wang, Z. (2001). "Regulation of epidermal growth factor receptor endocytosis by wortmannin through activation of Rab5 rather than inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase." *EMBO Rep* **2**(9): 842-9.
- Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D. und Zerial, M. (1999). "The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking." *Nature* **397**(6720): 621-5.
- Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S. C., Waterfield, M. D., Backer, J. M. und Zerial, M. (1999). "Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors." *Nat Cell Biol* **1**(4): 249-52.
- Daro, E., van der Sluijs, P., Galli, T. und Mellman, I. (1996). "Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9559-9564.
- De Duve, C. und Wattiaux, R. (1966). "Functions of lysosomes." *Annu Rev Physiol* **28**: 435-92.
- De Renzis, S., Sonnichsen, B. und Zerial, M. (2002). "Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes." *Nat Cell Biol* **4**(2): 124-33.
- Dirac-Svejstrup, A. B., Sumizawa, T. und Pfeffer, S. R. (1997). "Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI." *Embo J* **16**(3): 465-72.
- Donaldson, J. G. und Jackson, C. L. (2000). "Regulators and effectors of the ARF GTPases." *Curr Opin Cell Biol* **12**(4): 475-82.
- Duman, J. G., Tyagarajan, K., Kolsi, M. S., Moore, H. P. und Forte, J. G. (1999). "Expression of rab11a N124I in gastric parietal cells inhibits stimulatory recruitment of the H⁺-K⁺-ATPase." *Am J Physiol* **277**(3 Pt 1): C361-72.
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J. J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. und Goud, B. (1998). "Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6." *Science* **279**(5350): 580-5.

- Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivecrona, T. und Vlodavsky, I. (1992). "Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix." *J Clin Invest* **90**(5): 2013-21.
- Enrich, C., Pol, A., Calvo, M., Pons, M. und Jackle, S. (1999). "Dissection of the multifunctional "Receptor-Recycling" endocytic compartment of hepatocytes." *Hepatology* **30**(5): 1115-20.
- Farkas, M. H., Swift, L. L., Hasty, A. H., Linton, M. F. und Fazio, S. (2003). "The recycling of apolipoprotein E in primary cultures of mouse hepatocytes. Evidence for a physiologic connection to high density lipoprotein metabolism." *J Biol Chem* **278**(11): 9412-7.
- Fazio, S., Linton, M. F., Hasty, A. H. und Swift, L. L. (1999). "Recycling of apolipoprotein E in mouse liver." *J Biol Chem* **274**(12): 8247-53.
- Feng, Y., Press, B. und Wandinger-Ness, A. (1995). "Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic." *J Cell Biol* **131**(6 Pt 1): 1435-52.
- Fielding, C. J. und Fielding, P. E. (2001). "Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol." *Adv Drug Deliv Rev* **49**(3): 251-64.
- Fielding, C. J. und Fielding, P. E. (2001). "Cellular cholesterol efflux." *Biochim Biophys Acta* **1533**(3): 175-89.
- Fielding, P. E. und Fielding, C. J. (1980). "A cholesteryl ester transfer complex in human plasma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(6): 3327-30.
- Fruman, D. A., Meyers, R. E. und Cantley, L. C. (1998). "Phosphoinositide kinases." *Annu Rev Biochem* **67**: 481-507.
- Futter, C. E., Collinson, L. M., Backer, J. M. und Hopkins, C. R. (2001). "Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes." *J Cell Biol* **155**(7): 1251-64.
- Gagescu, R., Demaurex, N., Parton, R. G., Hunziker, W., Huber, L. A. und Gruenberg, J. (2000). "The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components." *Mol Biol Cell* **11**(8): 2775-91.
- Garcia, A., Barbaras, R., Collet, X., Bogoyo, A., Chap, H. und Perret, B. (1996). "High-density lipoprotein 3 receptor-dependent endocytosis pathway in a human hepatoma cell line (HepG2)." *Biochemistry* **35**(40): 13064-71.
- Gaw, A., Packard, C. J., Lindsay, G. M., Griffin, B. A., Caslake, M. J., Lorimer, A. R. und Shepherd, J. (1995). "Overproduction of small very low density lipoproteins (Sf 20-60) in moderate hypercholesterolemia: relationships between apolipoprotein B kinetics and plasma lipoproteins." *J Lipid Res* **36**(1): 158-71.
- Geuze, H. J., Slot, J. W., Strous, G. J., Lodish, H. F. und Schwartz, A. L. (1983). "Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis." *Cell* **32**(1): 277-87.
- Ghosh, R. N. und Maxfield, F. R. (1995). "Evidence for nonvectorial, retrograde transferrin trafficking in the early endosomes of HEP2 cells." *J. Cell Biol.* **128**: 549-561.

- Goldenring, J. R., Smith, J., Vaughan, H. D., Cameron, P., Hawkins, W. und Navarre, J. (1996). "Rab11 is an apically located small GTP-binding protein in epithelial tissues." *Am J Physiol* **270**(3 Pt 1): G515-25.
- Goldstein, J. L. und Brown, M. S. (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." *Nature* **343**(6257): 425-30.
- Gonzalez, L., Jr. und Scheller, R. H. (1999). "Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex." *Cell* **96**(6): 755-8.
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M. und Gruenberg, J. (1991). "rab5 controls early endosome fusion in vitro." *Cell* **64**(5): 915-25.
- Gotto, A. M., Jr., Pownall, H. J. und Havel, R. J. (1986). "Introduction to the plasma lipoproteins." *Methods Enzymol* **128**: 3-41.
- Gournier, H., Stenmark, H., Rybin, V., Lippe, R. und Zerial, M. (1998). "Two distinct effectors of the small GTPase Rab5 cooperate in endocytic membrane fusion." *Embo J* **17**(7): 1930-40.
- Greenspan, P. und St Clair, R. W. (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**(3): 1703-13.
- Gruenberg, J. und Maxfield, F. R. (1995). "Membrane transport in the endocytic pathway." *Curr Opin Cell Biol* **7**(4): 552-63.
- Gu, F. und Gruenberg, J. (1999). "Biogenesis of transport intermediates in the endocytic pathway." *FEBS Lett* **452**(1-2): 61-6.
- Gu, X., Trigatti, B., Xu, S., Acton, S., Babitt, J. und Krieger, M. (1998). "The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain." *J Biol Chem* **273**(41): 26338-48.
- Hao, M. und Maxfield, F. R. (2000). "Characterization of rapid membrane internalization and recycling." *J Biol Chem* **275**(20): 15279-86.
- Hao, M., Mukherjee, S. und Maxfield, F. R. (2001). "Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 13072-7.
- Havel, R. J., Eder, H. A. und Bragdon, J. H. (1955). "The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum." *J Clin Invest* **34**(9): 1345-53.
- Heeren, J. und Beisiegel, U. (2001). "Intracellular metabolism of triglyceride-rich lipoproteins." *Curr Opin Lipidol* **12**(3): 255-60.
- Heeren, J., Grewal, T., Jackle, S. und Beisiegel, U. (2001). "Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo." *J Biol Chem* **276**(45): 42333-8.

- Heeren, J., Grewal, T., Laatsch, A., Rottke, D., Rinninger, F., Enrich, C. und Beisiegel, U. (2003). "Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization." *J Biol Chem* **278**(16): 14370-8.
- Heeren, J., Niemeier, A., Merkel, M. und Beisiegel, U. (2002). "Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo." *J Mol Med* **80**(9): 576-84.
- Heeren, J., Weber, W. und Beisiegel, U. (1999). "Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation." *J Cell Sci* **112** (Pt 3): 349-59.
- Heuser, J. (1980). "Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts." *J. Cell Biol.* **84**: 560-583.
- Hill, E., Clarke, M. und Barr, F. A. (2000). "The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis." *Embo J* **19**(21): 5711-9.
- Hölttä-Vuori, M., Maatta, J., Ullrich, O., Kuismanen, E. und Ikonen, E. (2000). "Mobilization of late-endosomal cholesterol is inhibited by Rab guanine nucleotide dissociation inhibitor." *Curr Biol* **10**(2): 95-8.
- Hölttä-Vuori, M., Tanhuanpää, K., Mobius, W., Somerharju, P. und Ikonen, E. (2002). "Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11." *Mol Biol Cell* **13**(9): 3107-22.
- Hopkins, C. R., Gibson, A., Shipman, M., Strickland, D. K. und Trowbridge, I. S. (1994). "In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area, and then routed to the plasma membrane of the leading lamella." *J Cell Biol* **125**(6): 1265-74.
- Hopkins, C. R. und Trowbridge, I. S. (1983). "Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells." *J Cell Biol* **97**(2): 508-21.
- Horiuchi, H., Lippe, R., McBride, H. M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M. und Zerial, M. (1997). "A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function." *Cell* **90**(6): 1149-59.
- Hunyady, L., Baukal, A. J., Gaborik, Z., Olivares-Reyes, J. A., Bor, M., Szaszak, M., Lodge, R., Catt, K. J. und Balla, T. (2002). "Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT1 angiotensin receptor." *J Cell Biol* **157**(7): 1211-22.
- Hunziker, W. und Peters, P. J. (1998). "Rab17 localizes to recycling endosomes and regulates receptor-mediated transcytosis in epithelial cells." *J Biol Chem* **273**(25): 15734-41.
- Hussain, M. M., Kanchar, R. K., Zhou, Z., Luchoomun, J., Zu, H. und Bakillah, A. (1996). "Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors." *Biochim Biophys Acta* **1300**(3): 151-70.
- Iacopetta, B. J. und Morgan, E. H. (1983). "The kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake from transferrin in rabbit reticulocytes." *J Biol Chem* **258**(15): 9108-15.

- Imamura, H., Takaishi, K., Nakano, K., Kodama, A., Oishi, H., Shiozaki, H., Monden, M., Sasaki, T. und Takai, Y. (1998). "Rho and Rab small G proteins coordinately reorganize stress fibers and focal adhesions in MDCK cells." *Mol Biol Cell* **9**(9): 2561-75.
- Jedd, G., Mulholland, J. und Segev, N. (1997). "Two new Ypt GTPases are required for exit from the yeast trans-Golgi compartment." *J Cell Biol* **137**(3): 563-80.
- Kambouris, A. M., Roach, P. D., Calvert, G. D. und Nestel, P. J. (1990). "Retroendocytosis of high density lipoproteins by the human hepatoma cell line, HepG2." *Arteriosclerosis* **10**(4): 582-90.
- Kane, J. P. (1996). *Structure and Function of the Plasma Lipoproteins and Their Receptors. Atherosclerosis and Coronary Disease*. Fuster, V., Ross R., and Topol, E.J. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers: 89-103.
- Kashyap, V. S., Santamarina-Fojo, S., Brown, D. R., Parrott, C. L., Applebaum-Bowden, D., Meyn, S., Talley, G., Paigen, B., Maeda, N. und Brewer, H. B., Jr. (1995). "Apolipoprotein E deficiency in mice: gene replacement and prevention of atherosclerosis using adenovirus vectors." *J Clin Invest* **96**(3): 1612-20.
- Kato, M., Sasaki, T., Ohya, T., Nakanishi, H., Nishioka, H., Imamura, M. und Takai, Y. (1996). "Physical and functional interaction of rabphilin-3A with alpha-actinin." *J Biol Chem* **271**(50): 31775-8.
- Keen, J. H. und Beck, K. A. (1989). "Identification of the clathrin-binding domain of assembly protein AP-2." *Biochem Biophys Res Commun* **158**(1): 17-23.
- Klinger, A., Reimann, F. M., Klinger, M. H. und Stange, E. F. (1997). "Clathrin-mediated endocytosis of high density lipoprotein3 in human intestinal Caco-2 cells. A post-embedding immunocytochemical study." *Biochim Biophys Acta* **1345**(1): 65-70.
- Kowal, R. C., Herz, J., Goldstein, J. L., Esser, V. und Brown, M. S. (1989). "Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(15): 5810-4.
- Krieger, M. und Herz, J. (1994). "Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)." *Annu Rev Biochem* **63**: 601-37.
- Kurzchalia, T. V., Gorvel, J. P., Dupree, P., Parton, R., Kellner, R., Houthaeve, T., Gruenberg, J. und Simons, K. (1992). "Interactions of rab5 with cytosolic proteins." *J Biol Chem* **267**(26): 18419-23.
- Lamarche, B., Tchernof, A., Moorjani, S., Cantin, B., Dagenais, G. R., Lupien, P. J. und Despres, J. P. (1997). "Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study." *Circulation* **95**(1): 69-75.
- Lanzetti, L., Rybin, V., Malabarba, M. G., Christoforidis, S., Scita, G., Zerial, M. und Di Fiore, P. P. (2000). "The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5." *Nature* **408**(6810): 374-7.

- Lawe, D. C., Chawla, A., Merithew, E., Dumas, J., Carrington, W., Fogarty, K., Lifshitz, L., Tuft, R., Lambright, D. und Corvera, S. (2002). "Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1." *J Biol Chem* **277**(10): 8611-7.
- Leake, D. S. und Peters, T. J. (1982). "Lipid accumulation in arterial smooth muscle cells in culture. Morphological and biochemical changes caused by low density lipoproteins and chloroquine." *Atherosclerosis* **44**(3): 275-91.
- Li, G., D'Souza-Schorey, C., Barbieri, M. A., Roberts, R. L., Klippel, A., Williams, L. T. und Stahl, P. D. (1995). "Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22): 10207-11.
- Linton, M. F., Atkinson, J. B. und Fazio, S. (1995). "Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation." *Science* **267**(5200): 1034-7.
- Linton, M. F., Hasty, A. H., Babaev, V. R. und Fazio, S. (1998). "Hepatic apo E expression is required for remnant lipoprotein clearance in the absence of the low density lipoprotein receptor." *J Clin Invest* **101**(8): 1726-36.
- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M. A., Goda, Y., Zerial, M. und Pfeffer, S. R. (1993). "Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network." *Embo J* **12**(2): 677-82.
- Lombardi, P., Mulder, M., van der Boom, H., Frants, R. R. und Havekes, L. M. (1993). "Inefficient degradation of triglyceride-rich lipoprotein by HepG2 cells is due to a retarded transport to the lysosomal compartment." *J Biol Chem* **268**(35): 26113-9.
- Lütcke, A., Parton, R. G., Murphy, C., Olkkonen, V. M., Dupree, P., Valencia, A., Simons, K. und Zerial, M. (1994). "Cloning and subcellular localization of novel rab proteins reveals polarized and cell type-specific expression." *J Cell Sci* **107** (Pt 12): 3437-48.
- Magnusson, S., Faerevik, I. und Berg, T. (1992). "Characterization of retroendocytosis in rat liver parenchymal cells and sinusoidal endothelial cells." *Biochem J* **287** (Pt 1): 241-6.
- Mahley, R. W. und Ji, Z. S. (1999). "Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E." *J Lipid Res* **40**(1): 1-16.
- Mallet, W. G. und Maxfield, F. R. (1999). "Chimeric forms of furin and TGN38 are transported with the plasma membrane in the trans-Golgi network via distinct endosomal pathways." *J Cell Biol* **146**(2): 345-59.
- Mamdouh, Z., Deckelbaum, R. J. und Maxfield, F. R. (2000). "Lipid-free apolipoprotein E is internalized via cell surface proteoglycans to the late endosomes but escapes degradation through a non transferrin recycling compartment." *Circulation* **102**(Suppl): 44957.
- Marsh, M. und McMahon, H. T. (1999). "The structural era of endocytosis." *Science* **285**(5425): 215-20.
- Martys, J. L., Wjasow, C., Gangi, D. M., Kielian, M. C., McGraw, T. E. und Backer, J. M. (1996). "Wortmannin-sensitive trafficking pathways in Chinese hamster ovary cells. Differential effects on endocytosis and lysosomal sorting." *J Biol Chem* **271**(18): 10953-62.

- Mayor, S., Presley, J. F. und Maxfield, F. R. (1993). "Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process." *J Cell Biol* **121**(6): 1257-69.
- McBride, H. M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R. und Zerial, M. (1999). "Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13." *Cell* **98**(3): 377-86.
- McLauchlan, H., Newell, J., Morrice, N., Osborne, A., West, M. und Smythe, E. (1998). "A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits." *Curr Biol* **8**(1): 34-45.
- Méresse, S., Gorvel, J. P. und Chavrier, P. (1995). "The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes." *J Cell Sci* **108 (Pt 11)**: 3349-58.
- Meyers, R. und Cantley, L. C. (1997). "Cloning and characterization of a wortmannin-sensitive human phosphatidylinositol 4-kinase." *J Biol Chem* **272**(7): 4384-90.
- Miaczynska, M. und Zerial, M. (2002). "Mosaic organization of the endocytic pathway." *Exp Cell Res* **272**(1): 8-14.
- Mohrmann, K. und van der Sluijs, P. (1999). "Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases." *Mol Membr Biol* **16**(1): 81-7.
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N. und Maxfield, F. R. (1997). "Endocytosis." *Physiol Rev* **77**(3): 759-803.
- Mukhopadhyay, A., Funato, K. und Stahl, P. D. (1997). "Rab7 regulates transport from early to late endocytic compartments in *Xenopus* oocytes." *J Biol Chem* **272**(20): 13055-9.
- Mullock, B. M., Perez, J. H., Kuwana, T., Gray, S. R. und Luzio, J. P. (1994). "Lysosomes can fuse with a late endosomal compartment in a cell-free system from rat liver." *J Cell Biol* **126**(5): 1173-82.
- Nakanishi, S., Kakita, S., Takahashi, I., Kawahara, K., Tsukuda, E., Sano, T., Yamada, K., Yoshida, M., Kase, H., Matsuda, Y. und et al. (1992). "Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase." *J Biol Chem* **267**(4): 2157-63.
- Nelson, N. (1992). "Structure and function of V-ATPases in endocytic and secretory organelles." *J Exp Biol* **172**: 149-53.
- Neufeld, E. B., Remaley, A. T., Demosky, S. J., Stonik, J. A., Cooney, A. M., Comly, M., Dwyer, N. K., Zhang, M., Blanchette-Mackie, J., Santamarina-Fojo, S. und Brewer, H. B., Jr. (2001). "Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter." *J Biol Chem* **276**(29): 27584-90.
- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J. M., Hyman, A. A. und Zerial, M. (1999). "Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules." *Nat Cell Biol* **1**(6): 376-82.
- Octave, J. N., Schneider, Y. J., Truet, A. und Crichton, R. R. (1983). "Iron uptake and utilization by mammalian cells. I: Cellular uptake of transferrin and iron." *Trends Biochem Sci* **8**: 217-220.

- Ohya, T., Sasaki, T., Kato, M. und Takai, Y. (1998). "Involvement of Rabphilin3 in endocytosis through interaction with Rabaptin5." *J Biol Chem* **273**(1): 613-7.
- Olivecrona, T. und Bengtsson-Olivecrona, G. (1993). "Lipoprotein lipase and hepatic lipase." *Curr.Opin.Lipidol.* **196**.
- Olkkonen, V. M., Dupree, P., Killisch, I., Lutcke, A., Zerial, M. und Simons, K. (1993). "Molecular cloning and subcellular localization of three GTP-binding proteins of the rab subfamily." *J Cell Sci* **106 (Pt 4)**: 1249-61.
- Oram, J. F. (2002). "ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking." *Curr Opin Lipidol* **13**(4): 373-81.
- Oram, J. F., Lawn, R. M., Garvin, M. R. und Wade, D. P. (2000). "ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages." *J Biol Chem* **275**(44): 34508-11.
- Packard, C. J. und Shepherd, J. (1997). "Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(12): 3542-56.
- Patki, V., Virbasius, J., Lane, W. S., Toh, B. H., Shpetner, H. S. und Corvera, S. (1997). "Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase." *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* **94**: 7326-7330.
- Pearse, B. M. (1988). "Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits." *Embo J* **7**(11): 3331-6.
- Pfeffer, S. R., Dirac-Svejstrup, A. B. und Soldati, T. (1995). "Rab GDP dissociation inhibitor: putting rab GTPases in the right place." *J Biol Chem* **270**(29): 17057-9.
- Phillips, M. C., Gillotte, K. L., Haynes, M. P., Johnson, W. J., Lund-Katz, S. und Rothblat, G. H. (1998). "Mechanisms of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes." *Atherosclerosis* **137 Suppl**: S13-7.
- Presley, J. F., Mayor, S., Dunn, K. W., Johnson, L. S., McGraw, T. E. und Maxfield, F. R. (1993). "The End2 mutation in CHO cells slows the exit of transferrin receptors from the recycling compartment but bulk membrane recycling is unaffected." *J Cell Biol* **122**(6): 1231-41.
- Press, B., Feng, Y., Hoflack, B. und Wandinger-Ness, A. (1998). "Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment." *J Cell Biol* **140**(5): 1075-89.
- Rees, D., Sloane, T., Jessup, W., Dean, R. T. und Kritharides, L. (1999). "Apolipoprotein A-I stimulates secretion of apolipoprotein E by foam cell macrophages." *J Biol Chem* **274**(39): 27925-33.
- Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M. und Sabatini, D. D. (1998). "Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 6187-92.

- Ren, M., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Rosenfeld, M., Adesnik, M. und Sabatini, D. D. (1996). "In its active form, the GTP-binding protein rab8 interacts with a stress-activated protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 5151-5.
- Rensen, P. C., Jong, M. C., van Vark, L. C., van der Boom, H., Hendriks, W. L., van Berkel, T. J., Biessen, E. A. und Havekes, L. M. (2000). "Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis." *J Biol Chem* **275**(12): 8564-71.
- Riederer, M. A., Soldati, T., Shapiro, A. D., Lin, J. und Pfeffer, S. R. (1994). "Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network." *J Cell Biol* **125**(3): 573-82.
- Roberts, R. L., Barbieri, M. A., Pryse, K. M., Chua, M., Morisaki, J. H. und Stahl, P. D. (1999). "Endosome fusion in living cells overexpressing GFP-rab5." *J Cell Sci* **112** (Pt 21): 3667-75.
- Robinson, M. S. (1994). "The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis." *Curr Opin Cell Biol* **6**: 538-544.
- Rogler, G., Herold, G. und Stange, E. F. (1991). "HDL3-retroendocytosis in cultured small intestinal crypt cells: a novel mechanism of cholesterol efflux." *Biochim Biophys Acta* **1095**(1): 30-8.
- Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R. E. und Herz, J. (1998). "Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants." *J Clin Invest* **101**(3): 689-95.
- Rothman, J. E. und Schmid, S. L. (1986). "Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles." *Cell* **46**(1): 5-9.
- Rubino, M., Miaczynska, M., Lippe, R. und Zerial, M. (2000). "Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes." *J Biol Chem* **275**(6): 3745-8.
- Sakai, J. und Rawson, R. B. (2001). "The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipid homeostasis through regulated intracellular transport." *Curr Opin Lipidol* **12**(3): 261-6.
- Sandvig, K. und van Deurs, B. (1996). "Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin." *Physiol Rev* **76**(4): 949-66.
- Sasaki, T., Shirataki, H., Nakanishi, H. und Takai, Y. (1997). "Rab3A-rabphilin-3A system in neurotransmitter release." *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **31**: 279-94.
- Schimmöller, F., Simon, I. und Pfeffer, S. R. (1998). "Rab GTPases, directors of vesicle docking." *J Biol Chem* **273**(35): 22161-4.
- Schmitz, G., Robenek, H., Lohmann, U. und Assmann, G. (1985). "Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages." *Embo J* **4**(3): 613-22.

- Schwartz, C. C., Halloran, L. G., Vlahcevic, Z. R., Gregory, D. H. und Swell, L. (1978). "Preferential utilization of free cholesterol from high-density lipoproteins for biliary cholesterol secretion in man." *Science* **200**(4337): 62-4.
- Seachrist, J. L., Laporte, S. A., Dale, L. B., Babwah, A. V., Caron, M. G., Anborgh, P. H. und Ferguson, S. S. (2002). "Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion." *J Biol Chem* **277**(1): 679-85.
- Sevanian, A. und Peterson, A. R. (1986). "The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products." *Food Chem Toxicol* **24**(10-11): 1103-10.
- Sheetz, M. P. (1999). "Motor and cargo interactions." *Eur J Biochem* **262**(1): 19-25.
- Sheff, D., Pelletier, L., O'Connell, C. B., Warren, G. und Mellman, I. (2002). "Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes." *J Cell Biol* **156**(5): 797-804.
- Sheff, D. R., Daro, E. A., Hull, M. und Mellman, I. (1999). "The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions." *J Cell Biol* **145**(1): 123-39.
- Sheff, D. R., Kroschewski, R. und Mellman, I. (2002). "Actin dependence of polarized receptor recycling in Madin-Darby canine kidney cell endosomes." *Mol Biol Cell* **13**(1): 262-75.
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., Miyazaki, M. und Takai, Y. (1993). "Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin." *Mol Cell Biol* **13**(4): 2061-8.
- Shpetner, H., Joly, M., Hartley, D. und Corvera, S. (1996). "Potential sites of PI-3 kinase function in the endocytic pathway revealed by the PI-3 kinase inhibitor, wortmannin." *J Cell Biol* **132**(4): 595-605.
- Silver, D. L., Wang, N. und Tall, A. R. (2000). "Defective HDL particle uptake in ob/ob hepatocytes causes decreased recycling, degradation, and selective lipid uptake." *J Clin Invest* **105**(2): 151-9.
- Silver, D. L., Wang, N., Xiao, X. und Tall, A. R. (2001). "High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion." *J Biol Chem* **276**(27): 25287-93.
- Simons, K. und Ikonen, E. (2000). "How cells handle cholesterol." *Science* **290**(5497): 1721-6.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M. und Stenmark, H. (1998). "EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion." *Nature* **394**(6692): 494-8.
- Simonsen, A., Wurmser, A. E., Emr, S. D. und Stenmark, H. (2001). "The role of phosphoinositides in membrane transport." *Curr Opin Cell Biol* **13**(4): 485-92.
- Soldati, T., Shapiro, A. D., Svejstrup, A. B. und Pfeffer, S. R. (1994). "Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange." *Nature* **369**(6475): 76-8.

- Somsel Rodman, J. und Wandinger-Ness, A. (2000). "Rab GTPases coordinate endocytosis." *J Cell Sci* **113 Pt 2**: 183-92.
- Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. und Zerial, M. (2000). "Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11." *J Cell Biol* **149(4)**: 901-14.
- Spiro, D. J., Boll, W., Kirchhausen, T. und Wessling-Resnick, M. (1996). "Wortmannin alters the transferrin receptor endocytic pathway in vivo and in vitro." *Mol Biol Cell* **7(3)**: 355-67.
- Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J. und Zerial, M. (1994). "Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis." *Embo J* **13(6)**: 1287-96.
- Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O. und Zerial, M. (1995). "Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion." *Cell* **83(3)**: 423-32.
- Stevenson, S. C., Marshall-Neff, J., Teng, B., Lee, C. B., Roy, S. und McClelland, A. (1995). "Phenotypic correction of hypercholesterolemia in apoE-deficient mice by adenovirus-mediated in vivo gene transfer." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15(4)**: 479-84.
- Stoorvogel, W., Oorschot, V. und Geuze, H. J. (1996). "A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes." *J Cell Biol* **132(1-2)**: 21-33.
- Tabas, I., Lim, S., Xu, X. X. und Maxfield, F. R. (1990). "Endocytosed beta-VLDL and LDL are delivered to different intracellular vesicles in mouse peritoneal macrophages." *J Cell Biol* **111(3)**: 929-40.
- Tabas, I., Myers, J. N., Innerarity, T. L., Xu, X. X., Arnold, K., Boyles, J. und Maxfield, F. R. (1991). "The influence of particle size and multiple apoprotein E-receptor interactions on the endocytic targeting of beta-VLDL in mouse peritoneal macrophages." *J Cell Biol* **115(6)**: 1547-60.
- Takahashi, Y. und Smith, J. D. (1999). "Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11358-11363.
- Tooze, J. und Hollinshead, M. (1991). "Tubular early endosomal networks in AtT20 and other cells." *J Cell Biol* **115(3)**: 635-53.
- Trischler, M., Stoorvogel, W. und Ullrich, O. (1999). "Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway." *J Cell Sci* **112 (Pt 24)**: 4773-83.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M. und Parton, R. G. (1996). "Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome." *J Cell Biol* **135(4)**: 913-24.
- Ungermann, C., Sato, K. und Wickner, W. (1998). "Defining the functions of trans-SNARE pairs." *Nature* **396(6711)**: 543-8.

- Urbé, S., Huber, L. A., Zerial, M., Tooze, S. A. und Parton, R. G. (1993). "Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells." *FEBS Lett* **334**(2): 175-82.
- van Dam, E. M. und Stoorvogel, W. (2002). "Dynamamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles." *Mol Biol Cell* **13**(1): 169-82.
- van Dam, E. M., Ten Broeke, T., Jansen, K., Spijkers, P. und Stoorvogel, W. (2002). "Endocytosed transferrin receptors recycle via distinct dynamin and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways." *J Biol Chem* **277**(50): 48876-83.
- van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B. und Mellman, I. (1992). "The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway." *Cell* **70**(5): 729-40.
- van IJzendoorn, S. C., Tuvim, M. J., Weimbs, T., Dickey, B. F. und Mostov, K. E. (2002). "Direct interaction between Rab3b and the polymeric immunoglobulin receptor controls ligand-stimulated transcytosis in epithelial cells." *Dev Cell* **2**(2): 219-28.
- Vitelli, R., Santillo, M., Lattero, D., Chiariello, M., Bifulco, M., Bruni, C. B. und Bucci, C. (1997). "Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway." *J Biol Chem* **272**(7): 4391-7.
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. und Brown, R. F. (1994). "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)." *J Biol Chem* **269**(7): 5241-8.
- von Eckardstein, A., Nofer, J. R. und Assmann, G. (2001). "High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(1): 13-27.
- Ward, D. M., Leslie, J. D. und Kaplan, J. (1997). "Homotypic lysosome fusion in macrophages: analysis using an in vitro assay." *J Cell Biol* **139**(3): 665-73.
- White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B. und Stelzer, E. H. (1999). "Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells." *J Cell Biol* **147**(4): 743-60.
- Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B. und Salamero, J. (2000). "Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network." *J Cell Biol* **151**(6): 1207-20.
- Willnow, T. E., Sheng, Z., Ishibashi, S. und Herz, J. (1994). "Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist." *Science* **264**(5164): 1471-4.
- Wilson, J. M., de Hoop, M., Zorzi, N., Toh, B. H., Dotti, C. G. und Parton, R. G. (2000). "EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts." *Mol Biol Cell* **11**(8): 2657-71.
- Wu, S. K., Zeng, K., Wilson, I. A. und Balch, W. E. (1996). "Structural insights into the function of the Rab GDI superfamily." *Trends Biochem Sci* **21**(12): 472-6.

- Xiao, G. H., Shoarinejad, F., Jin, F., Golemis, E. A. und Yeung, R. S. (1997). "The tuberous sclerosis 2 gene product, tuberin, functions as a Rab5 GTPase activating protein (GAP) in modulating endocytosis." *J Biol Chem* **272**(10): 6097-100.
- Yamashiro, D. J., Tycko, B., Fluss, S. R. und Maxfield, F. R. (1984). "Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway." *Cell* **37**(3): 789-800.
- Zacchi, P., Stenmark, H., Parton, R. G., Orioli, D., Lim, F., Giner, A., Mellman, I., Zerial, M. und Murphy, C. (1998). "Rab17 regulates membrane trafficking through apical recycling endosomes in polarized epithelial cells." *J Cell Biol* **140**(5): 1039-53.
- Zambon, A., Schmidt, I., Beisiegel, U. und Brunzell, J. D. (1996). "Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins." *J Lipid Res* **37**(11): 2394-404.
- Zeng, J., Ren, M., Gravotta, D., De Lemos-Chiarandini, C., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xu, G., Shen, T. H., Morimoto, T., Adesnik, M. und Sabatini, D. D. (1999). "Identification of a putative effector protein for rab11 that participates in transferrin recycling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 2840-5.
- Zerial, M. und McBride, H. (2001). "Rab proteins as membrane organizers." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2): 107-17.
- Zheng, P., Horwitz, A., Waelde, C. A. und Smith, J. D. (2001). "Stably transfected ABCA1 antisense cell line has decreased ABCA1 mRNA and cAMP-induced cholesterol efflux to apolipoprotein AI and HDL." *Biochim Biophys Acta* **1534**(2-3): 121-8.
- Zuk, P. A. und Elferink, L. A. (1999). "Rab15 mediates an early endocytic event in Chinese hamster ovary cells." *J Biol Chem* **274**(32): 22303-12.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb	Abbildung
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
Apo	Apolipoprotein
AT _{1A} R	Angiotensin-II-Typ-1A-Rezeptor
ATP	Adenylnukleotidtriphosphat
ATPase	ATP-spaltendes Enzym
bp	Basenpaare
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovine Serum Albumin
CE	Cholesterinester
CETP	Cholesterin-Ester-Transfer-Protein
CM	Chylomikronen
cpm	counts per minute
COS-1	Transformed African Green Monkey Kidney Fibroblast
CR	Chylomikronen-Remnants
CURL	Compartment of Uncoupling Receptor and Ligand
Cy	Cyanin-Farbstoff
δ	Dichte einer Lösung in g/ml
DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	Early Endosome Antigen1
FC	Freies Cholesterin
FS	Fettsäuren
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase-aktivierender Faktor
GDI	GDP-Dissoziations-Inhibitor
GDP	Guanindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren
GTP	Guanintriphosphat
GTPase	GTP-spaltendes Enzym
HDL	High Density Lipoproteins
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IDL	Intermediate Density Lipoproteins
Ig	Immunglobulin
KBr	Kaliumbromid
kDa	Kilodalton
Lamp	Lysosome associated membrane protein
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoproteins
LDL-R	LDL-Rezeptor
LPL	Lipoprotein-Lipase
LRP1	LDL-Rezeptor Related Protein 1
LY	LY294002

NSF	NEM-Sensitiver Faktor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PL	Pankreas-Lipase
PtdIns	Phosphatidylinositol
R	Rezeptor
Rab5GTP	Rab5Q79L
RAP	Receptor Associated Protein
SCAP	SREBP Cleavage Activating Protein
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SNAP	Soluble NSF Attachment Protein
SNARE	SNAP Rezeptor
SR-BI	Scavenger-Rezeptor Klasse BI
SRE	Sterol Responsive Element
SREBP	Sterol Responsive Element Binding Protein
t-SNARE	Target SNAP Rezeptor
Tab	Tabelle
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TG	Triglyzeride
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
THL	Tetrahydrolipstatin
TRL	Triglyzeridreiche Lipoproteine
VLDL	Very Low Density Lipoproteins

8.2 Danksagung

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

Mein aufrichtiger Dank gebührt außerdem Herrn Dr. Jörg Heeren für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und geduldige Unterstützung.

Schließlich gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Beisiegel für die gewährte Hilfe bei dem Erlernen der molekularbiologischen Methoden, bei Fragestellungen und für die nette, kollegiale Atmosphäre.

8.3 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Karim Gras
Geburtsdatum	04.09.1976
Geburtsort	Berlin
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULBILDUNG

1983 – 1988	Ernst-Habermann-Grundschule, Berlin
1988 – 1996	Katharina-Henoth-Gesamtschule, Köln
1993 – 1994	New Castle Chrysler High School/USA
06/1996	Abitur

ZIVILDIENTST

1996 – 1997	Städt. Schule für geistig Behinderte, Köln
-------------	--

STUDIUM

10/1997	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
08/2000	1. Staatsexamen
09/2002	2. Staatsexamen
10/2004	3. Staatsexamen und Approbation als Arzt
10/2000 – 09/2001	Studium der Humanmedizin an der Faculté de Médecine de Nice/Frankreich

PRAKTISCHES JAHR

04/2003 – 03/2004	Kardiologie, AK-Altona, Hamburg Anästhesiologie, UKE, Hamburg Chirurgie, Hospital Puerta del Mar, Cádiz/Spanien
-------------------	---

8.4 Erklärung

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

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

Karim Gras