

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie

Zentrum für Experimentelle Medizin

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Universität Hamburg

Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h. c. Ulrike Beisiegel

**Apolipoprotein-E-Recycling: Eine intrazelluläre Verbindung
zwischen dem Metabolismus Triazylglyzerid-reicher
Lipoproteine und HDL**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Daniel Rottke

aus Hamburg

Hamburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg.

Sprecher:

Referent:

Koreferent:

INHALTSVERZEICHNIS

1	FRAGESTELLUNG	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	Einführung in den Lipoproteinstoffwechsel.....	2
2.2	HDL und Cholesterolmetabolismus	4
2.2.1	ATP-Binding-Cassette-Transporter-A1	6
2.2.2	Scavenger-Rezeptor-B1	7
2.2.3	Makrophagen	8
2.3	Apolipoprotein E	8
2.3.1	ApoE im TRL-Metabolismus	10
2.3.2	ApoE-Recycling	13
2.3.3	ApoE und Atherosklerose.....	14
3	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1	Materialien.....	16
3.2	Methoden.....	17
3.2.1	Pulse-Chase-Versuche	17
3.2.2	Isolierung von TRL aus dem Plasma von Patienten mit Typ I HyperTriazylglyzeridämie.....	19
3.2.3	Quantifizierung des Lipid- und Proteingehaltes	19
3.2.4	Radioaktive Markierung der Apolipoproteine	20
3.2.5	Auftrennung der ¹²⁵ I-markierten Apolipoproteine mittels SDS-Page und Autoradiografie.....	21
3.2.6	Zellkultur	23
3.2.7	Radioaktive Markierung des Zell-Cholesterol-Pools mit ³ H-Cholesterol-LDL.....	24
3.2.8	³ H-Markierung von TRL	25
3.2.9	Bradford-Proteinbestimmung	26
3.2.10	Dole-Lipid-Extraktion zur Analyse auf ³ H-Cholesterol-Gehalt.....	26
3.2.11	TCA-Fällung zur Analyse auf ¹²⁵ I-ApoE-Gehalt	27
3.2.12	Indirekte Immunfluoreszenz-Experimente	28
3.2.13	Gelchromatografische Analyse des Recycling-Mediums	29
3.2.14	Western-Blotting mit den einzelnen Lipoprotein-Fractionen auf Nitrocellulose	30
3.2.15	ApoE-Immunoaffinitäts-Säulenchromatografie	31
4	ERGEBNISSE	32

4.1	Charakterisierung der Liganden.....	32
4.2	Zusammenhang zwischen Cholesterolstoffwechsel und ApoE-Recycling	34
4.3	Analyse der resezernierten Lipoproteine	42
4.4	Analyse des LpE-Peak.....	48
5	DISKUSSION.....	53
5.1	Experimentelles System (Liganden und Methodik).....	53
5.2	Das ApoE-Recycling ist assoziiert mit einem Efflux von Zell-Cholesterol	54
5.3	ApoE-Recycling: eine Verknüpfung zwischen dem Metabolismus von TRL und HDL	55
5.4	Die Rolle Caveolins im zellulären Stoffwechsel von ApoE und Lipiden.....	57
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	59
	ABKÜRZUNGEN.....	60
	LITERATURVERZEICHNIS	62
	DANKSAGUNG.....	71
	LEBENS LAUF.....	72

1 Fragestellung

Das Recycling von ApoE nach der Internalisation von Triacylglycerid-reichen Lipoproteinen (TRL) ist durch in-vitro-Studien mehrfach gezeigt worden (Lombardi et al. 1993, Beisiegel et al. 1995, Chen et al. 1995, Heeren et al. 1999). Auch in vivo wurde dieser Vorgang nachgewiesen und seine potentielle Bedeutung für den Lipid-Stoffwechsel diskutiert (Rensen et al. 2000, Fazio et al. 2001, Heeren et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wird der Zusammenhang zwischen dem ApoE-Recycling und dem Metabolismus von HDL sowie Cholesterol, wie in den folgenden Punkten beschrieben, charakterisiert:

1. Es soll untersucht werden, ob die Resekretion von Lipiden aus internalisierten TRL zusammen mit internalisiertem ApoE als „Surface-Remnants“ erfolgt.
1. Es wird analysiert, ob Cholesterol aus intrazellulären Lipid-Pools durch ApoE-Recycling mobilisiert und dadurch der Cholesterol-Efflux beeinflusst wird.
2. Die Lokalisation des internalisierten ApoE sowie der HDL während des ApoE Recyclings soll untersucht werden.
3. Schließlich werden die resezernierten ApoE-haltigen Lipoproteine charakterisiert.

2 Einleitung

2.1 Einführung in den Lipoproteinstoffwechsel

Lipide sind für den Organismus essentiell als Bestandteil in biologischen Zellmembranen, zur Deckung des Energiebedarfs, als Träger fettlöslicher Vitamine, in Gallensäuren und als Hormone, sowie zur Wärmeisolierung und als Druckpolster.

Der Mensch nimmt Lipide zum einen über die Nahrung auf, kann sie zum anderen aber auch endogen synthetisieren. Eine geringe Menge an unveresterten freien Fettsäuren wird im Blut an Serumalbumin gebunden transportiert. In allen anderen Fällen ist zum Transport im wässrigen Milieu eine Assoziation der Lipide mit (Apolipo-)Proteinen nötig, um eine erhöhte Hydrophilie zu bewerkstelligen. Diese zusammengesetzten Partikel werden sinngemäß als Lipo-Proteine bezeichnet. Lipoproteine stellen chemisch Mizellen dar, sind also kugelförmige Partikel, mit einer Hülle aus Phospholipiden und Cholesterinen, die mit ihren polaren Anteilen die Hydrophilie des Partikels erhöhen. In dieser Membran befinden sich die Apolipoproteine, die, neben ihrer Rolle für die Löslichkeit, verantwortlich für Interaktionen des Partikels mit verschiedenen Rezeptoren und Enzymen sind. Die restlichen Lipidklassen, v.A. hydrophobe Cholesterinester und Triacylglyceride, befinden sich im Inneren des Partikels (Beisiegel 1992).

Der mengenmäßig weitaus größere Teil der Lipidzufuhr erfolgt über die Nahrung. Davon sind 90% Triacylglyceride, die restlichen 10% Phospholipide, Cholesterolester und fettlösliche Vitamine. Im Duodenum werden Triacylglyceride und Phospholipide von den Pankreasenzymen Phospholipase A und Pankreas-Lipase in β -Monoacylglycerine, Lyssolezithin und freie Fettsäuren gespalten, Cholesterolester über die Cholesterolesterase in Cholesterol und freie Fettsäuren. Voraussetzung dafür ist die Anwesenheit von hepatisch produzierten Gallensäuren, die über ihren amphiphilen Charakter eine Emulsion der Lipide im Nahrungsbrei und eine darin optimale Wirksamkeit der Lipasen ermöglichen. Die Spaltstücke lagern sich, unter Beteiligung der Gallensäuren, zu gemischten Mizellen zusammen: die hydrophilen Hydroxy- und Carboxylgruppen auf der Mizellenaußenseite, die lipophilen Alkylreste im Kugelinneren. Nachdem die Mizellen über den Bürstensaum der Enterocyten durch Diffusion aufgenommen sind, werden ihre Bestandteile im Golgi-Apparat erneut zu Triacylglyceriden, Cholesterolestern und Phospholipiden zusammengesetzt, mit den Apolipoproteinen (Apo) AI/II/IV sowie ApoB48 assoziiert und als Lipoprotein-Partikel an die Lymphe abgegeben. Diese Lipoproteine bezeichnet man als Chylomikronen. Sie gelangen nun über die Lymphe und den linken Venenwinkel in den Blutkreislauf. Nur kurz- und mittellange freie Fettsäuren diffundieren durch den Enterocyten hindurch direkt ins Blut (Assmann 1982).

Man unterteilt die Lipoproteine üblicherweise nach ihrer Dichte in 5 verschiedene Klassen: Very low density lipoproteins (VLDL), Low density lipoproteins (LDL), Intermediate density lipoproteins (IDL), High density lipoproteins (HDL) sowie Chylomikronen (CM), wobei Letztere in Aufbau und Dichte am ehesten den VLDL entsprechen, sich aber von ihnen wesentlich durch Syntheseort, biologische Funktion und Apoprotein-Zusammensetzung unterscheiden (Cooper 1997).

	CM	VLDL	IDL (VLDL-Remnants)	LDL	HDL
Dichte [g/ml]	<0,96	0,96-1,006	1,019-1,063	1,006-1,019	1,063-1,21
Apolipoproteine	CI-III, AI/IV, B48, E,	CI-III, B100, E,	B100, E, CI-III	B100	AI/II/IV, CI/II/III, E
Stokes Diameter [nm]	70-1200	30-70	25-35	15-25	5-17
Elektrophoretische Mobilität	Keine	Prä-β-Lp	Slow-prä-β	β-Lp	α-Lp (5-15% prä-β-Lp)
Zusammensetzung [% der Partikel-Masse]					
Triacylglyceride	86	55	23	6	4
Cholesterin	2	7	9	8	4
Cholesterolester	3	12	29	42	14
Phospholipide	7	18	19	22	34
Protein	1-2	6-10	11	21	45-55
Verhältnis TG/Chol	17:1	3:1	1:2	1:8	1:8
Funktion	Transport von Nahrungslipiden aus dem Darm	Transport hepatisch produzierter Lipide	VLDL-Metabolisierung sprdukt	IDL-Metabolisierung sprdukt	LDL-Metabolisierung sprdukt, Reverser Chol-Transport

Tabelle 1: Charakteristische Eigenschaften der humanen Plasma-Lipoproteine (modifiziert nach Kane, 1996)

Humane Plasma-Lipoproteine werden üblicherweise nach ihrer Dichte in 5 verschiedene Fraktionen aufgeteilt; Chylomikronen (CM), Very-low-density-lipoproteins (VLDL), Intermediate-density-lipoproteins (IDL), Low-density-lipoproteins (LDL) und High-density-lipoproteins (HDL). Sie unterscheiden sich zudem bezüglich ihrer Apolipoproteine, ihrer Größe, der elektrophoretischen Mobilität und enthalten, je nach Funktion im Lipidmetabolismus, unterschiedliche hohe Anteile von Protein und Triacylglyceriden, Cholesterin und anderen Lipiden.

VLDL sind, wie CM, besonders Triacylglycerid-reiche Lipoproteine. Während die Zusammensetzung der CM jedoch in den intestinalen Mukosazellen erfolgt, werden VLDL in der Leber aus endogenen Quellen synthetisiert. VLDL stellen daher vor allem im Hungerzustand die Versorgung peripherer Gewebe mit einer ausreichenden Menge von Lipiden sicher. Sie enthalten hauptsächlich die Apoproteine B₁₀₀ und E, sowie ApoC I/II/III (Ginsberg 1995). Durch intravaskuläre Interaktion mit weiteren Lipoproteinen, der Lipoprotein-Lipase (LpL), Lipidtransfer-Enzymen sowie Zellen peripherer Gewebe verändern sie ihre Form und Zusammensetzung und werden so zu kleineren cholesterinreicheren und Triacylglyceridärmeren IDL (auch VLDL-Remnants) und letztlich zur LDL (Griffin et Packard 1994).

LDL, als Metabolisierungsprodukt der VLDL, transportieren den Hauptanteil des Cholesterins im Blut. 80% der LDL wird direkt von der Leber aufgenommen. Die restliche LDL, sowie die IDL mit geringem ApoE-Gehalt, werden über ApoB-100 als Liganden aufgenommen, ApoE-reiche VLDL-Remnants binden über ApoE an Rezeptoren der Leber (Aufenanger et Kattermann 1995).

Als HDL, „high density lipoproteins“, wird eine große Gruppe von Lipoproteinen zusammengefaßt, die als Gemeinsamkeit eine hohe Dichte ($> 1,063$ g/ml) und eine kleine Größe (Stokes diameter 5-17 nm) haben (von Eckardstein et al. 1994). Fast alle HDL-Partikel enthalten ApoA-I als Hauptbestandteil. Es dient als Cofaktor bei der Reaktion mit der Lecithin:Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) und spielt bei der Aufnahme freien Cholesterins der peripheren Gewebe eine wichtige Rolle (s.u.). Bei Auftrennung der HDL über Agarosegel-Elektrophorese lässt sich, in Anlehnung an die Proteinfractionen des Plasmas, feststellen, daß der größte Teil des ApoA-I-haltigen HDL mit α -elektrophoretischer Mobilität wandert. Diese Fraktion wird daher α -LpAI genannt und enthält wahrscheinlich das gesamte Cholesterol, welches gemeinhin als HDL₁ bzw. HDL_C bestimmt wird. 5-15% wandern mit prä- β -Mobilität und werden nochmals in prä- β_1 -, prä- β_2 - und prä- β_3 -Lp-AI differenziert (von Eckardstein et al. 2001). Prä- β_1 -Lp-AI, der kleinste Partikel, ist diskoidal und liegt entweder als lipidfreies Apoprotein AI vor oder mit wenigen Molekülen Sphingomyelin und Phosphatidylcholin assoziiert (Barrans et al. 1996, Fielding et Fielding 1995). Ähnliche lipidarme Partikel enthalten nur ApoE (γ -LpE) oder Apo AIV (Lp-AIV) als einzige Apoproteine (Huang Y et al. 1994, Duverger et al. 1993). α -HDL kann außer mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) noch über Ultrazentrifugation nach der Dichte in HDL₁=HDL_C (1,055-1,085 g/ml), HDL₂ (1,063-1,120 g/ml) und HDL₃ (1,120-1,210 g/ml) aufgetrennt werden. Außerdem ist eine Differenzierung über nicht-denaturierende PAGE nach der Größe, oder Immunoaffinitätschromatografie nach dem Muster der Apolipoproteine möglich (von Eckardstein et al. 1994).

2.2 HDL und Cholesterolmetabolismus

Der Cholesterolhaushalt von Zellen unterliegt einem Zusammenspiel zwischen zellulärer Cholesterol-Synthese sowie der Aufnahme von exogenen cholesterinreichen Lipoproteinen, v.A. HDL und LDL. Aufgenommenes unverestertes Cholesterol, durch die saure lysosomale Lipase freigesetzt, wird ins Endoplasmatische Retikulum (ER) gebracht und dort über die Acyl:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) verestert, um die Zelle vor dem cytotoxischen Übermaß an unverestertem Cholesterol zu schützen (Fielding et Fielding 1997). Durch ACAT gebildete Cholesterolester erscheinen als Lipid-Tropfen, welche Lipid-beladenen Makrophagen ihr schaumiges Aussehen geben. Cytosolische Cholesterolester können durch die neutrale Cholesterolester-Hydrolase (NCEH) hydrolysiert werden, die durch cAMP-abhängige Proteinkinase A aktiviert wird (Bernard et al. 1991).

Durch die NCEH freigesetztes Cholesterol wird zur Zellmembran verbracht, von wo es nach extrazellulär abgegeben oder wiederum ins ER zur Reveresterung über die ACAT transportiert werden kann. Die Plasmamembran enthält daher 60 bis 90% des unveresterten Cholesterols (z.B. in Zellen der weiblichen Brustdrüse), wovon wiederum 95% auf der

zytosolischen Seite der Doppelmembran lokalisiert sind (Fielding et Fielding 1997, Liscum et Munn 1999).

Dieser Kreislauf von Cholesterol und Cholesterolestern zwischen ACAT, Plasmamembran und NCEH wird unterbrochen durch die Anwesenheit von zunächst extrazellulären Cholesterol-Akzeptoren, die einen Cholesterol-Efflux aus der Zelle bewirken (Fielding et Fielding 1997, Liscum et Munn 1999, von Eckardstein 1996, Rothblat et al. 1999). Diese Cholesterol-Akzeptoren sind lipidfreie Apolipoproteine oder lipidarme HDL-Vorläufer (=nascente, diskoidale HDL). Sie werden in Hepatocyten (Castle et al. 1991) und der intestinalen Mukosa (Danielsen et al. 1993) produziert. Sie können auch während der Lipoprotein-Lipase-vermittelten Triacylglycerid-Hydrolyse von TRL oder VLDL abdissoziieren (Musliner et al. 1991). Nascente HDL entsteht außerdem durch Umwandlung von HDL₂ oder HDL₃ durch das Cholesterol-Ester-Transfer-Protein (CETP) (Liang et al. 1996), das Phospholipid-Transfer-Protein (PLTP) (von Eckardstein et al. 1996) oder die hepatische Lipase (HL). Die Lipidierung von lipid-armen HDL-Vorstufen (z.B. prä- β -HDL) führt über die Aufnahme von Phospholipiden und unverestertem Cholesterol aus Zellen oder ApoB-enhaltenden Lipoproteinen sowie durch Einlagerung von Cholesterinestern in das hydrophobe Innere der HDL über die Lecithin:Cholesterol Acyltransferase (LCAT) zu lipidreichen, kugelförmigen (=sphärischen) α -LpA-I (von Eckardstein et al. 1994, Barrans et al. 1996, Fielding et Fielding 1995). Dabei entstehen zunächst kleinere HDL₃-Partikel, die dann durch Fusion mit anderer HDL₃ über das PLTP, weitere Aufnahme von verestertem Cholesterol über die LCAT, sowie die PLTP-vermittelte Aufnahme von TRL-Remnants zu größeren HDL₂ heranreifen. Während dieses Prozesses kommt es außerdem zum Austausch von zusätzlichen Apolipoproteinen (Miida et al. 1992, Liang et al. 1996, von Eckardstein et al. 1998). Die Aufnahme von Lipiden aus HDL₂ durch Scavenger-Rezeptor-B1 (SR-B1), CETP und HL, die darauf folgende Konversion von HDL₂ zu HDL₃ und die Konversion von HDL₃ zu HDL₂ über die PLTP, regenerieren wiederum prä- β ₁-Lp-AI oder lipid-freies ApoA-I (Barrans et al. 1996, Liang et al. 1996, von Eckardstein et al. 1996). Die Apolipoproteine oder Partikel können dann erneut das Blutplasma verlassen, in den extravaskulären Raum eintreten, dort als Akzeptoren von zellulären Lipiden dienen und eine Generierung von HDL initiieren. Die Aufnahme von Phospholipiden und unverestertem Cholesterol von hepatischen sowie nicht-hepatischen Zellen und der anschließende Transport zur Leber stellt eine zentrale Funktion der HDL bzw. lipidfreier Apolipoproteine dar; man bezeichnet diesen Mechanismus als „Reverse-Cholesterol-Transport“. Dabei kann HDL-Cholesterol entweder direkt von Hepatocyten aufgenommen oder von HDL auf Triacylglycerid-reiche Lipoproteine oder LDL übertragen werden, die es ihrerseits zur Leber transportieren (Oram et Yokoyama 1996, Krieger 1999).

Bis jetzt ist unbekannt, ob die Lipidierung der Cholesterolakzeptoren nur intra- oder extrazellulär bzw. womöglich sowohl intra- als auch extrazellulär erfolgt. Einerseits konnte gezeigt werden, daß Lipid-freie Apolipoproteine einen Phospholipid- und Cholesterol-Efflux aus verschiedenen Zellen, z.B. Hepatocyten und Makrophagen, induzieren können, was eine extrazelluläre Lipidierung annehmen lässt (Forte et al. 1993, Asztalos et al. 1997).

Andererseits ist beobachtet worden, daß Makrophagen, Fibroblasten und Hepatocyten lipid-freie Apolipoproteine, HDL und Chylomikronen-Remnants internalisieren können, um anschließend lipidierte Apolipoproteine zu sezernieren (Takahashi et Smith 1999, Heeren et al. 1999).

Die zwei bekanntesten der mit HDL an der Zelloberfläche interagierenden Proteine, sind der ATP-binding-Casette-Transporter A1 (ABCA1) sowie der Scavenger Rezeptor BI (SR-BI).

2.2.1 ATP-Binding-Cassette-Transporter-A1

Der ATP-Binding-Cassette-Transporter-A1 (ABCA1) gehört zur Rezeptorfamilie der ATP-binding-Cassette-transporter. Er ist ein 2261-Aminosäuren großes Membranprotein, bestehend aus zwei gleichartigen Hälften, die kovalent miteinander verbunden sind. Beide Hälften bestehen aus je 6 Transmembrandomänen und je zwei Nukleotid-bindenden Domänen, die Walker A und Walker B genannt werden und wahrscheinlich der Bindung von ATP dienen (Dean et al. 2001, Bungert et al. 2001). ABCA1 vermittelt durch einen unbekanntem Mechanismus den Transport von überschüssigem Cholesterin, Phospholipiden und anderen lipophilen Molekülen über die Plasmamembran sowie möglicherweise auch die Aufnahme durch lipidarme oder lipidfreie Apoproteine über einen wiederum noch unbekanntem Mechanismus. Dieser Prozess konnte bei der Tangier-Krankheit als Defekt beschrieben werden, wo Mutationen des ABC1-Transporters zum Mangel an lipid-reichen α -HDL im Blutplasma führen (Schmitz et al. 1985, Brooks-Wilson et al. 1999, Bodzioch et al. 1999, Rust et al. 1999, Lawn et al. 1999, McNeish et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, daß ABCA1 die Abgabe von Cholesterol vermittelt, welches dem lysosomalen Abbaupfad entstammt und damit als Substrat der ACAT entzogen wird. Der ABCA1-abhängige Cholesterol-Efflux führt zu einem verminderten Auftreten der cytosolischen Cholesterylether-Lipid-Tropfen, dem intrazellulären pathologischen Korrelat der Schaumzellen. Es ist umstritten, ob der Lipidtransport über die Plasmamembran Energie-abhängig erfolgt, oder ob die ATPase-Aktivität möglicherweise anderen Zwecken dient (Lin et Oram 2000). Oram postulierte jüngst, daß ABCA1 gemeinsam mit lipidarmen Apolipoproteinen in endosomalen Vesikeln vorliegt, um hier Lipide in exocytotische Vesikel abzugeben, bevor der Rezeptor isoliert an die Zelloberfläche resezerniert wird (Oram 2002). Neufeld et al. zeigen über ein Fusions-Protein aus ABCA1 und green-fluorescent-Protein (GFP), welches sie in HeLa-Zellen exprimieren, daß ABCA1 in einem Kreislauf zwischen Plasmamembran und späten Lysosomen recycelt wird. Zudem lässt sich beobachten, daß ABCA1 den Cholesterol-Efflux

aus Endosomen fördert und parallel zum ABCA1-abhängigen Cholesterol-Efflux ApoA-I internalisiert und reseziert wird (Neufeld et al. 2001). Es ist auch denkbar, daß Cholesterol von späten Endosomen in den Golgi-Apparat verbracht wird und dort eine Assoziation mit Sphingolipiden eingeht. Die hierbei entstehenden Komplexe führen dann zu Cholesterol-reichen Mikrodomänen an der Zelloberfläche, wo sie als membranständige Quelle für den ABCA1-vermittelten Efflux dienen (Chen et al. 2000, Chen et al. 2001).

Neuere Untersuchungen unterstützen die zentrale Stellung des ABCA1 bei der Senkung des plasmatischen Cholesterol-Spiegels, sowie der Abgabe überschüssigen Cholesterols aus Makrophagen. Dabei spielt offensichtlich die Modulation der ABCA1-Expression durch transkriptionale und posttranskriptionale Prozesse über Sterole und andere Moleküle eine Rolle. So binden die nukleären Hormon-Rezeptoren Liver-X-Rezeptor (LXR) sowie der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) an Regionen des ABCA1-Gen-Promoters und verschiedener Intron-Regionen und aktivieren hierüber die Transkription. LXR und RXR sind wiederum aktivierbar über Sterole, Retinoide (Schmitz et Langmann 2001). Zudem erfolgt die ABCA1-Regulation über nicht LXR/RXR-abhängige Mechanismen, wie cAMP und Analoga, Interferone und andere Moleküle.

2.2.2 Scavenger-Rezeptor-B1

Ein anderer wichtiger Transportmechanismus des Cholesterolmetabolismus ist der „Scavenger-Rezeptor-Pathway“, bei dem es zur selektiven Aufnahme von HDL-Cholesterol über den Scavenger-Rezeptor B1 (SR-B1) kommt. 1996 wurde der SR-B1 von Acton et al. als erster HDL-Rezeptor beschrieben. Es handelt sich bei SR-B1 um ein 82000 Mr-Glycoprotein aus der Gruppe der CD36-Proteine, das vor allem von Steroid-produzierendem Gewebe, aber auch Makrophagen, der Leber, Astrocyten sowie glatten Gefäßmuskelzellen des Gehirns sezerniert wird (Husemann et Silverstein 2001). Das in die Zellen - insbesondere über HDL - aufgenommene Cholesterol wird einerseits, z.B. in der Nebennierenrinde, zur Produktion von Steroiden, von der Leber jedoch primär zur Bildung von Gallensäuren verwandt oder in die Galle sezerniert (Schwartz et al. 1978). Die Überexpression von SR-B1 in der Leber wirkt somit verständlicherweise antiatherogen, da sie den Abbau von atherogenen Lipiden beschleunigt. In der Summe führt eine SR-B1-Defizienz bei SR-B1-Knockout-Mäusen somit auch zu deutlich erhöhter Atherosklerose (Trigatti et al. 2000).

Man ging bisher davon aus, daß HDL über SR-B1 an die Plasmamembran bindet und es zur Diffusion von Cholesterylestern entlang eines Konzentrationsgradienten in die Plasmamembran kommt, ohne daß HDL internalisiert würde (Rodriguez et al. 1999). Silver und Mitarbeiter konnten jedoch in Pulse-Chase-Experimenten an Mäuse-Hepatocyten und CHO-Zellen beweisen, daß SR-B1 zusammen mit HDL endosomal internalisiert und HDL anschließend reseziert wird (Silver et al. 2001). Auch lässt sich an SR-

überexprimierenden Zellen fluoreszenz-markierte HDL 10 min. nach extrazellulärer Bindung an SR-BI eindeutig in endosomalen Kompartements lokalisieren (Gu et al. 1998). Rodriguez et al. berichten außerdem, daß Inhibitoren der Clathrin-stabilisierten Coated-pits (Stachelzellgrübchen) nicht die Aufnahme von Cholesterol aus HDL über SR-BI hemmen (Rodriguez et al. 1999). Diese Beobachtung deckt sich mit der Untersuchung von Babitt und Mitarbeitern, wonach SR-B1 tatsächlich vor allem in Caveolae lokalisiert ist (Babitt et al. 1997). Hierbei handelt es sich im Gegensatz zu Coated-pits um Detergentien-resistente Plasmamembran-Invaginationen die kein Clathrin, dafür jedoch Caveolin enthalten und außerdem mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert sind. Für Coated-pits ist die Assoziation mit Lipoprotein-Rezeptoren –insbesondere dem LDLR - nachgewiesen, die Beteiligung von Caveolae am Lipid-Metabolismus ist noch immer nicht hinreichend aufgeklärt. Dennoch lehnt Silver eine besondere Bedeutung der Cholesterol-reichen Caveolae für den selektiven Cholesterol-Transport über SR-BI ab, da die Extraktion von Caveolae-Cholesterol über Cyclodextrin hierauf keinen Einfluß zeigt (Silver et Tall 2001). Eine erhöhte Expression von Caveolin-1 in THP-Zellen korreliert mit einer erhöhten Expression von ABCA1 und einem vermehrten Efflux von Lipiden zu ApoA-I, wohingegen die Down-Regulation von Caveolin-1 durch Antisense-Oligonukleotide den Cholesterol-Efflux zu ApoA-I senkt (Arakawa et al. 2000). Für Caveolin-1 wird immerhin eine Sekretion im Komplex mit Lipoprotein-Partikeln beschrieben (Liu et al. 1999).

2.2.3 Makrophagen

Im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen sind in Makrophagen die Internalisation von modifizierten Lipoproteinen, insbesondere durch Typ A Scavenger-Rezeptoren, sowie die Phagozytose von Zell-Dedritus, nicht über den intrazellulären Cholesterolgehalt reguliert und führen daher zur Akkumulation von Lipiden. Dieses ist ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der Atherosklerose, da die Lipidakkumulation Makrophagen der Gefäßwand zu aktivierten Schaumzellen macht, die verschiedene Wachstumsfaktoren, Cytokine und Proteasen produzieren und somit den Verlauf der Atherosklerose beeinflussen (Fielding et Fielding 1997).

2.3 Apolipoprotein E

Das Apolipoprotein E ist ein ca. 32 kDa schweres Protein und wurde 1973 erstmalig beschrieben (Shore et Shore 1973). Es ist vor Allem Bestandteil der intestinal produzierten CM, lässt sich jedoch, in abnehmender Menge, auch in der VLDL-, IDL- und HDL-Fraktion, selten auch als Proteinanteil der LDL nachweisen (Gotto et al. 1986). Zudem wurde das freie Vorkommen von ApoE im Plasma (Castro et Fielding 1984), sowie die Assoziation mit einigen wenigen Sphingomyelinen beschrieben (Huang et al. 1994). ApoE bedingt die Löslichkeit der Chylomikronen im Blut und ermöglicht ihre Aufnahme in die Leber als Ligand

hepatischer Rezeptoren (Mahley et Ji 1999). Außerdem wird ein direkter Einfluß des ApoE auf die LpL-Aktivität diskutiert. In den letzten Jahren trat zudem vermehrt das Mitwirken von ApoE an pathophysiologischen Prozessen des Zentralnervensystems, insbesondere der Alzheimer-Erkrankung, in den Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen (Mahley et Huang 1999)

Humanes ApoE besteht aus 299 Aminosäuren und besitzt zwei separate über eine Hinge-Region miteinander verbundene strukturelle Domänen: die aus vier Helices bestehende amino-terminale Seite des Moleküls und das carboxy-terminale Drittel. Auf der 22 kDa großen aminoterminalen Seite (AS 1-191) befinden sich die Heparin- und LDL-Rezeptor-bindenden Abschnitte, die für die Bindung von Lipoproteinen keine größere Rolle zu haben scheinen. Auf der 10 kDa großen carboxy-terminalen Seite (AS 223-299) hingegen liegen amphipathische Helices, welche die Lipophilie einerseits und die Löslichkeit im Blut andererseits bewerkstelligen (Weisgraber 1994).

Humanes ApoE ist ein polymorphes Protein und hat die Isoformen ApoE2, -3 und -4, wovon ApoE2 die seltenste Variante und ApoE3 der Wildtyp ist. Sie besitzen eine identische primäre Protein-Sequenz bis auf die Aminosäuren 112 und 158. ApoE4 besitzt Arginin, ApoE2 Cystein an diesen Positionen und ApoE3 weist Cystein an Position 112 sowie Arginin an Position 158 auf (Zannis et Breslow 1981).

Die Heparin- und LDL-Rezeptor-bindenden Abschnitte befinden sich zwischen Aminosäure 136 und 150 auf der 22 kDa-großen N-terminalen Seite des Proteins und beinhalten folglich nicht die Isoform-spezifischen Positionen 112 und 158. Entsprechend binden auch alle drei Isoformen am LDL-Rezeptor, ApoE2 jedoch besitzt eine deutlich geringere Affinität und ist klinisch mit der Hyperlipoproteinämie Typ III (Remnant-Hyperlipoproteinämie) assoziiert. Der Grund dafür liegt in der durch die Umgebung isoform-spezifisch veränderten lokalen Ladungshäufung: Zaiou et al. demonstrieren, daß sowohl positive Ladungshäufung als auch eine spezifische α -Helix zur Bindung von ApoE an den LDL-Rezeptor notwendig sind und zwischen den Isoformen erheblich differieren (Zaiou et Arnold 2000).

Die speziell Lipid- und Lipoprotein-bindende Region befindet sich zwar zwischen den Aminosäuren 244 und 272 am carboxy-terminalen Ende des ApoE, doch auch auf das Bindungsverhalten von ApoE zu Lipoproteinen haben die beschriebenen Protein-Mutanten Einfluß (Inneraity et al. 1984).

Auf zellulärer Ebene lässt sich exogenes ApoE, das über Lipoproteine der beobachteten Zelle von extrazellulär zugeführt wird, von endogenem ApoE unterscheiden, das in derselben Zelle produziert wird, dessen Metabolismus es beeinflusst.

2.3.1 ApoE im TRL-Metabolismus

Als TRL werden zusammenfassend die Triacylglyceridreichen Lipoproteine VLDL und CM bezeichnet. ApoE spielt eine außerordentlich wichtige Rolle bei der hepatischen Aufnahme der TRL (Reviews: Beisiegel et al. 1989, Beisiegel 1995, Cooper 1997, Mahley et Ji 1999).

Der Vorgang der hepatischen CR-Clearance kann in drei Prozessierungsabschnitte unterteilt werden:

Zunächst werden TRL im Blut durch die endothelständige Lipoproteinlipase hydrolysiert und gleichzeitig mit ApoE angereichert (Olivecrona et Olivecrona 1995). Die LpL kann sich dabei vom Endothel lösen und mit dem CR assoziiert bleiben (Felts et al. 1975, Goldberg et al. 1986, Heeren et al. 2002). Dann kommt es zur Aufnahme der TRL-Remnants durch das fenestrierte Endothel der Lebersinusoiden in den Disse'schen Raum über Wechselwirkungen zwischen dem ApoE, der partikelassoziierten LpL und endothelständigen Heparansulfat-Proteoglykanen. Dabei fungiert das Endothel als ein Biofilter, der den Eintritt größerer TRL-Partikel verhindert und nur die kleineren, bereits hydrolysierten Partikel passieren lässt (Fraser et al. 1995). Im Dritten Schritt kommt es schließlich zur Aufnahme der Remnants in den Hepatocyten durch Wechselwirkungen zwischen einerseits LpL, ApoE und HL sowie dem LDLR, und andererseits dem LRP, HSPG und sonstigen hepatozellulären Rezeptoren. Über die physiologisch-quantitative Bedeutung der verschiedenen Rezeptoren, ihr Zusammenspiel, sowie die funktionelle Abgrenzung voneinander, besteht Uneinigkeit. Als ein möglicherweise selektiver Faktor wird die Partikelgröße beschrieben: kleine Partikel (<50 nm) scheinen über den LDL-Rezeptor (LDLR) gebunden und aufgenommen zu werden, größere Partikel über einen der Non-LDLR-Wege (Tabas et al. 1990, Tabas et al. 1991). Ein weiterer über die Form der Aufnahme entscheidender Faktor, scheint der ApoE-Gehalt des Partikels zu sein (Beisiegel et al. 1995).

Intravaskuläre TRL-Hydrolyse und Rolle der LpL

Die LpL gehört, ebenso wie die HL und die Pankreaslipase, zur Familie der Triacylglyceridlipasen und besitzt ein Molekulargewicht von 55 kDa (Iverius et Östlund-Lindquist 1976). Das Molekül weist drei wichtige Strukturdomänen auf: eine Heparin-, eine ApoC-II- sowie die stark hydrophobe Triacylglycerid-Bindungsstelle. Über die Heparin-Bindungsdomäne interagiert die LpL mit den HSPG der Endothelzellen, ApoC-II ist Bestandteil der TRL und Kofaktor der LpL.

Schon lange ist die Funktion der endothelständigen LpL bekannt, CM und VLDL im Blut zu hydrolysieren um Fettsäuren freizusetzen, die dann vom umliegenden Gewebe aufgenommen oder an Albumin gebunden werden. Während der Hydrolyse verlieren die Partikel ApoC-II und werden gleichzeitig mit ApoE angereichert (Olivecrona et al. 1993). Mehrere Arbeitsgruppen wiesen zudem schon früh darauf hin, daß die LpL sich dabei vom Endothel lösen, mit dem CR assoziiert bleiben und ein Mediator bei der hepatischen CR-

Aufnahme darstellen könnte (Felts et al. 1975, Beisiegel et al. 1991, Zhang et al. 1992, Rohlmann et al. 1998). Darauf deuten auch Untersuchungen hin, wonach die Überexpression von LpL in ApoE- und LDLR-Knockout-Mäusen über die Injektion eines adenoviralen LpL-Genkonstruktes zur deutlichen Reduktion von Plasma-Cholesterol- und Triacylglycerid-Konzentrationen führte (Zsigmond et al. 1997). In-vitro-Studien zeigen zudem, daß die LpL Bindung und Aufnahme von Lipoproteinen über Interaktionen zwischen der C-terminalen Domäne und HSPG sowie LRP vermittelt (Beisiegel et Heeren 1997). Neuere in-vivo-Experimente bestätigen diese Beobachtungen, wonach die LpL von Beginn der Hydrolyse an mit dem Partikel assoziiert bleibt und an allen Schritten der Remnant-Aufnahme beteiligt ist (Heeren et al. 2002). Das Ausmaß der Beteiligung der LpL an der hepatischen Remnant-Clearance ist umstritten: Zhang et al. weisen darauf hin, daß bei genetischer ApoE-Defizienz bzw. ApoE $-/-$ Knockout-Mäusen auch eine intakte LpL allein nicht ausreicht, um eine normale Remnant-Aufnahme zu gewährleisten (Zhang et al. 1992).

Der LDLR

Einer der wichtigsten hepatischen Rezeptoren bei der CR-Clearance und Namensgeber der LDL-Rezeptor-Familie ist der LDL-Rezeptor (LDLR). Er gehört zu den am besten aufgeklärten Rezeptoren überhaupt, und besitzt neben seiner Beteiligung an der CR-Clearance die entscheidende Aufgabe, cholesterinreiche LDL über ApoB₁₀₀ zu binden, in die Zelle aufzunehmen und damit für eine Senkung des plasmatischen Cholesterinspiegels zu sorgen. Der LDLR wird zunächst als 120 kDa schweres Präkursorprotein synthetisiert und dann im Golgi-Apparat und dem rauen endoplasmatischen Retikulum modifiziert (Cummings et al. 1983). Der aus 839 Aminosäuren bestehende Rezeptor enthält ein N-terminales, extrazelluläres Ende, das eine aus 292 Aminosäuren bestehende Bindungsdomäne mit Affinität zu ApoB₁₀₀ sowie ApoE-Bindungsfähigkeit aufweist. Diese Domäne beinhaltet Abschnitte angehäufter negativer Ladung mit Wiederholungen Cystein-reicher Aminosäuren zur Vermittlung der Apoprotein-Bindung (Gianturco et al. 1983, Brown et Goldstein 1986, Willnow et al. 1994). Dabei tritt der cytoplasmatische Anteil des Proteins in Wechselwirkung mit Klathrin, das die Ausbildung von Membraninvaginationen, sogenannter Stachelzellgrübchen oder Coated-pits begünstigt. In diesen Coated-pits sammelt sich der Rezeptor und steht dann zur Bindung von LDL oder anderen Lipoproteinen bereit (Anderson et al. 1976). Nach der Bindung kommt es zur Endocytose der Coated-pits, wobei deren Klathrinschicht verloren geht und endocytotische Vesikel entstehen. In ihnen kommt es zur pH-bedingten Dissoziation von Rezeptor und LDL sowie zum Recycling des LDLR an die Zelloberfläche. Eine LDLR-Defizienz führt aufgrund dieser zentralen Rolle zum Krankheitsbild der Familiären Hypercholesterinämie mit obligater Atherosklerose-Entstehung. Eine LDLR-Defizienz führt jedoch nicht zum vollständigen Erliegen der CR-Clearance (Kita et al. 1982, Rubinstein 1990). Es wurde daher schon bald die Existenz eines

weiteren ApoE-bindenden Rezeptors neben dem LDLR postuliert, der als LDL-Rezeptor-related Protein (LRP) identifiziert wurde.

Das LRP

Das LDL-Rezeptor-related Protein (LRP) ist ein 600 kDa schweres Molekül, welches nur ApoE, nicht jedoch ApoB100 bindet und 1988 erstmalig als der gesuchte Non-LDL-Rezeptor identifiziert werden konnte (Herz et al. 1988). Herz und Mitarbeiter klonierten einen Abschnitt aus der Cystein-reichen Apoprotein-Bindungsregion des LDLR und fanden anhand dieser klonierten Sequenz schließlich in Leber-cDNA-Datenbanken das große LRP-Molekül und seine zahlreichen homologen Regionen zum LDLR. Liganden-Bindungsstudien wiesen schon bald auf die ApoE-Bindungsfähigkeit des LRP hin (Beisiegel et al. 1989). Unabhängig davon wurde der α_2 -Makroglobulin-Rezeptor der Plazenta und seine Übereinstimmung mit dem LRP gefunden (Kristensen et al. 1990). Da LRP für die normale embryonale Entwicklung von Mäusen unentbehrlich ist, war es zunächst nicht möglich, die Bedeutung des LRP über LRP-Knockout-Mäuse zu untersuchen. LRP liegt intrazellulär in Assoziation mit einem als Chaperon dienenden 39 kDa-Protein vor, das als Rezeptor-assoziiertes-Protein (RAP) bezeichnet wird. Willnow und Ishibashi beobachteten 1994, daß LDLR-Knockout-Mäuse mit erhöhter RAP-Produktion, die eine vollständige Blockade der Bindungsstellen am LRP bewirkte, CR akkumulieren (Willnow et al. 1994). Rohlmann und Mitarbeiter gelang es bald, loxP-Abschnitte ins Genom der Mäuse zu integrieren, die es erlauben, das LRP-Gen nach Abschluß der Entwicklung zu inaktivieren. Auf diese Weise konnte wiederum gezeigt werden, daß es zur CR-Akkumulation bei Inaktivierung des LRP kommt (Rohlmann et al. 1998). Zudem wurde die Existenz mehrerer weiterer Rezeptoren aus der Familie des LDL-Rezeptors gezeigt, deren Rolle bei der CR-Clearance jedoch eher nachrangig zu sein scheinen (Krieger et Herz 1994, Schneider et al. 1997). LRP bindet neben ApoE und α_2 -Makroglobulin noch HL, LpL sowie weitere Liganden und wurde deshalb als Multi-Liganden-Protein beschrieben.

Rolle der Heparansulfat-Proteoglykane

Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG), die sich sowohl in der Glycokalix der hepatischen Endothelzellen, als auch in jener der Hepatocyten befinden, wird vor allem von Mahley und Mitarbeitern eine wichtige Rolle zugeschrieben. Demnach tragen sie über die negativ teilgeladene LpL, ApoE, sowie andere Rezeptoren zunächst zur Bindung und Aufnahme der CR aus den Lebersinusoiden in den Disseschen Raum bei (Al Haideri et al. 1997, Mahley et Ji 1999). Anschließend sollen sie auch an der Aufnahme der CR aus dem Disseschen Raum in den Hepatocyten beteiligt sein. Mahley et al. diskutieren für letzteres drei Wege: Zum einen den Transfer des Remnants von löslicher HSPG zum membranständigen LRP, zweitens die Internalisation eines Remnant/HSPG/LRP-Komplexes und drittens die

Aufnahme des Remnants ausschließlich über zellmembranständige HSPG (Mahley et Ji 1999). Tatsächlich zeigen alle wichtigen, an der Remnant-Clearance beteiligten Proteine - LDLR, LRP, LpL, HL und ApoE -, eine Bindungsaffinität zu HSPG (Mahley et al. 1994). In-vitro-Studien haben gezeigt, daß die Aufnahme ApoE-angereicherter β -VLDL nach Heparin-induzierter Entfernung der sulfatierten Glycosaminoglycan-Seitenketten deutlich reduziert ist (Ji et al. 1993). Auch bei weiterführenden in-vivo-Studien reduzierte die portalvenöse Infusion von Heparin die Aufnahme von β -VLDL sowie CR in die Leber um mehr als die Hälfte im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ji et al. 1995). Zudem schreiben Mahley und Mitarbeiter den HSPG die Funktion eines ApoE-Reservoirs im Disseschen Raum zu, das durch Übertragung des ApoE auf Remnants deren Aufnahme erleichtert.

Rolle der HL

Die HL ist ein weiterer Ligand, der eine Rolle bei der hepatischen TRL-Aufnahme zugeschrieben wird. Sie wird ausschließlich in der Leber produziert und befindet sich auf der Oberfläche der hepatischen Endothelzellen sowie auf den Hepatocyten selbst (Kuusi et al. 1979, van Tol et van Berkel 1980, Hornick et al. 1992). Ihre Bedeutung ist jedoch umstritten: Während Studien von Cooper und Mitarbeitern an transgenen CHO-Zellen mit Ratten-cDNA zur HL-Expression keine erhöhte Bindung oder Aufnahme von CR ergaben (Choi et al. 1994), lieferten verschiedene andere Studien gegenteilige Ergebnisse (Ji et al. 1994). Im Gegensatz zu LpL besitzt HL eine Phospholipase-Aktivität, die möglicherweise einen ebenfalls nicht unwesentlichen Beitrag in der Vorbereitung der CR zur hepatischen Aufnahme spielen könnte (Borensztajn et al. 1990).

2.3.2 ApoE-Recycling

Bereits 1989 kam Wong zu der Vermutung, daß ApoE ein anderes intrazelluläres Schicksal erfahren könnte als ApoB, da ein exogener Anteil von mehr als 60% am endosomal lokalisierten Gesamt-ApoE identifiziert werden konnte, während endosomales ApoB nur zu weniger als 10% von extrazellulär aufgenommen war (Wong 1989). 1990/91 stellten Maxfield und Mitarbeiter fest, daß die Lokalisation Triazyglyzeridreicher Partikel nach Aufnahme in Maus-Makrophagen neben der Größe auch vom ApoE-Gehalt der Partikel abhängig sein könnte. Während nach Internalisation größerer, ApoE-reicher β -VLDL der Label in der Nähe der Plasmamembran verblieb, wurde die Markierung nach Aufnahme kleinerer, ApoE-ärmer β -VLDL in perinukleäre Kompartimente verbracht, wie es auch für die intrazelluläre Degradation von LDL typisch ist (Tabas et al. 1990, Tabas et al. 1991). Zudem wurde beobachtet, daß Lipide aus internalisierten β -VLDL in Lysosomen, ApoE hingegen in peripheren Sekretionsvesikeln zu finden waren (Tabas et al. 1990, Tabas et al. 1991, Myers et al. 1993). Beisiegel et al. sowie Chen et al. zeigten 1995, daß 125 I-markiertes ApoE nach Inkubation von Zellkulturen von diesen reseziert wurde (Beisiegel et al. 1995, Chen et al.

1995). 1999 konnten Heeren et al. an humanen Hepatoma-Zellen und Fibroblasten in vitro zeigen, daß das Apoprotein E, sowie ApoC und LPL nach zellulärer Aufnahme von TRL an die Oberfläche reseziert, die Lipidanteile der TRL dagegen, sowie ApoB, von der Zelle lysosomal abgebaut werden (Heeren et al. 1999).

Mehrere Studien bestätigten kürzlich das ApoE-Recycling in vivo: Fazio et al. injizierten Mäusen ¹²⁵I-ApoE-markierte VLDL und entnahmen die Mäuse-Lebern 10, 30 sowie 60 min. nach Injektion. Sie präparierten die Golgi-Vesikel der Hepatocyten und konnten in den Sekretions-Vesikeln hohe Konzentrationen des iodierten ApoE nachweisen. Außerdem beobachteten sie eine Unabhängigkeit dieses Phänomens von der endogenen ApoE-Produktion an ApoE-defizienten Mäusen. Sie stellten weiterhin fest, daß das im Golgi-Apparat befindliche ApoE in Komplexen mit einer Dichte von $d=1,019-1,21$ g/ml vorlag und deuteten dies als mögliche Assoziation des resezierten ApoE in neu entstandenen Lipoprotein-Partikeln (Fazio et al. 1999). Rensen et al. bewiesen in vivo an Maus-Hepatocyten und in vitro, daß der lysosomale Abbau von TRL-Proteinen und ApoE deutlich reduziert ist gegenüber dem Abbau von Cholesteryloleaten (Rensen et al. 2000). Auch die partikelassoziierte LpL scheint mit ApoE und anderen Oberflächen-Bestandteilen internalisierter TRL reseziert zu werden (Heeren et al. 2001). Swift und Mitarbeiter untersuchten 2001 das Recycling von ApoE an Mäusen, denen nur exogenes ApoE zugeführt wurde. Dazu transplantierten sie ApoE-Knockout Mäusen ApoE $+/+$ -Wildtyp-Knochenmark mit der Geninformation zur makrophagocytären ApoE-Produktion (Swift et al. 2001). Sie stellten fest, daß bis zu 60 % dieses rein nicht-hepatischen ApoE wiederverwertet wird. Es konnte an LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen in vivo gezeigt werden, daß das Recycling von „Surface-Remnants“ nach Aufnahme von TRL-Remnants auch ohne LDL-Rezeptoren auf der Hepatocytenoberfläche erfolgt (Ishibashi et al. 1994, Fazio et al. 1999), was die Prozessierung des ApoE-Recyclings über einen Non-LDLR-Weg, möglicherweise dem LRP, bestätigt.

Vom ApoE-Recycling abzugrenzen ist die Wiederabgabe von ganzen Lipoprotein-Partikeln an die Zelloberfläche, die als „Retroendocytose“ zunächst für LDL (Aulinkas et al. 1981, Aulinkas et al. 1985), sowie 1993 für VLDL beschrieben wurde (Lombardi et al. 1993).

2.3.3 ApoE und Atherosklerose

ApoE wird zwar hauptsächlich in der Leber, aber auch in Zellen des Zentralnervösen Systems sowie in peripheren Makrophagen synthetisiert. (Basu et al. 1982, Williams et al. 1985, Mazzone et al. 1996, Lucas et al. 1997). Niedriges ApoE ist außerdem ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung der Atherosklerose sowie einer koronaren Herzkrankheit (Wilson et al. 1993). Die Entwicklung einer schweren Hyperlipidämie ist Folge der Abwesenheit oder Dysfunktion von ApoE (Mahley et al. 1999, Fazio et al. 1994). Umgekehrt konnten erhöhte Cholesterol-Werte von ApoE $-/-$ -Mäusen durch eine

Knochenmarkstransplantation mit der genetischen Anlage für ApoE-produzierende Makrophagen sowie durch andere Formen der Zufuhr von ApoE gesenkt werden (Bellosta et al. 1995, Boisvert et al. 1995).

Für diese antiatherosklerotische Wirkung des ApoE ist einerseits die Funktion des ApoE als Ligand zur hepatischen Aufnahme Cholesterol-haltiger Lipoproteine von Bedeutung (s.u.). Andererseits gibt es einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von ApoE und dem Efflux von Cholesterol aus Zellen (Basu et al. 1983, Zhu et al. 1998). Bemerkenswerterweise erfolgt die deutliche morphologische Reduktion atherosklerotischer Gefäßläsionen schon bei Produktion so geringer ApoE-Mengen, das die ApoE-Konzentration nicht ausreicht, um eine Besserung der Hyperlipidämie herbeizuführen (Fazio et al. 1997, Thorngate et al. 2000, Athanasopoulos et al. 2000, Zhu et al. 1998). Das spricht dafür, daß ApoE vorrangig intrazelluläre Wirkung hervorruft und macht die Beteiligung des ApoE-Recycling an diesen Prozessen durchaus wahrscheinlich. Darüberhinaus sind die möglichen Interaktionspartner von ApoE in der Pathogenese groß; der Tumornekrosefaktor- α , Interferon- γ , die LPL- und die Scavenger-Rezeptor-Expression sowie die T-Lymphocyten-Proliferation stehen in vielfältigen, noch größtenteils unverstandenen Interaktionen mit ApoE-Expression, Sekretion und Konzentration (Pepe et Curtiss 1986). Die Erleichterung des Cholesterol-Effluxes erfolgt nach mehreren Untersuchungen in höherem Maße bei Bereitstellung von endogenem gegenüber exogenem, also Lipoprotein-assoziierten, ApoE (Mazzone et Reardon 1994, Lin et al. 1999). Auch andere Studien deuten daraufhin, daß eine differenzierte Betrachtung der Unterschiede in den biologischen Wirkungen von endogenem und exogenem ApoE notwendig ist. Ho et al. verweisen z.B. darauf, daß endogenes ApoE im Gegensatz zu exogenem die hepatische TRL-Aufnahme hemmt und überhaupt nur exogenes ApoE den zellulären Triazylglyzerid- und Cholesterolester-Metabolismus beeinflusst. Sie konnten außerdem abweichende zelluläre Lokalisationen feststellen; während sich endogenes ApoE in perinukleären Golgi-Vesikeln befand, wurde exogenes in lysosomalen Kompartments identifiziert (Ho et al. 2000). Daraus schlossen sie auf unterschiedliche intrazelluläre Stoffwechselwege für exogenes und endogenes ApoE.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Geräte

Gamma-Counter (Hewlett-Packard)

β-Counter (Hewlett-Packard)

Tischzentrifuge

Ultrazentrifuge (Beckmann)

Spektralphotometer (Hitachi)

Blottingkammern (Biorad)

Chemikalien und Verbrauchsmittel

Alle Materialien, sofern nicht anders angegeben entsprechen der folgenden Aufstellung:

GIBCO: Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), PBS

Sigma: Bovines Serum Albumin (BSA), Sucrose

Merck: NaCl, Triton, Glycin, HCL, Methanol, TCA,

Roth: Tris, Acrylamid

Biorad: Tween20

Pierce: Albumin Standard

Serva: SDS, Temed, Ammoniumpersulfat, BSA, β-Mercaptoethanol

Humane Chylomikronen

Zur Gewinnung von Humanen Chylomikronen konnte Plasma von zwei Patienten der Lipidambulanz entnommen werden. Sie leiden an Typ-I-Hypertriazylglyzeridämie, akkumulieren also Chylomikronen aufgrund eines genetischen Defekts. Beschrieben wird eine Punktmutation, die über pathologisches Splicing des ApoCII-Gens zu einer ApoCII-Defizienz führt. (Fojo et al.1988)

Zellen

Als Zellmaterial wurden die humane Hepatoma-Zelllinie 7 (HuH7) sowie die Haut-Fibroblasten-Zelllinie des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg benutzt.

3.2 Methoden

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Cholesterolfstoffwechsel und ApoE-Recycling dienten metabolische Pulse-Chase-Experimente (s. 3.2.1). Als Liganden wurden Triazyglyzerid-reiche Lipoproteine (TRL) verwandt, die aus dem Plasma von Patienten mit Typ-I-HyperTriazyglyzeridämie mittels Ultrazentrifugation isoliert werden konnten (s. 3.2.2). Diese charakterisierten wir zunächst bezüglich ihres Lipoproteinmusters sowie ihres Lipid- und Proteingehalts (s. 3.2.3). Um den Metabolismus des Apoprotein E aus den TRL verfolgen zu können, wurde es radioaktiv markiert (s. 3.2.4). Anschließend wurden die Proteine der markierten TRL durch eine 10%ige SDS-PAGE und Autoradiografie dargestellt (s. 3.2.5).

Grundlage der Untersuchungen bildeten die Kultivierung von Huh-7-Zellen sowie Fibroblasten (s. 3.2.6). Der Metabolismus von Cholesterolf wurde analysiert über ³H-Markierungen von Zell- oder Liganden-Cholesterolf (s. 3.2.7, 3.2.8). Nach Abschluß der Pulse-Chase-Experimente folgte eine genaue Analyse des Chase-Mediums sowie der Zellen, auf Veränderungen durch und während der Ligandeninkubation (s. 3.2.9, 3.2.10, 3.2.11). Zusätzlich zu den radioaktiven Pulse-Chase-Experimenten wurden Pulse-Chase-Experimente mit Immunfluoreszenz-Markierungen vorgenommen (s. 3.2.12). Weiterhin wurden die Ergebnisse der Pulse-Chase- und Immunfluoreszenz-Studien detaillierter auf die Beschaffenheit der resezernierten Lipoproteine untersucht. Dazu wurde nach der Durchführung von Pulse-Chase-Experimenten das Medium auf Gelfiltrationssäulen aufgetragen, um die Lipoproteinklassen voneinander zu trennen (s. 3.2.13). Die Proteine der separierten Lipoprotein-Fraktionen wurden anhand von Elektrophorese aufgetrennt und über Western-Blotting auf ihren ApoE-Gehalt überprüft (s.3.2.14). Weiterhin wurde ihr ApoE-Gehalt über ApoE-Immunoaffinitäts-Säulen-Chromatografie bestätigt (s. 3.2.15). Schließlich wurde über Slot-Blots und Western Blots die Rolle von Caveolin bei der zellulären Sekretion und Prozessierung von Lipiden im Zusammenhang mit dem ApoE-Recycling untersucht.

3.2.1 Pulse-Chase-Versuche

Es wurden für nahezu alle Studien dieser Arbeit Pulse-Chase-Experimente an HuH7-Zellen oder Fibroblasten durchgeführt.

In Pulse-Chase-Experimenten inkubiert man Zellen zunächst für eine bestimmte Zeit (60 min.) mit radioaktiv markierten Liganden (Pulse) und anschließend mit nicht-markierten Liganden oder ohne Liganden für ebenfalls eine bestimmte Zeit (Chase). So ist es möglich, die Dynamik von Aufnahme und Verarbeitung des Liganden in Zelle, Zellorganellen und Medium zu studieren (e.g. Castle JD et al. 1972).

Material

- Pre-Pulse-Medium: ^3H -Cholesterol-LDL in DMEM(ad ≈ 100000 cpm/ml final)
- Pulse-Medien
 - o ^{125}I -ApoE-TRL in 2,5% BSA-DMEM (ad ≈ 500000 cpm/ml final)
 - o ^{125}I -TRL in 2,5% BSA-DMEM (ad ≈ 500000 cpm/ml final)
 - o ^3H -Cholesterol- ^{125}I -ApoE-TRL in 2,5% BSA-DMEM (ad ≈ 500000 cpm/ml final)
 - o ^3H -Cholesterol- ^{125}I -TRL in 2,5% BSA-DMEM (ad ≈ 500000 cpm/ml final)
- Chase-Medien
 - o HDL₃ in 1% BSA-DMEM (ad final 50 $\mu\text{g/ml}$)
 - o BSA
 - o 150 μl delipidierte (=nascente) HDL₃ in 13 ml 0,1% BSA-DMEM
 - o Menschliches Serum: 1,3 ml menschliches Mischserum zweier Probanden in 13 ml 0,1%BSA-DMEM

Vorgehensweise bei Pulse-Chase-Versuchsordnung mit Liganden-Doppelmarkierungen

Zunächst wurde eine ^3H -Cholesterol- ^{125}I -ApoE- sowie eine ^3H -Cholesterol- ^{125}I -Doppelmarkierung (Unterschied siehe Kapitel Methoden, Radioaktive Markierung der Apolipoproteine) an TRL vorgenommen. Huh7-Zellen wurden für 60 min. bei 37°C mit reinem DMEM ausgehungert. Dann erfolgte an den Huh7-Zellen 60 min. Pulse mit den doppelmarkierten TRL bei 37°C. Die Radioaktivität wurde abgenommen und die Zellen auf Eis mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin mehrfach gewaschen. Daraufhin erfolgte 60 min. Chase bei 37°C \pm HDL₃. Anschließend wurde das Chase-Medium möglichst vollständig von den Zellen abgenommen. Die Zellen wurden mit NaOH von den Zell-Schalen gelöst und dadurch gleichzeitig lysiert. Das Zellysats wurde dreigeteilt; Mit einem Teil wurde eine Lipid-Extraktion nach Dole, mit dem zweiten eine TCA-Fällung durchgeführt. Der Lipid-Überstand nach Dole konnte nun auf den ^3H -Cholesterol-Gehalt, das gefällte Protein auf ^{125}I -ApoE-Gehalt untersucht werden. Am dritten, verbleibenden Teil des Zellysats wurde der Proteingehalt bestimmt (nach der Bradford-Methode) und auf den Gesamtproteingehalt aufgerechnet. Eine Schale Zellen wurde nur dem Pulse unterzogen und anschließend direkt analysiert, um einen Richtwert der Gesamtmenge an Radioaktivität zu ermitteln, die die Zellen nach Pulse aufgenommen haben. Die Gesamtaktivität nach dem Pulse in der Zelle, sowie die ermittelten Radioaktivitäten in Medium und Zellen nach Chase wurden auf den ermittelten Proteingehalt der Zellen (Bradford s.o.) bezogen [cpm/ mg Zell-Protein].

Vorgehensweise bei Pulse-Chase-Versuchsanordnung mit Einfachmarkierungen und Prepulse

Das Chase-Medium wurde von den Zellen abgenommen und ebenso wie die Zellen selbst auf ^3H -Cholesterol und ^{125}I -ApoE-Gehalt analysiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Natronlauge von der Petrischale abgelöst und das Zellprotein denaturiert. Anschließend wurde ein Teil vom Zellysat zur Analyse auf Radioaktivität benutzt, der andere Teil zur Proteinbestimmung nach Bradford. Der ermittelte Gehalt an ^3H -Cholesterol sowie ^{125}I -ApoE in Medium bzw. Zellysat wurde dann auf die bestimmte Menge an Zellprotein bezogen.

3.2.2 Isolierung von TRL aus dem Plasma von Patienten mit Typ I HyperTriazyglyzeridämie

Den Patienten der Lipidambulanz mit Typ-I-HyperTriazyglyzeridämie wurde EDTA-Blut abgenommen. Die zellulären- und Gerinnungsbestandteile wurden zur Gerinnung gebracht und der Plasma-Überstand abgenommen. Aufgrund der unterschiedlichen Eigendichte der Lipoproteine konnten nun die TRL mittels Ultrazentrifugation isoliert werden. Es wurde dazu das Plasma mit einem Sucrose-Anteil von 10 Vol% an der Gesamt-Lösung versetzt. In Beckmann-Zentrifugen-Röhrchen wurde PBS vorgelegt und sorgfältig mit der Plasma-Sucrose-Lösung unterschichtet. Die so vorbereiteten Proben wurden für 45 min. in der Beckmann-Ultrazentrifuge bei 38'000 U/min zentrifugiert. Anschließend konnten die TRL als ein breites Lipid-Pellet abgenommen werden. Die Lipid-Pellets wurden erneut mit 10% Sucrose-Lösung beschwert, wiederum nach Vorlage von PBS unterschichtet und zentrifugiert. Diese Prozedur wurde 4fach vorgenommen, um die TRL möglichst vollständig von Albumin zu trennen.

Aus 40 ml Plasma konnte auf diese Weise ca. 6 ml TRL-Lösung gewonnen werden.

3.2.3 Quantifizierung des Lipid- und Proteingehaltes

Material

- Hitachi Photometer
- Lowry-Protein-Bestimmung:
 - o Lösung A: 2% Na_2CO_3 ; 0,02% Kaliumnatriumtartrat; in 0,1 N NaOH
 - o Lösung B: 0,5% CuSO_4 ; 5% SDS; in H_2O
 - o Lösung C: Lösung A und Lösung B im Verhältnis von 50:1
 - o Folin-Phenol-Reagenz
 - o Albumin-Standard (Fa. Pierce)
- Cholesterinbestimmung:
 - o Cholesterin-Reagenz CHOD-PAP (Fa. Roche)
 - o Precinorm, Precipath, Kalibrator (Fa. Roche)
- Triazyglyzeridbestimmung: Triazyglyzerid-Reagenz (Fa. Roche)

Methode

Zur näheren Charakterisierung der TRL wurde der Proteingehalt nach Lowry und der Triazylglyzerid- sowie Cholesteringehalt enzymatisch bestimmt.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem Lowry-Verfahren (Lowry et al. 1951), bei dem Cu^{2+} -Ionen im alkalischen Milieu, gemäß der Biuret-Reaktion, mit Proteinen einen Komplex bilden. Dieser ermöglicht wiederum die Bildung eines instabilen blauen Komplexes mit dem Folin-Ciocalteau-Reagenz, der als Maß der Proteinkonzentration dient. Zur Schaffung des alkalischen Milieus wurden 20 μl Probe mit 80 μl 0,1 N NaOH versetzt, dann 1 ml Lösung C hinzugegeben, gevortext und für mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Jetzt wurde Folin-Reagenz 1:2 mit H_2O verdünnt und davon je 100 μl den Proben beigefügt, gevortext und im Dunkeln für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend konnte nun photometrisch die Extinktion bestimmt und über eine mitgeführte Verdünnungsreihe mit Albumin-Standard auf die Proteinkonzentration rückgeschlossen werden.

Für die Cholesterinbestimmung wurde ein kolorimetrisches Kit der Firma Roche verwandt. Hierbei wird nach einer modifizierten vollenzymatischen Methode von Roeschlau/Allain vorgegangen. Sie beruht auf der Spaltung des Cholesterinester durch die Cholesterinase und anschließender Umwandlung durch die Cholesterinoxidase. Bei dieser Reaktion entsteht Wasserstoffperoxid das mit 4-Aminophenazon und Phenol über Peroxidase einen roten Farbstoff bildet. Seine Farbintensität ist direkt proportional der Cholesterinkonzentration und wurde anschließend bei 546 nm photometrisch gemessen. Dazu wurden 10 μl Probe mit 1 ml Reagenz versetzt und anschließend 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Eichung des Photometers wurden Leerwerte (nur Reagenz) sowie Standardwerte und ein Kalibrator der Firma Roche mitgeführt.

Für die Bestimmung der Triazylglyzerid-Konzentration wurde ebenfalls ein vollenzymatisch-kolorimetrisches Kit der Firma Roche benutzt, wovon je 1 ml zu 10 μl Probe gegeben wurden. Anschließend ebenfalls 5 Minuten Inkubation bei 37°C und photometrische Bestimmung über Eichfaktor bei 546 nm.

3.2.4 Radioaktive Markierung der Apolipoproteine

Material

- TRL (CM-Präparation)
- ^{125}I Na (Amersham, Braunschweig)
- Glycinpuffer (1M Glycin mit 1 N NaOH auf pH 10 eingestellt)
- Iodmonochlorid-Lösung (3,3 mM ICl, 2M NaCl in 0,1 N HCl)
- PD10-Gelfiltrationsäule
- Gesonderter Radioaktiv-Abfall (z.B. Fa. Amersham)

Methode

Zur radioaktiven Markierung der TRL wurde die Jodmonochlorid-Methode nach McFarlane angewandt (McFarlane, 1958) Die Methode beruht auf der Reaktion von $^{125}\text{I}^-$ und ICl. Hierbei wurden im einen Fall sämtliche Proteine der TRL markiert, im anderen Fall isoliertes ApoE, was anschließend mit den TRL reassoziert wurde. Dazu wurden 0,5 mg TRL mit PBS auf ein Volumen von 1 ml gebracht und mit 800 μl Glycinpuffer versetzt. Eine vorbereitete Lösung aus 6 μl $^{125}\text{I}^-$ mit einer Aktivität von 22,2 MBq und 200 μl Glycinpuffer wurde dann zur Lipoprotein-Emulsion gegeben, sowie 40 μl ICl. Für 2 min erfolgte nun die Iodierungsreaktion bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde dann über eine PD-10-Gelfiltrationssäule von freiem $^{125}\text{I}^-$ und $^{125}\text{I}_2$ getrennt. Die Iodierung wurde von Dr. Heeren durchgeführt.

3.2.5 Auftrennung der ^{125}I -markierten Apolipoproteine mittels SDS-Page und Autoradiografie

Material

- Elektrophoresekammer und Gelplatten: Fa. Desaga
- Trenngel (für 10%iges Gel)
 - 10 ml Untere Acrylamidlösung: 40g Acrylamid; 0,4 g Bisacrylamid; ad 100 ml mit H_2O
 - 10 ml Untergelpuffer: 20,68 g Tris auf pH 9,18 eingestellt mit 18% HCl; ad 100 ml mit H_2O
 - 50 μl Temed
 - 200 μl Ammoniumpersulfat-Lösung: 0,1 g Ammoniumpersulfat ad 1 ml mit H_2O
 - H_2O ad 40 ml
- Sammelgel
 - 5 ml obere Acrylamid-Lösung: 12 g Acrylamid; 0,8 g Bisacrylamid; ad 100 ml mit H_2O
 - 5 ml Obergelpuffer: 2,42 g Tris, pH 6,14 mit 1 N H_2SO_4 ; ad 100 ml mit H_2O
 - 2 ml Ammoniumpersulfat-Lösung (s.o.)
 - 20 μl Temed
 - 8 ml H_2O
- Bromphenolblau: Eine Spatelspitze Bromphenolblau in H_2O
- 87%iges Glycerin in H_2O
- Elektrodenpuffer
 - Unterpuffer: 0,42 M Tris; pH 9,5 mit 18% HCl; ad 5000 ml mit H_2O
 - Oberpuffer: 0,04 M Borsäure; 0,04 M Tris; 5 g SDS; ad 5000 ml H_2O ; pH 8,64
- β -Mercaptoethanol (Fa. Serva)

- SDS-Lösung (10% Natriumdodecylsulfat (Serva) in 50 mM Tris-HCl (Roth))
- Entfärber-Lösung (Ethanol/Eisessig/Aqua bidest, 50:10:40)
- Kodak-Biomax-Röntgenfilm
- Alle anderen Materialien wie oben angegeben

Methode

Zur elektrophoretischen Auftrennung der ^{125}I -ApoE-markierten Lipoproteine wurde, ebenso wie bei allen anderen Proteinen, die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese in der modifizierten Form nach Neville angewandt (Neville, 1971).

Dazu wird das Trenngel aus Acrylamidlösung, Puffer, Temed- und Ammoniumpersulfatlösung (AP) angesetzt, in die Apparatur gefüllt, zum Oberflächenausgleich mit Isobutanol überschichtet und zur Polymerisation einige Zeit stehen gelassen. Anschließend wird das Butanol wieder abgenommen, die Sammelgel-Lösung bis auf Ammoniumpersulfat und Temed angesetzt und mit ihr die Apparatur zweimal gespült. Die nachfolgende Zugabe von Ammoniumpersulfat und Temed initiiert die Polymerisation, so daß die Lösung nun unverzüglich in die Apparatur gegeben werden muß.

Zur Aufreinigung der TRL-Proteine für die SDS wurde sie einer zweimaligen Folch-Lipid-Extraktion mit Chloroform-Methanol-Gemisch von 8:5 (Gew.prozent) unterzogen. Dabei wurden ^{125}I -TRL mit einer Aktivität von ca. 100'000 cpm durch Wasserzugabe auf 100 μl verdünnt. Dazu wurde 1ml Chloroform-Ethanol gegeben. Die Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt, dann 5 min bei 13'000 rpm/min zentrifugiert, der Lipidüberstand abgenommen. Es folgte der zweite Durchgang der Folch-Lipid-Extraktion: Nochmalige Zugabe von 1ml Chloroform-Methanol sowie Zentrifugation und Abnahme des Überstandes. Anschließend wurde nochmals kurz anzentrifugiert und der letzte Tropfen des Überstands entfernt, da das Proteinpellet sehr trocken sein muß.

Die Proteinpellets wurden durch Zugabe von je 30 μl SDS-Tris (Natriumdodecylsulfat = sodium dodecyl sulfate, SDS) in Lösung gebracht, da SDS nahezu alle nicht-kovalenten Bindungen nativer Proteine aufhebt. Das zugegebene β -Mercaptoethanol (je 15 μl) reduziert die Disulfidbrücken und zerstört so die Tertiärstruktur. Die SDS-Anionen binden sich an je ca. zwei Aminosäurereste der Hauptketten und bilden so einen stark negativen Komplex, dessen Ladung sich zur Masse des Proteins ungefähr proportional verhält. Durch Zugabe von je 90 μl H_2O wurden die gelösten Proteine weiter suspendiert. Je Probe final 8% Glycerin diente zur Beschwerung der Proben, Bromphenolblau kennzeichnet die Lauffront. Neben den ^{125}I -markierten TRL werden BSA als Proteinvergleich und ein Marker mitgeführt.

Alle Proben werden im Schüttler unter dem Abzug zunächst 5 min bei 1400 rpm geschüttelt, dann bei 95 °C für Minuten gesiedet. Wenn sie wieder aus dem Schüttler genommen werden, werden sie kurz anzentrifugiert um radioaktive Tropfen vom Deckel zu entfernen. 10 μl -Aliquots werden im μ -Counter gemessen, um sie auf ca. 100 cpm/ μl zu verdünnen. Beim

Einfüllen der radioaktiven Proben wurde immer eine Tasche freigelassen, damit sich die Radioaktivität nicht überlagert. Nun können die Proben nach der berechneten Aktivität einpipettiert werden. Durch die Glycerolbeschwerung fließt die Probe am Glas entlang in die Geltaschen. Das Gel wird bei 20 mA einlaufen gelassen, nach 10 min wurde auf 40 mA erhöht und für ca. 3-4 Stunden laufengelassen.

Zur Coomassie-Färbung des fertigen Gels wurde für 30 min mit Coomassie-Farbstoff auf einem Schüttler inkubiert. Mit Ethanol-Entfärbter wurde dann 1-2 mal für wenige Minuten und ein drittes Mal über Nacht im Kühlraum bei 4° auf dem Schüttler gewaschen. Das Trocknen des Gels wurde im Rahmen mit Drying-Filmen im Trockenschrank oder bei Raumtemperatur aufgestellt.

Anschließend wurde ein Kodax-Biomax-Röntgenfilm bei -80°C für 48 Stunden belichtet.

3.2.6 Zellkultur

Material

- Zellkulturflaschen, Petrischalen, Röhrchen: Fa. Nunc, Dänemark
- Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM); GIBCO #41966-029
- Fetales-Kälber-Serum; GIBCO #011-06290
- Penicillin-Streptomycin; GIBCO #15140-114
- Phosphate Buffered Saline (PBS); GIBCO #14190-094
- Trypsin-EDTA-Lösung; GIBCO #45300-019

Methode

Es wurden nahezu alle Experimente an einer Huh7-(Hepatoma)-Zellreihe durchgeführt, von der ein Vorrat niedriger Passagen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gehalten wurde. Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad, anschließendes Wachstum bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt, 95% Luftfeuchtigkeit und einem Nährmedium aus DMEM mit 10 % fetalem Kälber-Serum und 1% Penicillin/Streptomycin. Zur Quantifizierung der Zellen wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst, in DMEM emulgiert, ein Aliquot mit Trypanblau gefärbt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Alle 2-3 Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, bei Subkonfluenz der Zellen mit PBS gewaschen, die Zellen mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst und auf mehrere Zellkulturflaschen bzw. andere Petrischalen aufgeteilt. Die radioaktiven Pulse-Chase-Experimente wurden direkt in 6-Loch-Platten durchgeführt. Für die Immunfluoreszenz-Pulse-Chase-Experimente wurden 24-Loch-Platten benutzt. Hier wurden nochmals Cover-Slipes auf den Boden der 24-Loch-Platten aufgebracht, auf denen dann die Zellen gesät wurden. So konnten die Cover-slipes mit subkonfluent gewachsenen Zellen für die Experimente dann aus den 24-Loch-Platten herausgenommen und entsprechend inkubiert werden.

3.2.7 Radioaktive Markierung des Zell-Cholesterol-Pools mit ^3H -Cholesterol-LDL

Material

- LDL, präpariert von normolipidämischen Blutspendern
- ^3H -Chol: [1α , 2α , (n)- ^3H]Cholesterol, Toluene solution. Specific activity: 1,55T Bq/mmmol bzw. 3,7 MBq/100 μl
- 1,5ml Eppendorf-Tubes
- Zentrifuge
- zwei PD10-Säulen
- gestopfte Pipettenspitzen
- Vortexer
- 2,5 %-ige BSA-Lösung : (Fettsäurefreies) Bovines Serum Albumin der Firma Sigma
- EDTA-Chelator
- N_2 zum Abdampfen von Lösungsmittel
- Steriler Filter: Schleicher/Schuell: FB Point 45; 0,45 μm ; 7 bar max.
- 50 ml sterile Spritze
- 50 ml Falcon-Flasche
- reines DMEM ohne Zusätze, steril

Herstellen des ^3H -Cholesterol-LDL

Die LDL-Präparation enthält nach Zentrifugation große Mengen an Kaliumbromid, welches vor dem Experiment durch Gelfiltrationschromatografie mittels PD-10-Säulen entfernt wurde. Nach dreimaligem Waschen von zwei PD10-Säulen mit PBS kann 1ml LDL aus LDL-KBr eluiert werden. Es erfolgt die Zugabe von 100 μl EDTA zum LDL. EDTA, als Chelator für zweiwertige Ionen, verhindert die übermäßige Oxidation der LDL. Von 100 μl ^3H -Chol, das in Toluol gelöst ist, wird das Lösungsmittel mit N_2 abgedampft, so daß nur noch der Lipidfilm vorhanden ist. 100 μl 2,5%ige BSA wird auf den Lipidfilm gegeben. Es wird stark gevortext, kurz anzentrifugiert, um radioaktive Flüssigkeit vom Deckel zu entfernen und der 1ml LDL dazugegeben. Wiederum vortexen, kurz anzentrifugieren und über Nacht bei 37°C und 300 rpm auf dem Schüttler inkubieren.

Dann wird überschüssiges ^3H -Cholesterol über eine zweite PD-10-Säule entfernt. Anschließend ein 10 μl -Aliquot mit gestopfter Pipettenspitze im β -Counter gemessen. Nun kann die benötigte Menge ^3H -Chol für eine Endaktivität von 100'000 cpm/ml berechnet werden. Diese wird im nächsten Schritt mit reinem DMEM eingestellt (s.u.)

Markieren des Zell-Cholesterols

Reines DMEM bei 37° vorwärmen. Berechnete Menge ^3H Cholesterol-LDL für Endaktivität von ca. 100'000 cpm/ml zu reinem DMEM geben. Über Filter und Spritze steril filtrieren.

Inkubation der Zellen mit 2ml ^3H -Cholesterol-LDL-DMEM pro well. (folglich $\approx 200'000$ cpm/well). Inkubation über Nacht im Brutschrank.

3.2.8 ^3H -Markierung von TRL

Materialien und Geräte

- ^{125}I -ApoE-TRL
- ^{125}I -TRL
- ^3H -Chol: [1α , 2α , (n)- ^3H]Cholesterol, Toluene solution. Specific activity: 1,55T Bq/mmmol bzw. 3,7 MBq/100 μl
- 1,5ml Eppendorf-Tubes
- Zentrifuge
- vier gewaschene PD10-Säulen
- gestopfte Pipettenspitzen
- Vortexer
- 2,5 %-ige BSA-Lösung : (Fettsäurefreies) Bovines Serum Albumin der Firma Sigma
- EDTA-Chelator

Durchführung

Um den Metabolismus von ApoE und Cholesterol aus Chylomikronen gleichzeitig verfolgen zu können, wurden Doppelmarkierungen vorgenommen. Das ApoE der Chylomikronen wurde zunächst mit ^{125}I , wie oben beschrieben, markiert. und dann das Cholesterol mit ^3H nach der folgenden Methode:

Pipettieren wie folgt:

	^{125}I -ApoE-TRL	^{125}I -TRL
^3H -Chol in Toluol (mit N_2 abzdampfen!)	100 μl	100 μl

Toluol unterm Abzug abdampfen

2,5%ige BSA	100 μl	100 μl
-------------	-------------------	-------------------

stark vortexen und danach kurz anzentrifugieren

Probe (TRL)	400 μl	400 μl
EDTA	100 μl	100 μl
DMEM	500 μl	500 μl

Die Proben wurden über Nacht bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Am nächsten Tag konnte überschüssiges ^3H -Cholesterol über eine zweite PD-10-Säule entfernt werden. Ein 10 μl -Aliquot wurde γ -gecountet und mit je 10 μl der neuen Liganden eine Dole-Lipid-Extraktion der neuen Liganden und ein β -Count mit je 1ml des Überstandes durchgeführt. Nun konnte die

gewünschte ^{125}I -Aktivität mit DMEM eingestellt werden. Es folgte eine TG-Bestimmung der Liganden. (s.o.)

3.2.9 Bradford-Proteinbestimmung

Geräte und Chemikalien

- Bradford-Bio-Reagenz
- 0,1M NaOH
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Durchführung

Zur Proteinbestimmung wurde mit dem Zellysat aus den γ -Counter-Röhrchen sowie einer Protein-Eichreihe (0, $^{125}\text{mg/ml}$; 0,25mg/ml; 0,5mg/ml; 1mg/ml; 2mg/ml ; BSA-Standards) die Methode nach Bradford angewandt (Bradford 1976):

	Zellysat (24 Werte als Doppelbestimmung en= 48)	Eichreihe (5 Werte, als Doppelbestimmung en= 10)	Leerwerte (2)
NAOH	50 μl	90 μl	100 μl
Probe	50 μl	10 μl	-
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	700 μl	700 μl	700 μl
Bradford- Reagenz	200 μl	200 μl	200 μl

- Anschließend wurde gut gevortext
- 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert (Endzeitbestimmung)
- bei 595nm photometriert

3.2.10 Dole-Lipid-Extraktion zur Analyse auf ^3H -Cholesterol-Gehalt

Geräte und Materialien

- 1000 μl -Pipette
- Multipette
- Multipetten-Aufsatz 10ml, 2x50ml
- Große Reagenzgläser
- Vortexer
- 24 β -Counter-Vials
- β -Counter
- Isopropylalkohol (=2-Propanol)

- Heptan
- 0,5M H₂SO₄
- Szintillator

Durchführung

Aufgrund ähnlicher Spektren von ³H und ¹²⁵I kann die β -Strahlung der ³H-Aktivität nur nach vorheriger Trennung von ¹²⁵I gemessen werden. Daher wird eine Lipidextraktion nach Dole sowohl mit einem Teil des Zelllysats sowie einem Teil des Chase-Mediums durchgeführt, um die Menge des aufgenommenen bzw. ins Chase-Medium wieder abgegebenen ³H-Cholesterols bestimmen zu können.

Der Dole-Extraktions-Mix (nur 2 Monate lang verwendbar) wurde aus 400ml Isopropylalkohol (2-Propanol), 100ml Heptan und 20ml 0,5M H₂SO₄ hergestellt.

Je 450 μ l der Probe wurden mit je 2,5 ml des Extraktions-Mix in Plastik-Reagenzglasern versetzt, anschließend gut gevortext (je 10 sec.) und dann für 10 min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Es wurden weiterhin je 1ml Heptan sowie je 1,5 ml H₂O hinzugegeben, die Deckel verschlossen, nochmals gut gevortext und 10 min. stehengelassen. Von der oberen Phase wurde je 1ml abgenommen und in je 1 β -Counter-Flasche überführen. (Volumen der oberen Phase: 1,5 ml). Je 6ml Szintillator wurde pro Vial hinzugegeben, die Vials gut zugedreht und kräftig geschüttelt. Anschließend konnte β -Counting durchgeführt werden.

3.2.11 TCA-Fällung zur Analyse auf ¹²⁵I-ApoE-Gehalt

Die TCA wird mit einem Teil des Mediums durchgeführt um radioaktiv markiertes Protein (¹²⁵I-ApoE) von markiertem Tyrosin zu trennen. Die Markierung von Protein mit ¹²⁵I erfolgt über kovalente Bindung an Tyrosin-Reste des Proteins. Die TCA-Fällung fällt nur Proteine, da sie an der Peptid-Bindung angreift, so daß mit dieser Methode abgebautes und intaktes Protein voneinander getrennt werden können.

Geräte und Materialien

- Trichloressigsäure (TCA)
- Vortexer
- Zentrifuge
- Triton
- Eis
- γ -Counter und Röhrchen

Durchführung

Die TCA-Fällung wird auf Eis durchgeführt, daher wurden alle Lösungen und die Zentrifuge vorgekühlt. Je 75 μ l Triton wird zu je 450 μ l Medium gegeben. Hinzu kamen je 175 μ l eiskalte TCA. Die Lösung wurde stark gevortext, 5 min. auf Eis stehengelassen und sodann mit

13000/min, 5 min. lang, bei 4° zentrifugiert. Der Überstand konnte nun mit einer Spritze abgenommen werden und wurde in den gesonderten TCA-Abfall überführt. Das Pallet konnte mit dem Eppendorf-Tube-Abschneider in beschriftete γ -Counter-Röhrchen überführt und einem γ -Count unterzogen werden.

3.2.12 Indirekte Immunfluoreszenz-Experimente

Material

- Coverslipes
- 4%iges Paraformaldehyd
- 0,001% BSA in DMEM
- Saporin-Glycin(=Block)-Puffer: 20 mM Glycin; 0,05 % Saponin (Fa. Sigma) in PBS
- Heparin
- 1. Antikörper:
 - o α -ApoE-mono: 4%ig in Saporin-Glycin-Puffer
 - o Filipin: 2%ig in Saporin-Glycin-Puffer
- 2. Antikörper:
 - o α -Maus Cy3 (konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper, Jackson Immuno Research, bezogen über Dianova, Hamburg): 1%ig in Saporin-Glycin-Puffer
 - o α -rabbit Cy2: 0,5%ig in Saporin-Glycin-Puffer
- Mowiol (Fa. Calbiochem)
- Mikroskop Zeiss Axiovert 100 mit Fluoreszenzeinrichtung
- Laser Scanning Mikroskopie Zeiss LSM 510 (Version 3.0) mit Zeiss AxioCam

Methode

Analog zu den radioaktiven Pulse-Chase-Experimente wurden indirekte Immunfluoreszenz-Experimente zur Visualisierung der untersuchten intrazellulären Mechanismen durchgeführt. Dazu wurden humane Fibroblasten auf Cover-Slipes kultiviert, da diese kein endogenes ApoE produzieren. Diese wurden für 60 min mit reinem DMEM bei 37 °C ausgehungert, dann für 60 min mit TRL inkubiert (Pulse) und anschließend auf Eis mit PBS-Heparin und PBS mehrfach gewaschen. Ein Teil der Zellen wurde einem 15 Minuten Chase mit HDL₃ unterzogen. Alle Zellen wurden dann für 60 Minuten mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert und danach zur Reinigung von PFA für 5 x 5 Minuten in PBS belassen. Anschließend wurde bei 37°C für 60 Minuten mit spezifischen Antikörpern gegen ApoE und Cholesterol inkubiert. Um ungebundenen Erstantikörper zu entfernen wurde vor Inkubation mit Zweitantikörper 2x in PBS getaucht und 2x für 5 Minuten im Saporin-Glycin-Puffer belassen. Die Visualisierung konnte durch Inkubation für weitere 45 Minuten mit den Zweitantikörper α -Maus Cy3 und α -rabbit Cy2 erreicht werden. Die Coverslipes wurden schließlich auf Objektträgern mit je 5 μ l

Mowiol eingedeckelt. Die Ergebnisse konnten nun bei konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie betrachtet und fotografiert werden.

Die Präparation der Zellen für die Mikroskopie lässt es technisch nicht zu, den Ausschnitt einer Zellkultur zunächst ohne Chase zu mikroskopieren und darauffolgend denselben Ausschnitt dem HDL₃-Chase auszusetzen, da die Präparation eine Fixation mit Paraformaldehyd umfasst. Daher wurden zunächst alle Zellen dem Pulse mit TRL unterzogen. Anschließend wurde ein Teil der Zellen in Chase-Medium mit HDL₃, der andere Teil der Zellen in Chase-Medium ohne HDL₃ inkubiert. Im dritten Schritt erfolgte dann die Markierung mit Erst- und Zweitantikörpern.

3.2.13 Gelchromatografische Analyse des Recycling-Mediums

Material

- Centricon-Konzentratoren YM-10: 10'000 MW; YM-30: 30'000 MW (Fa. Amicon)
- Superdex-200-FPLC-Säule (Fa. Amersham)
- Superose-6-FPLC-Säule (Fa. Amersham)
- Stockpuffer: NaAzid 1:1000 in Aqua demin.
- Säulenpuffer: 10mM Tris; 100mM NaCl; 10 mM EDTA; pH 8; in Stockpuffer

Methode

Zur Vorbereitung auf die FPLC wurde das Medium zunächst angereichert. Dabei war ein Verlust von markierten Metaboliten durch die Konzentration festzustellen, wie Radioaktivitäts-Messungen vor und nach der Anreicherung zeigen, wahrscheinlich durch Adhäsion von Flüssigkeit an den Filter. Der Überstand wurde, um diesen Flüssigkeitsverlust möglichst klein zu halten, per Zentrifugation in ein anderes Röhrchen überführt. Die FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) ist eine Form der Gelfiltrationschromatografie bei der Medium über eine Säule aus porösen Kügelchen mit einem Durchmesser von ca. 100 µm geschickt wird. Es handelt sich dabei i.d.R. um Kohlenhydrat/ Polyacrylamid-Kügelchen. Je kleiner ein Molekül, desto besser dringt es in die Kügelchen ein. Weil größere Moleküle weniger in die Kügelchen aufgenommen werden und daher schneller die Säule passieren, nimmt die Größe der eluierten Partikel mit zunehmender Fraktionszahl ab, die Dichte hingegen nimmt zu. Größe und Dichte der aufgetrennten Moleküle und Partikel sind nahezu gleichrangige Faktoren. Es wurden 2 Säulen eingesetzt: Die Superose-6-Säule (S6) sowie die Superdex-200-Säule (S-200). Erstere eignet sich besonders zur routinemäßigen Auftrennung von Lipoproteinen, da sie einen sehr weiten Trennbereich aufweist (5-5000 kDa). Es kommt zu einer sehr guten Auflösung großer Partikel (20-50 nm). Weniger geeignet ist sie zur Eluierung von globulären Proteinen wie Albumin (66 kDa) und kleinerer Lipoproteine wie HDL (8-12 nm bzw. 200-500 kDa). Die Lipoproteine werden

definitionsgemäß in den folgenden Fraktionen detektiert: VLDL in Fraktion 17, LDL in Fraktion 24, HDL_E in Fraktion 30/32, HDL_{2/3} in Fraktion 32 (Koch 2000).

Die Superdex-200-Säule dagegen verfügt über einen Trennbereich von 10-600 kDa, daher ist eine bessere Auflösung von Partikeln der Größe von HDL zu beobachten. HDL_E ist in der Regel in Fraktion 23, HDL_{2/3} in Fraktion 25 zu finden. Albumin zeigt sich in Fraktion 29 (66 kDa) und Ovalbumin in Fraktion 31 (45 kDa) (Koch 2000).

3.2.14 Western-Blotting mit den einzelnen Lipoprotein-Fraktionen auf Nitrocellulose

Material

- Zentricon-Filter
- Ponceau-Lösung (0,2% in 3% Trichloressigsäure, Serva)
- Waschpuffer A: 10 mM Tris-HCl; 86 mM NaCl; 0,1% Tween 20 pH7
- Waschpuffer B: 10 mM Tris-HCl; 86 mM NaCl; 0,1 % Tween 20; 0,3 mM SDS; 6 mM Natriumdesoxycholat pH 7,4
- Blockingpuffer: 10% Lichpulver in Waschpuffer A
- Blottingkammern (Fa. Biorad) und Kühlaggregat (Fa. Colora)
- 1. Antikörper; 5% BSA in WPA.

Methode

Zur Durchführung der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird zunächst, wie bereits oben beschrieben, ein 10%iges Gel nach der modifizierten Neville-Methode gegossen.

Für die Elektrophorese wurden die Säulenproben der FPLC über Zentricon-Filter eingengt. Die Proben werden wiederum, wie oben beschrieben, mit SDS, Mercaptoethanol, Glycerin und Bromphenolblau versetzt und in der bekannten Weise vorbereitet und auf das Gel aufgetragen. Nachdem die Proteine bei 40 mA aufgetrennt wurden, konnten sie durch Elektroblotting bei 250 mA und einer Blottingzeit von mindestens 8h auf Nitrocellulose übertragen werden. Um die erfolgreiche Übertragung der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulose zu verifizieren, wird eine unspezifische Färbung nach Ponceau vorgenommen. Nach Dokumentation wurde die Nitrocellulose mit Waschpuffer A wieder vollständig entfärbt. Dann wurde mit Milchpulver-Lösung für 1 Stunde geblockt, anschließend mit Puffer A kurz gewaschen. Über Nacht konnte nun mit dem 1. Antikörper bei 4°C inkubiert werden. Am nächsten Tag wurde 1 Miute mit Waschpuffer A gewaschen, dann 2x für je 10 Minuten mit Waschpuffer B und noch einmal für eine Minute mit Waschpuffer A. Für 1,5 Stunden wurde mit dem 2. Antikörper inkubiert.

3.2.15 ApoE-Immunoaffinitäts-Säulenchromatografie

Zunächst wurden die Proben über einen 1,2 µm-Filter gefiltert. Mit 500 µl Probe wurde dann die ³H-Chol-Radioaktivität bestimmt und mit weiteren 500µl ein ApoE-Immunoblot durchgeführt.

Es folgte die Antigeninkubation. Dazu wurde die in N3 gelagerte Säule zunächst 3x mit 10 ml PBS gewaschen bevor die Probe aufgetragen wurde. Nach kurzer Sedimentation der Probe wurde die Säule dann verschlossen und über Nacht im Kühlraum bei 4°C auf dem Roller zur Inkubation belassen.

Zum Waschen der Säule wurde sehr genau eingestelltes PBS-pH 6,8 verwendet. Zur Elution der Säule wurde ein Elutionspuffer aus 100mM Glycin, pH 2,5 verwandt. Zur Neutralisation ein 1M Tris-Neutralisationspuffer.

Die Eluierung der Säule erfolgt frühestens am nächsten Tag. Die Säule wird geöffnet und der Durchlauf auslaufen gelassen. Er beinhaltet jenen Teil der Probe der nicht gebunden hat, sowie, wenn die Antikörper gesättigt sind, auch noch den Überschub an Antigen. Anschließend wird die Säule 4x mit 10 ml PBS, danach 1x mit 10 ml PBS pH 6,8 gewaschen. Nun wird getestet wieviel Tris benötigt wird, um 500 µl Elutionspuffer, so groß werden die Elutionsproben sein, auf pH 7,5 zu neutralisieren. Es werden entsprechend je zwischen 40 und 100µl 1M Tris pH8 in 10 Epis→ für 10 Säulenfraktionen vorgelegt. Anschließend wird mit je 500 µl Elutionspuffer eluiert.

Die Säule wird wiederum mit PBS gewaschen und anschließend in verdünntem Azid gelagert.

Zur Detektion des Protein-Peaks (i.d.R. in F2-5) erfolgt Photometrie der Fraktionen bei 280 nm.

4 Ergebnisse

Um die Verknüpfung des TRL-Metabolismus mit anderen zellulären Stoffwechselfvorgängen studieren zu können, wurden zunächst Pulse-Chase-Experimente mit radioaktiv markierten Liganden an humanen Hepatomazellen und humanen Fibroblasten durchgeführt. Diese Liganden sollen im ersten Abschnitt des Ergebnisteils hinsichtlich ihres Apolipoproteinmusters und der Qualität ihrer Markierung charakterisiert werden.

Anschließend wird im zweiten Teil der beobachtete Zusammenhang zwischen TRL-Stoffwechsel und dem ApoE-Recycling dargestellt. Dazu erfolgte nach Pulse-Chase eine genaue Analyse der Zellen und des Chase-Mediums auf resezerbierte Liganden. Zur Visualisierung des ApoE-Recycling wurden Immunfluoreszenzmarkierungen von Apolipoproteinen bzw. Lipiden der TRL sowie HDL₃ mit anschließendem Einsatz der Fluoreszenz-Mikroskopie vorgenommen.

Im dritten Abschnitt des Ergebnisteils werden die resezerbierten Lipoproteine anhand der Fast-Performance-Liquid-Chromatographie, der Immunoaffinitätschromatografie und der SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Slot-Blot charakterisiert.

4.1 Charakterisierung der Liganden

	Ligandencharakterisierung		
	Cholesterol (-ester)	Triazyglyzeride	Proteine
Konzentration [mg/ml]	4,16	48,61	0,77
Zusammensetzung [%]	7,77 (4-8)	90,79 (80-90)	1,44 (1-2)

Tabelle 2: Zusammensetzung der als Liganden benutzten TRL

Nach Gewinnung von TRL aus dem Plasma ApoCII-defizienter Patienten wurden diese enzymatisch auf Cholesterol (-ester), Triazyglyzeride und Proteine (Lowry) analysiert. Oben sind die Mittelwerte der Ergebnisse zweier voneinander unabhängiger Präparationen dargestellt. Aus Kane (1996) sind in Klammern Vergleichswerte angegeben. Die Methode zur TRL-Gewinnung und Analyse ist im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

Nach Präparation der TRL aus dem Serum ApoCII-defizienter Patienten wurde standardisiert Cholesterol-, Triazyglyzerid-, sowie Proteingehalt bestimmt. In Tabelle 2 sind die Mittelwerte zweier voneinander unabhängiger Präparationen, in Klammern sind Vergleichswerte angegeben. Es konnte demnach eine gute Übereinstimmung erreicht werden, so daß die eingesetzten Liganden als den CM entsprechend betrachtet werden können. Geringe Unterschiede ergeben sich noch aus der Tatsache, daß eine Auftrennung von VLDL und TRL aus dem Patientenserum mittels Dichtegradientenzentrifugation nicht möglich ist (s. auch Abbildung 1.) Aus diesem Grund wurden die Partikel als Triazyglyzerid-reiche Lipoproteine (TRL) definiert.

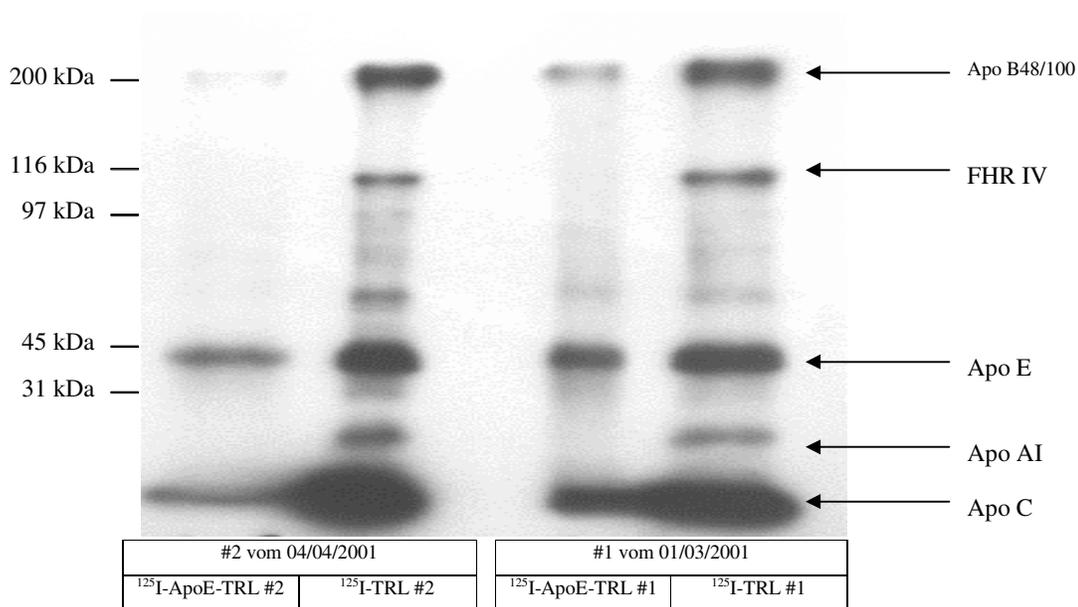


Abbildung 1: Charakterisierung von ¹²⁵I- und ¹²⁵I-ApoE-markierten TRL mittels Autoradiografie.

Die als Liganden für die Pulse-Chase-Eperimente verwandten radioaktiv markierten TRL wurden auf einer 10%-igen SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Anschließend wurde mit dem Gel ein Kodak-Biomax-Röntgenfilm bei -80°C für 48 Stunden belichtet. Auf der rechten Seite sind die verschiedenen Apolipoproteine beschriftet, links die Molekulargewichte des Proteinmarkers. Die Liganden der Präparation vom 01/03 und 04/04 wurden auf einem Gel aufgetragen, jeweils links die ¹²⁵I-ApoE- sowie rechts die ¹²⁵I-Markierung.

Abbildung 1 zeigt eine Autoradiografie der radioaktiv markierten Liganden zweier TRL-Präparationen nach ihrer Auftrennung über eine 10%ige SDS-PAGE. Auf der rechten Filmseite sind die zwei frühen (#1), links die späteren (#2) Präparationen zu sehen. In der TRL-Gesamtprotein-Markierung ist die ApoE-Bande, bei ca. 34 kDa, neben der ApoC-, sowie der ApoB48-Bande deutlich prominent. Um ¹²⁵I-ApoE-TRL herzustellen, wurde zunächst isoliertes ApoE radioaktiv markiert und mit nicht markierten TRL assoziiert. Bei diesem Präparat sind neben ApoE vor allem Abbauprodukte in der Lauffront des Geles zu detektieren, die bei der Iodierung entstanden sein können.

4.2 Zusammenhang zwischen Cholesterolfstoffwechsel und ApoE-Recycling

Um potentielle Zusammenhänge zwischen Cholesterolfstoffwechsel und dem ApoE-Recycling zu untersuchen, wurden Pulse-Chase-Experimente mit ^3H -Cholesterol- ^{125}I -ApoE- sowie ^3H -Cholesterol- ^{125}I -doppelmarkierten TRL vorgenommen (Unterschied siehe Kapitel Methoden, Radioaktive Markierung der Apolipoproteine). Dazu wurden Huh7-Zellen zunächst für 60 min. bei 37°C mit reinem DMEM ausgehungert. Dann erfolgte an den Huh7-Zellen 60 min. Pulse mit den doppelmarkierten TRL bei 37°C . Die Radioaktivität wurde abgenommen und die Zellen auf Eis mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin mehrfach gewaschen um oberflächlich gebundene Liganden zu entfernen. Daraufhin erfolgte 60 min. Chase bei 37°C bei einem Teil der Zellen mit $50\mu\text{g/ml}$ HDL₃ in 0,1% BSA in DMEM, beim anderen Teil der Zellen Chase mit 0,1% BSA in DMEM ohne weitere Zusätze. Anschließend wurde eine separate Analyse des Chase-Mediums sowie der Zellen auf ^3H -Cholesterol und ^{125}I -ApoE durchgeführt.

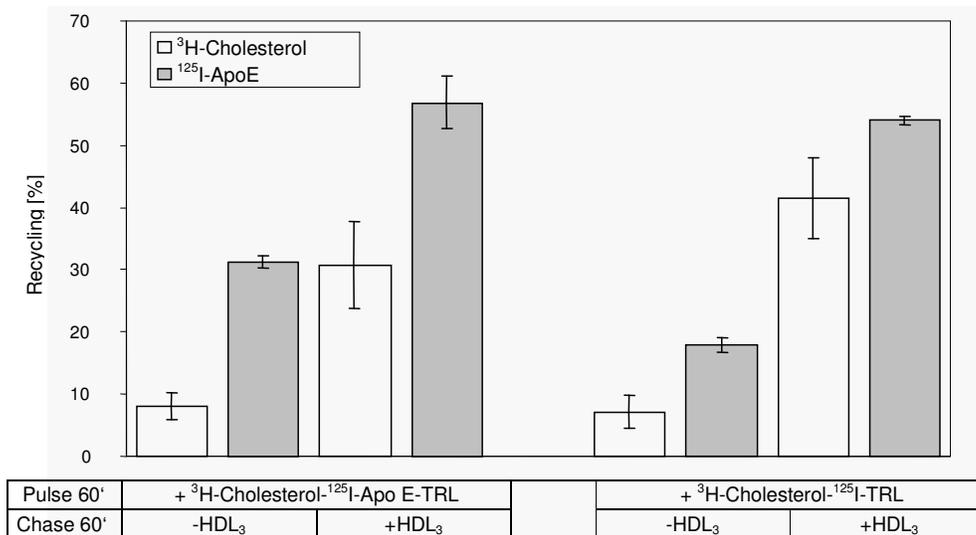


Abbildung 2 a: Recycling von ^{125}I -ApoE und ^3H -Cholesterol aus internalisierten TRL.

Zunächst wurde eine ^3H -Cholesterol- ^{125}I -ApoE- sowie eine ^3H -Cholesterol- ^{125}I -Doppelmarkierung (Unterschied siehe Kapitel Methoden, Radioaktive Markierung der Apolipoproteine) an TRL vorgenommen. Huh7-Zellen wurden für 60 min. bei 37°C mit reinem DMEM ausgehungert. Dann erfolgte an den Huh7-Zellen 60min. Pulse mit den doppelmarkierten TRL bei 37°C . Die Radioaktivität wurde abgenommen und die Zellen auf Eis mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin mehrfach gewaschen. Daraufhin erfolgte 60min. Chase bei $37^\circ\text{C} \pm 50\mu\text{g/ml}$ HDL₃ in 0,1% BSA in DMEM. Anschließend wurde eine separate Analyse des Chase-Mediums sowie der Zellen auf ^3H -Cholesterol und ^{125}I -ApoE durchgeführt. Die Angabe des Recycling ^3H -Cholesterol/ ^{125}I -ApoE in Prozent bezieht sich auf die nach dem Pulse von der Zelle aufgenommene Radioaktivität. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen. Auf der linken Seite finden sich die Ergebnisse der ^3H -Cholesterol- ^{125}I -ApoE-, rechts jene der ^3H -Cholesterol- ^{125}I -TRL-Markierung, wie in der Datentabelle angegeben.

Abbildung 2a zeigt die Menge des resezernierten ^3H -Cholesterol und ^{125}I -ApoE nach Pulse-Chase-Versuchen mit und ohne HDL₃-Gabe ins Chase-Medium. Die Versuchsergebnisse bei Inkubation mit ^{125}I -ApoE-markierten TRL sind auf der linken Seite dargestellt. Hier kann eine Steigerung des ^3H -Cholesterol-Efflux durch Zugabe von HDL₃ von ca. 8 % auf ca. 30% der Radioaktivität nach Pulse beobachtet werden. Das Recycling von ^{125}I -ApoE erfährt eine Steigerung um ca. 50 %. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch bei Pulse mit der TRL-

Gesamtprotein-Markierung, dargestellt auf der rechten Seite: eine Steigerung des ^3H -Cholesterol-Recyclings um ca. das Vierfache, sowie des ^{125}I -ApoE-Recyclings um ca. das Dreifache.

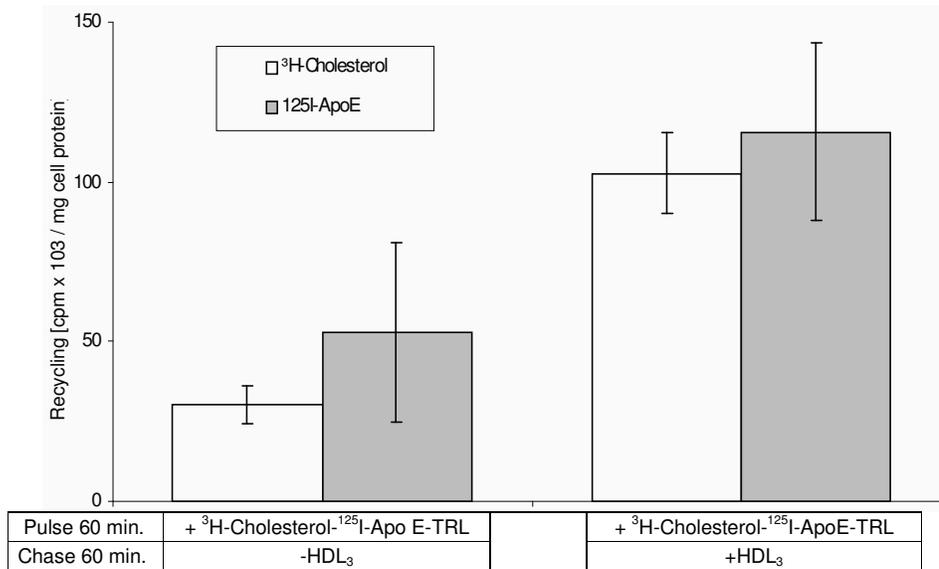


Abbildung 2 b: Recycling von ^{125}I -ApoE und ^3H -Cholesterol aus internalisierten TRL.

Die Grafik zeigt im Unterschied zu Abbildung 2a nur die Ergebnisse der ^3H -Cholesterol- ^{125}I -ApoE-Markierung, außerdem in cpm x 100/ mg Zellprotein statt in Prozent angegeben. Es sind jedoch die Mittelwerte derselben drei Experimente mit Standardabweichungen dargestellt. Dabei wurden Huh7-Zellen für 60 min. bei 37°C mit reinem DMEM ausgehungert. Dann erfolgte an den Zellen 60 min. Pulse mit den doppelmarkierten TRL bei 37°C . Die Radioaktivität wurde abgenommen und die Zellen auf Eis mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin mehrfach gewaschen um oberflächlich gebundene Liganden zu entfernen. Daraufhin erfolgte 60 min. Chase bei $37^\circ\text{C} \pm 50\mu\text{g/ml HDL}_3$ in 0,1% BSA in DMEM. Anschließend wurde eine separate Analyse des Chase-Mediums sowie der Zellen auf ^3H -Cholesterol und ^{125}I -ApoE durchgeführt.

Abbildung 2 b zeigt nur das Recycling von ^3H -Cholesterol und ^{125}I -ApoE der Versuchsreihe mit Aufnahme doppelmarkierter TRL, außerdem - im Gegensatz zu Abbildung 2a - aufgetragen in cpm/mg Zell-Protein. Es sind die Mittelwerte dreier repräsentativer Ergebnisse mit Standardabweichungen zu sehen. Man erkennt eine Steigerung des ^3H -Cholesterol-Recycling um den Faktor 4, eine Steigerung des ^{125}I -ApoE-Recyclings um ca. den Faktor 2.

Es kann demnach festgestellt werden, daß die Anwesenheit von HDL im Chase-Medium das Recycling von ^{125}I -ApoE aus internalisierten TRL induziert bzw. fördert. Gemeinsam mit ^{125}I -ApoE kommt es zum Recycling von ^3H -Cholesterol, welches ebenfalls aus den aufgenommenen TRL stammt. Beide untersuchten Bestandteile, ^3H -Cholesterol und ^{125}I -ApoE scheinen, zumindest teilweise, der intrazellulären Degradation zu entgehen, wie es für ApoE allein schon beschrieben wurde (Heeren et al. 1999, Rensen et al. 2000). Man könnte diese Beobachtung als Sekretion von TRL-Oberflächen-Remnants bezeichnen (Heeren et al. 1999).

Die absoluten Werte der ermittelten Radioaktivität in den Einzelversuchen differieren teilweise stark voneinander. Diese Unterschiede sind dadurch zu erklären, daß die Aufnahme von Lipoproteinen durch die Zelle sich je nach Grad der Lipoprotein-Rezeptor-

Expression unterscheidet. Da die Zellen sich in unterschiedlichen Abschnitten des Zellzyclus befinden, differiert jedoch ihre Rezeptordichte und damit sowohl die Menge des aufgenommenen, als auch des zum Recycling bereitstehenden ApoE bzw. Cholesterol. Zur Verdeutlichung sind aus der Pulse-Chase-Versuchsreihe an ^3H -Cholesterol-markierten Zellen mit ^{125}I -ApoE-TRL bzw. ^{125}I -TRL in Tabelle 3 alle Ergebnisse der Einzelversuche dargestellt.

	Versuch 10	Versuch 11	Versuch 12	Versuch 10	Versuch 11	Versuch 12
	Recycling ^3H (%)			Recycling ^{125}I (%)		
^{125}I -ApoE-TRL ohne HDL ₃	0,06	0,10	0,08	0,30	0,32	0,32
^{125}I -ApoE-TRL mit HDL ₃	0,24	0,30	0,38	0,56	0,53	0,62
^{125}I -TRL ohne HDL ₃	0,06	0,10	0,05	0,17	0,17	0,19
^{125}I -TRL mit HDL ₃	0,35	0,41	0,48	0,54	0,53	0,55

Tabelle 3: Daten der für Abbildung 2a und Abbildung 2b zugrunde liegenden Versuche.

Zur Beobachtung des Zusammenhangs zwischen Recycling des TRL-ApoE und dem zellulärem Cholesterol wurde eine Markierung des intrazellulären Cholesterol-Pools vorgenommen.

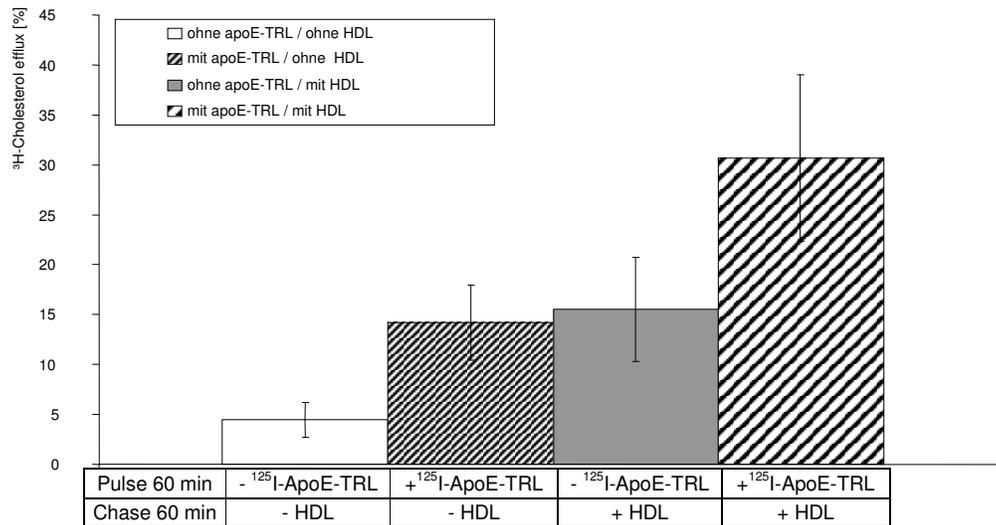


Abbildung 3 a: ^3H -Cholesterol-Efflux in Abhängigkeit vom ApoE-Recycling

Zur Markierung des zellulären Cholesterol-Pools wurden Huh-7-Zellen über Nacht mit ^3H -Cholesterol-LDL bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Radioaktivität abgenommen und die Zellen mit PBS-Heparin gewaschen. Die Zellen wurden dann für 60 min mit reinem DMEM bei 37° C ausgehungert. Für weitere 60 min wurde der Pulse mit ^{125}I -ApoE-markierten TRL bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde wiederum die Radioaktivität abgenommen und mehrfach auf Eis bei 4°C mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin vorsichtig gewaschen um an der Oberfläche gebundene Liganden zu entfernen. Es folgte der Chase für 60 min +/- HDL₃ bei 37°C. Anschließend wurde das Chase-Medium von den Zellen abgenommen und ebenso wie das Zellysat auf ^3H -Cholesterol- und ^{125}I -ApoE-Gehalt analysiert. Die Angabe des ^3H -Cholesterol-Efflux in Prozent bezieht sich auf die nach dem Pulse von der Zelle aufgenommene Radioaktivität. Gezeigt sind die Mittelwerte des Cholesterol-Efflux fünf unabhängiger Experimente (Versuche 1-5) mit Standardabweichungen.

In den Abbildung 3a zugrunde liegenden Experimenten wurde zunächst eine Markierung des zellulären Cholesterol-Pools mit ^3H -markierter LDL über Nacht vorgenommen. Anschließend wurde für 60 min Pulse mit ^{125}I -ApoE-TRL durchgeführt. Der Chase erfolgte für 60 min: im

einen Fall mit, im anderen Fall ohne Zusatz von HDL₃. Dabei konnte ein vom ApoE-Recycling abhängiger, zellulärer Cholesterol-Efflux beobachtet werden. Er ist in Abbildung 3a in Relation zum vorher markierten Gesamt-Zell-Cholesterol dargestellt. Bereits das Recycling von TRL-ApoE ohne Anwesenheit von HDL₃ stimuliert diesen Cholesterol-Efflux. Die Radioaktivität im Versuch ohne HDL₃ und ohne ¹²⁵I-ApoE-TRL (Balken ganz links) zeigt einen basalen Efflux von ca. 5 %, bei Anwesenheit von ¹²⁵I-ApoE-TRL ist ein Efflux von nahezu 15% zu verzeichnen.

Auch die Durchführung des Chase mit HDL₃ ohne vorherigen Pulse mit ¹²⁵I-ApoE-TRL zeitigt, wie zu erwarten, eine Abgabe von Zell-Cholesterol (dritter Balken von links): Die Funktion von HDL als Cholesterolakzeptor ist bekannt.

Wie bereits beschrieben (s. auch Abbildung 2a/b) induziert HDL₃ das ApoE-Recycling. Außerdem geht dieser Prozess offensichtlich auch mit einem deutlich gesteigerten Cholesterol-Efflux einher: Die höchsten Werte – ca. 30% des markierten Zell-Cholesterols werden sezerniert - zeigen sich bei Durchführung der Versuche unter Pulse mit ¹²⁵I-ApoE-TRL und Chase mit HDL₃ (Balken ganz rechts). Abbildung 3a beruht auf den Mittelwerten fünf voneinander unabhängiger Experimente mit Standardabweichungen.

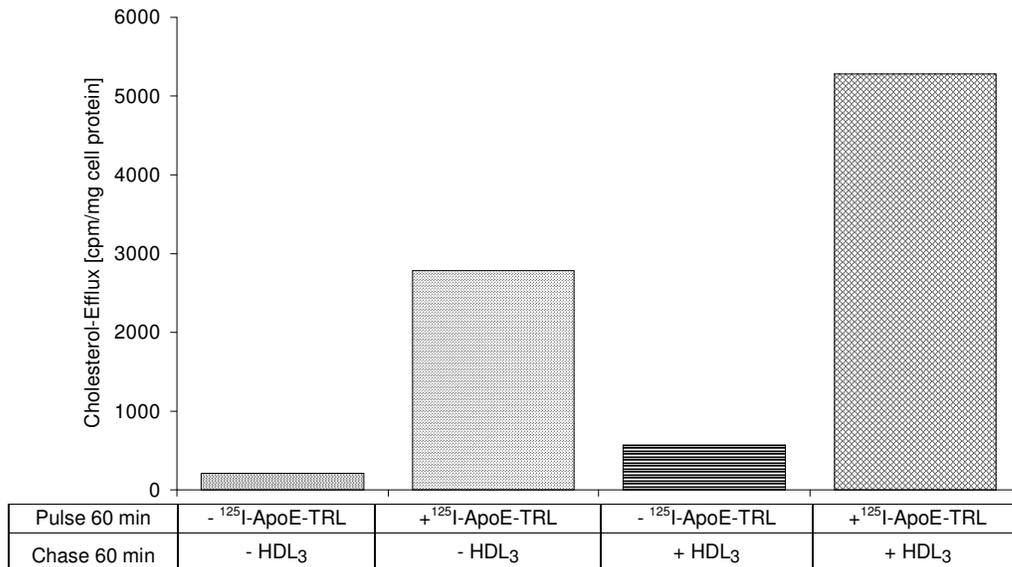


Abbildung 3 b: ³H-Cholesterol-Efflux in Abhängigkeit vom ApoE-Recycling

Dargestellt sind die gleichen Ergebnisse wie aus Abbildung 3 a ersichtlich, jedoch hier ein repräsentatives Experiment (Versuch4) in cpm/mg Zellprotein. Zur Markierung des zellulären Cholesterol-Pools wurden Huh-7-Zellen über Nacht mit ³H-Cholesterol-LDL bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Radioaktivität abgenommen und die Zellen mit PBS-Heparin gewaschen. Die Zellen wurden dann für 60 min mit reinem DMEM bei 37° C ausgehungert. Für weitere 60 min wurde der Pulse mit ¹²⁵I-ApoE-markierten TRL bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde wiederum die Radioaktivität abgenommen und mehrfach auf Eis bei 4°C mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin vorsichtig gewaschen um an der Oberfläche gebundene Liganden zu entfernen. Es folgte der Chase für 60 min +/- HDL₃ bei 37°C. Anschließend wurde das Chase-Medium von den Zellen abgenommen und ebenso wie das Zellysat auf ³H-Cholesterol- und ¹²⁵I-ApoE-Gehalt analysiert.

Abbildung 3b dagegen zeigt wiederum ein repräsentatives Experiment aus dieser Reihe unter Angabe des Cholesterol-Effluxes in cpm/mg Zellprotein. Man sieht erneut die deutliche

Steigerung des ^3H -Cholesterol-Efflux durch ^{125}I -ApoE-Recycling, sowie die Verstärkung dieses Vorgangs bei Anwesenheit von HDL₃ über eine Induktion des ^{125}I -ApoE-Recyclings. Abbildung 3a und 3b legen folglich den Schluß nahe, daß TRL-ApoE, also exogenes, nicht von der Zelle produziertes ApoE, nach Internalisation des TRL nicht nur reseziert wird, sondern offenbar auch die Freisetzung von Cholesterol aus dem intrazellulären Pool stimuliert.

Die absoluten Werte der ermittelten Radioaktivität differieren teilweise im Vergleich der Einzelversuche untereinander. Diese Unterschiede sind darauf zurückzuführen, daß die Expression der für die Aufnahme wichtigen Lp-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Dichte der Zellen und der Phase des Zellzyklus erfolgt. Entsprechend ist der zelluläre Bedarf an Cholesterol ebenso unterschiedlich, wie die Menge die für den Efflux freigegeben wird. Sehr gute Aussagekraft besitzen dagegen die Relationen innerhalb eines Versuches zur Beantwortung der Frage, wie sich Cholesterol-, ApoE-Recycling, TRL- und HDL₃-Metabolismus gegenseitig bei An- bzw. Abwesenheit der verschiedenen Parameter verändern. Zur Verdeutlichung dieser Tatsache sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 absolute und relative Ergebnisse von fünf Experimenten aus der Reihe mit doppelmarkierten TRL aufgeführt.

	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Versuch 5	
	Recycling ^3H -Cholesterol		Recycling ^3H -Cholesterol		Recycling ^3H -Cholesterol		Recycling ^3H -Cholesterol		Recycling ^3H -Cholesterol	
	[cpm/mg Zellprotein]	[%]								
Ohne ^{125}I -TRL / ohne HDL ₃	300,0	(0,05)	50,0	(0,11)	276,3	(0,03)	250,9	(0,05)	458,5	(0,04)
Mit ^{125}I -TRL / ohne HDL ₃	630,1	(0,07)	83,0	(0,16)	281,5	(0,03)	363,0	(0,06)	1683,6	(0,11)
Ohne ^{125}I -TRL / mit HDL ₃	1270,3	(0,15)	133,7	(0,22)	1127,9	(0,10)	561,2	(0,10)	1509,9	(0,19)
mit ^{125}I -TRL / mit HDL ₃	2165,7	(0,19)	179,7	(0,28)	1315,3	(0,12)	760,3	(0,15)	3713,6	(0,25)
ohne ^{125}I -ApoE-TRL / ohne HDL ₃	288,7	(0,04)	47,0	(0,07)	253,2	(0,03)	218,6	(0,02)	590,1	(0,06)
mit ^{125}I -ApoE-TRL / ohne HDL ₃	1338,8	(0,13)	143,3	(0,18)	1586,7	(0,07)	2791,0	(0,16)	2498,3	(0,15)
ohne ^{125}I -ApoE-TRL / mit HDL ₃	1579,3	(0,16)	128,3	(0,23)	861,5	(0,10)	568,2	(0,10)	2185,8	(0,19)
mit ^{125}I -ApoE-TRL / mit HDL ₃	4999,4	(0,34)	265,3	(0,44)	2965,3	(0,18)	5279,9	(0,29)	4928,1	(0,29)

Tabelle 4: ^3H -Cholesterol-Recycling nach Pulse-Chase mit doppelmarkierten TRL (Versuche 1-5)

Die absoluten Werte des ^3H -Cholesterol-Recycling sind jeweils in der linken Spalte angegeben, in der rechten Spalte (in Klammern) die Werte in Bezug auf die Ausgangsradioaktivität vor dem Chase. Zur Markierung des zellulären Cholesterol-Pools wurden Huh-7-Zellen über Nacht mit ^3H -Cholesterol-LDL bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Radioaktivität abgenommen und die Zellen mit PBS-Heparin gewaschen. Die Zellen wurden dann für 60 min mit reinem DMEM bei 37° C ausgehungert. Für weitere 60 min wurde der Pulse mit ^{125}I -ApoE-markierten TRL bei 37° C durchgeführt. Anschließend wurde wiederum die Radioaktivität abgenommen und mehrfach auf Eis bei 4° C mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin vorsichtig gewaschen um an der Oberfläche gebundene Liganden zu entfernen. Es folgte der Chase für 60 min +/- HDL₃ bei 37° C. Anschließend wurde das Chase-Medium von den Zellen abgenommen und ebenso wie das Zellysat auf ^3H -Cholesterol- und ^{125}I -ApoE-Gehalt analysiert.

Tabelle 4 zeigt die absoluten Werte des ^3H -Cholesterol-Recyclings, Tabelle 5 alle absoluten Werte des ^{125}I -ApoE-Recyclings. Zum Vergleich sind die relativen Ergebnisse –Menge des

Recyclings in Relation zur gesamten Radioaktivität der Zelle vor dem Recycling- in Klammern aufgeführt.

	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Versuch 5	
	Recycling ¹²⁵ I-ApoE		Recycling ¹²⁵ I-ApoE		Recycling ¹²⁵ I-ApoE		Recycling ¹²⁵ I-ApoE		Recycling ¹²⁵ I-ApoE	
	[cpm/mg Zellprotein]	[%]								
ohne ¹²⁵ I-TRL / ohne HDL ₃	252,0	(0)	44,7	(0)	168,9	(0)	227,6	(0)	363,2	(0)
mit ¹²⁵ I-TRL / ohne HDL ₃	3406,7	(0,23)	223,0	(0,22)	771,9	(0,12)	876,2	(0,13)	3764,5	(0,20)
ohne ¹²⁵ I-TRL / mit HDL ₃	263,9	(0)	45,0	(0)	212,0	(0)	289,6	(0)	307,5	(0)
mit ¹²⁵ I-TRL / mit HDL ₃	9222,2	(0,48)	454,3	(0,40)	1761,5	(0,20)	1738,5	(0,32)	8239,2	(0,46)
ohne ¹²⁵ I-ApoE-TRL / ohne HDL ₃	176,0	(0)	32,3	(0)	167,8	(0)	352,5	(0)	291,8	(0)
mit ¹²⁵ I-ApoE-TRL / ohne HDL ₃	14598,7	(0,29)	1136,7	(0,34)	35292,5	(0,27)	38469,9	(0,32)	12240,8	(0,32)
ohne ¹²⁵ I-ApoE-TRL / mit HDL ₃	234,0	(0)	36,3	(0)	221,7	(0)	275,7	(0)	297,5	(0)
mit ¹²⁵ I-ApoE-TRL / mit HDL ₃	36637,3	(0,54)	1743,0	(0,53)	32084,1	(0,53)	63425,2	(0,46)	20355,8	(0,50)

Tabelle 5: ¹²⁵I-ApoE-Recycling nach Pulse-Chase mit doppelmarkierten TRL (Versuche 1-5)

Die absoluten Werte des ¹²⁵I-ApoE-Recycling sind jeweils in der linken Spalte angegeben, in der rechten Spalte (in Klammern) die Werte in Bezug auf die Ausgangsradioaktivität vor dem Chase. Zur Markierung des zellulären Cholesteroll-Pools wurden Huh-7-Zellen über Nacht mit ³H-Cholesteroll-LDL bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Radioaktivität abgenommen und die Zellen mit PBS-Heparin gewaschen. Die Zellen wurden dann für 60 min mit reinem DMEM bei 37° C ausgehungert. Für weitere 60 min wurde der Pulse mit ¹²⁵I-ApoE-markierten TRL bei 37° C durchgeführt. Anschließend wurde wiederum die Radioaktivität abgenommen und mehrfach auf Eis bei 4°C mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin vorsichtig gewaschen um an der Oberfläche gebundene Liganden zu entfernen. Es folgte der Chase für 60 min +/- HDL₃ bei 37° C. Anschließend wurde das Chase-Medium von den Zellen abgenommen und ebenso wie das Zellsat auf ³H-Cholesteroll- und ¹²⁵I-ApoE-Gehalt analysiert.

Die Abbildung 4 A-D zeigt repräsentative Zellen nach durchgeführten Pulse-Chase-Experimenten bei denen nicht mit Radioaktivität, sondern fluoreszierenden Antikörpern Markierungen vorgenommen wurden. Dieses Verfahren erlaubt es, die beobachteten Zellbestandteile im Mikroskop zu lokalisieren. Die Visualisierung erfolgte über Immunfluoreszenzmarkierung mit spezifischen Antikörpern gegen ApoE (Bild A und C: α -apoE-mono 1:25) und Cholesteroll-Anfärbung mit Filipin (Bild B und D, Filipin 1: 50) sowie den Zweitantikörpern α -Maus Cy3 (A,C) und α -rabbit Cy2 (B,D).

Die Präparation der Zellen für die Mikroskopie lässt es technisch nicht zu, den Ausschnitt einer Zellkultur zunächst ohne Chase zu mikroskopieren und darauffolgend denselben Ausschnitt dem HDL₃-Chase auszusetzen, da die Präparation eine Fixation mit Paraformaldehyd umfasst (siehe 3.2.12). Daher wurden die Zellen dem Pulse mit TRL unterzogen und anschließend ein Teil der Zellen in Chase-Medium mit HDL₃, der andere Teil der Zellen in Chase-Medium ohne HDL₃ inkubiert. Im dritten Schritt erfolgte dann die Markierung mit Erst- und Zweitantikörpern.

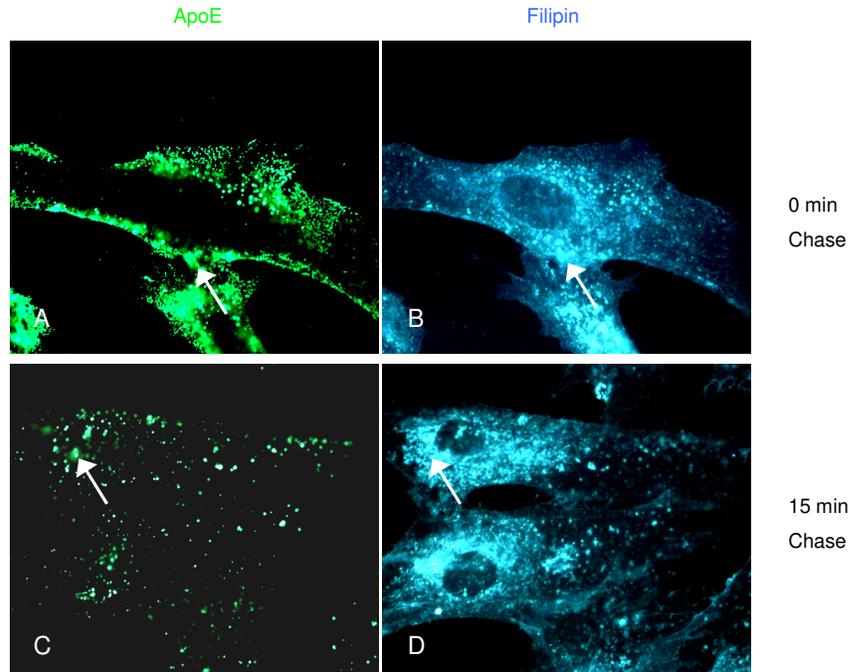


Abbildung 4: Immunfluoreszenzdarstellung von ApoE-Recycling und Cholesterol-Efflux

Zur Ergänzung der radioaktiven Pulse-Chase-Experimente wurden Immunfluoreszenz-Markierungen durchgeführt. Dazu wurden humane Fibroblasten für 60 min mit reinem DMEM bei 37 °C ausgehungert, dann für 60 min mit TRL inkubiert (Pulse) und anschließend auf Eis mit PBS-Heparin und PBS mehrfach gewaschen um an der Oberfläche gebundene Liganden zu entfernen. Ein Teil der Zellen wurde für 15 min einem Chase mit HDL₃ unterzogen. Alle Zellen wurden dann mit Paraformaldehyd fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen ApoE (A,C: α -apoE-mono 1:25) und Cholesterol (B,D: Filipin 1:50) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte über die Zweitantikörper α -Maus Cy3 (A,C) und α -rabbit Cy2 (B,D). Die genaue Methodik ist im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

Für obige Abbildung wurden humane Fibroblasten für 60 min mit reinem DMEM bei 37 °C ausgehungert, dann im Pulse für 60 min. mit unmarkierten TRL inkubiert und anschließend auf Eis mit PBS-Heparin und PBS mehrfach gewaschen, um an der Oberfläche gebundene Liganden zu entfernen. Ein Teil der Zellen wurde für 15 min. einem Chase mit HDL₃ unterzogen. Alle Zellen wurden dann mit Paraformaldehyd fixiert und mit spezifischen Antikörpern inkubiert.

Bild A zeigt die Markierung des ApoE-TRL in Zellen, die zwar einem Pulse mit ApoE unterzogen wurden, jedoch keinen Kontakt mit HDL₃ im Chase gehabt haben. Bild C zeigt Zellen desselben Versuchs, die jedoch nach dem Pulse mit ApoE-TRL einem Chase mit HDL₃ ausgesetzt wurden. Es ist ersichtlich, daß bereits nach 15 min. die Anwesenheit von HDL₃ zur Abnahme des intrazellulären ApoE führt. Diese Immunfluoreszenz-Experimente bestätigen demnach die schon in radioaktiven Pulse-Chase-Experimenten beobachtete Induktion des ApoE-Recycling durch HDL (s. Abbildung 2a,b und Abbildung 3a,b). Den Bildern B und D liegen Markierungen des Zell-Cholesterols mit Filipin zugrunde. Es ist zu sehen, daß endosomales Cholesterol eindeutig mit endosomalem ApoE kolokalisiert (Pfeile A+B; C+D). Zudem zeigen die Bilder B und D eine Abnahme des endosomalen Cholesterols nach Chase mit HDL₃.

ApoE-Recycling und Cholesterol-Efflux sind also nicht nur als Phänomene assoziiert, wie es die Abbildung 2a,b und Abbildung 3a,b zeigen, sondern das Apoprotein und Cholesterol liegen offensichtlich sogar als Komplex in späten Endosomen vor und werden auch gemeinsam an die Zelloberfläche sezerniert. Daher soll später die Beschaffenheit dieses sezernierten Komplexes noch näher untersucht werden (s. Kapitel 4.3 und 4.4).

4.3 Analyse der resezierten Lipoproteine

Nachdem das ApoE-Recycling an sich, und seine Assoziation mit der zellulären Aufnahme von TRL sowie dem Efflux bzw. Recycling von Cholesterolem gezeigt werden konnten, sollen nun im dritten Abschnitt des Ergebnisteils die resezierten Partikel näher charakterisiert werden.

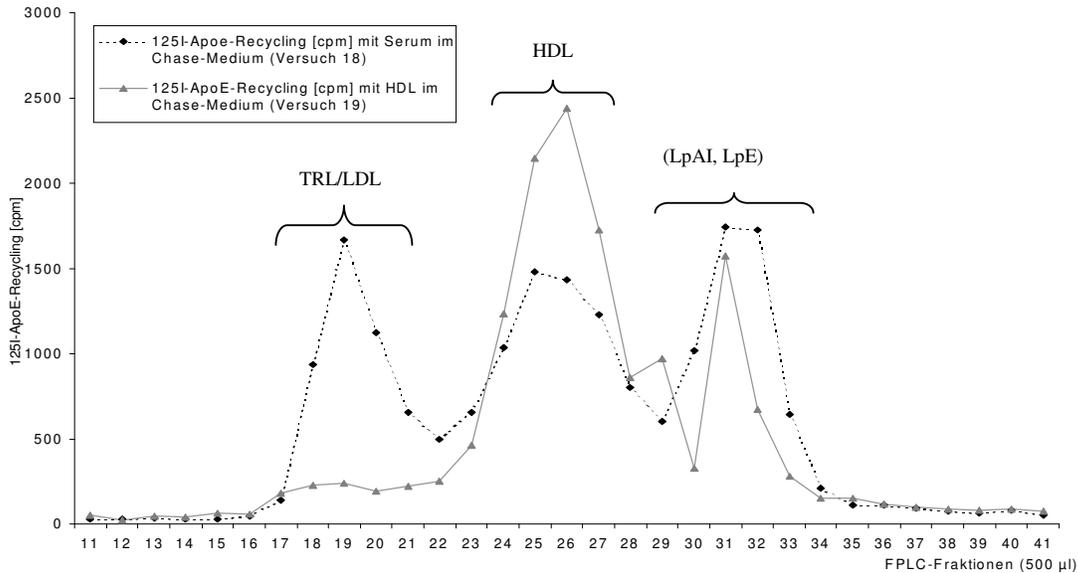


Abbildung 5: ^{125}I -ApoE-Recycling nach Chase mit Serum oder HDL im Vergleich.

Pulse-Chase-Versuch an ^3H -markierten Huh7-Zellen mit ^{125}I -ApoE-markierten TRL. Huh-7-Zellen wurden über Nacht zur Markierung des Zell-Cholesterols mit ^3H -Cholesterolem-LDL bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Radioaktivität abgenommen und die Zellen mit PBS-Heparin gewaschen. Die Zellen wurden dann für 60 min. mit reinem DMEM bei 37°C ausgehungert. Für weitere 60 min. wurde Pulse mit ^{125}I -ApoE-markierten TRL (5×10^9 cpm/ml) bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde wiederum die Radioaktivität abgenommen und die Zellen mehrfach auf Eis bei 4°C mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin vorsichtig gewaschen um oberflächliche Liganden zu entfernen. Es folgte der Chase für 60 min. mit 10% humanem Serum in 0,1% BSA in DMEM sowie $50 \mu\text{g/ml}$ HDL₃ in 0,1% BSA in DMEM bei 37°C . Anschließend wurde das Chase-Medium von den Zellen abgenommen, per FPLC S-200 aufgetrennt und der ^{125}I -ApoE-Gehalt im γ -Counter bestimmt.

Abbildung 5 zeigt jene Lipoproteine, die Ziel des ApoE-Recyclings sind. Es ist im Vergleich die Auftrennung des Mediums nach Chase mit HDL₃ (rote Kurve) und menschlichem Serum (grüne Kurve) dargestellt. Vorangegangen ist in beiden Fällen ein Pulse an Huh-7-Zellen mit entsprechend markierten TRL, dem bereits beschriebenen Schema folgend (siehe 3.2.1). Nach dem Pulse-Chase-Experiment wurde das Chase-Medium abgenommen und über FPLC (Fast-Performance-liquid-Chromatografie) anhand einer Superdex-200-Säule aufgetrennt. Dieses Verfahren erlaubt die Auftrennung der Lipoproteine nach ihrer Größe und Dichte.

Es sind bei Auftrennung des Chase-Mediums mit HDL₃ (rote Kurve) zwei Peaks zu beobachten: Der eine Peak (F 25-27) lässt sich einwandfrei als HDL-Peak identifizieren. Der andere Peak (F30-32) hat bei normalem Nüchternserum keine Entsprechung. Die Auftrennung des Serum-Chase-Mediums (grüne Kurve) zeigt ebenfalls diesen dritten Peak, auf den später noch genauer eingegangen werden soll. Außerdem zeigt der Serum-Chase, wie zu erwarten, die TRL/VLDL-Fraktion und -in Übereinstimmung mit dem HDL₃-Chase-

Serum- die HDL-Fraktion. Die Superdex-200-Säule besitzt einen Trennbereich von 10-600 kDa; eignet sich also kaum zur Auftrennung der größeren Lipoproteine LDL/TRL (20-50 nm bzw.) und ergibt eine umso bessere Auflösung der kleinen Bestandteile (HDL: 8-12 nm bzw. 200-500 kDa). TRL und LDL erscheinen daher gemeinsam im Ausschlussvolumen der Säule.

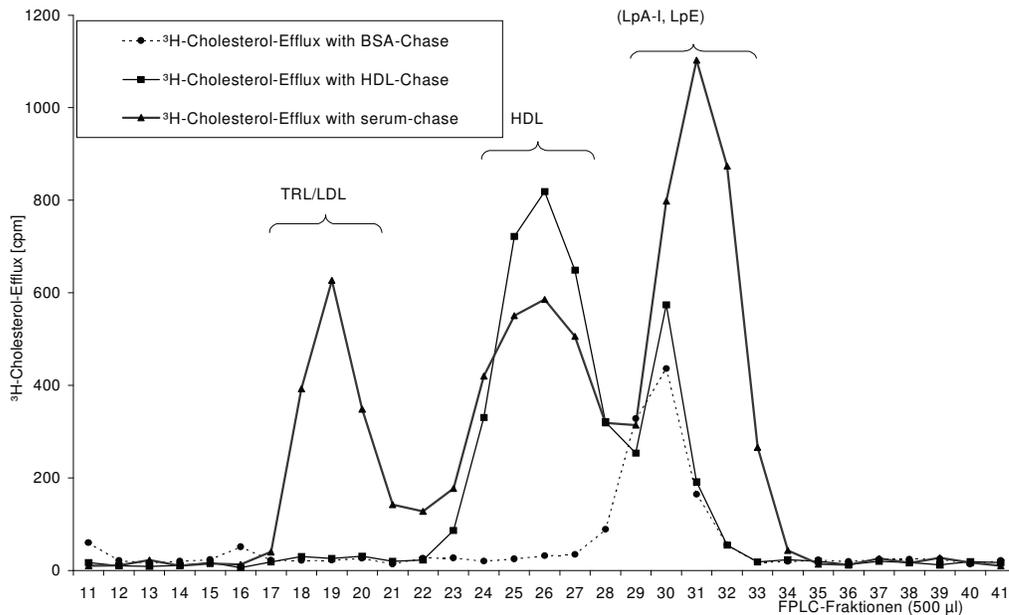


Abbildung 6: ³H-Cholesterol-Efflux nach Chase mit BSA/HDL/Serum im Vergleich.

Pulse-Chase-Experiment: Markierung des Zell-Cholesterols mit ³H-Chol-LDL: Huh-7-Zellen wurden über Nacht mit ³H-Cholesterol-LDL bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Radioaktivität abgenommen und die Zellen mit PBS-Heparin gewaschen. Die Zellen wurden dann für 60 min mit reinem DMEM bei 37° C ausgehungert. Für weitere 60 min wurde Pulse mit unmarkierten TRL bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mehrfach auf Eis bei 4°C mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin vorsichtig gewaschen um oberflächlich gebundene Liganden zu entfernen. Es folgte der Chase für 60 min bei 37° C an einem Drittel der Zellen mit 10% humanem Serum in 0,1% BSA in DMEM, an einem zweiten Drittel mit 50 µg/ml HDL₃ in 0,1% BSA in DMEM und einem weiteren Drittel der Zellen mit 0,1% BSA in DMEM ohne weiteren Zusatz. Anschließend wurden die Chase-Medien von den Zellen abgenommen, über S-200 Gelfiltrationschromatografie aufgetrennt, und der ³H-Cholesterolgehalt der einzelnen Fraktionen im β-Counter bestimmt. Die Angabe des ³H-Cholesterol-Efflux bezieht sich auf die nach der Cholesterol-Markierung in der Zelle durchschnittlich vorhandene ³H-Cholesterol-Aktivität, wie sie an einem nicht dem Chase unterzogenen Teil der Zelle ermittelt wurde.

Abbildung 6 gibt Aufschluß über jene Lipoproteine, die Ziel des ApoE-Recycling-assoziierten zellulären Cholesterol-Effluxes sind. Der Darstellung liegt wiederum eine Auftrennung des Chase-Mediums über S-200-FPLC zugrunde. Nach Markierung des Zell-Cholesterol-Pools über Nacht mit ³H-Cholesterol-LDL wurde am nächsten Tag die Radioaktivität abgenommen und die Zellen mit PBS-Heparin gewaschen. Die Zellen wurden dann für 60 min mit reinem DMEM bei 37° C ausgehungert. Für weitere 60 min wurde Pulse mit unmarkierten TRL bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mehrfach auf Eis bei 4°C mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin vorsichtig gewaschen um oberflächlich gebundene Liganden zu entfernen. Es folgte der Chase für 60 min bei 37° C an einem Drittel der Zellen mit 10% humanem Serum in 0,1% BSA in DMEM, an einem zweiten Drittel mit 50 µg/ml HDL₃ in 0,1% BSA in DMEM und einem weiteren Drittel der Zellen mit 0,1% BSA in DMEM ohne weiteren Zusatz. Anschließend wurden die Chase-Medien von den

Zellen abgenommen, über S-200 Gelfiltrationschromatografie aufgetrennt, und der ^3H -Cholesterolgehalt der einzelnen Fraktionen im β -Counter bestimmt.

Bei allen drei Chase-Medien richtet sich ein Teil des ^3H -Cholesterol-Effluxes an ein sehr kleines, dichtes Lipoprotein, das bei FPLC-Fraktion 29-32 detektiert werden kann. Besonders hoch ist dieser Efflux bei Chase mit menschlichem Serum. Das gleichermaßen ausgerichtete ApoE-Recycling zu Fraktion 29-32, wie es in Abbildung 5 zu sehen ist, lässt annehmen, daß es sich hier um den ApoE/Cholesterol-Komplex handelt, der bereits nach den Immunfluoreszenz-Experimenten postuliert worden war (Abbildung 4). Wie später gezeigt wird, enthält der detektierte Cholesterol-Partikel tatsächlich ApoE und wird daher im folgenden LpE genannt.

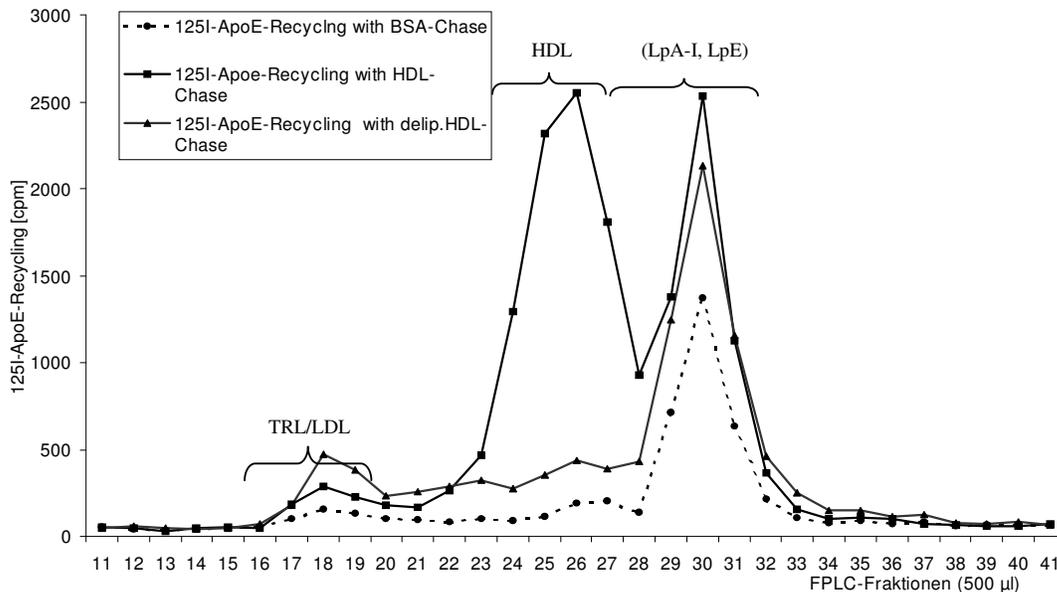


Abbildung 7: ^{125}I -ApoE-Recycling nach Chase mit BSA, HDL₃ sowie delipidierter HDL im Vergleich.

Es wurde ein Metabolisches Pulse-Chase-Experiment durchgeführt. Dazu wurden Zellen für 60 min. mit reinem DMEM bei 37° C ausgehungert. Für weitere 60 min. wurde der Pulse mit ^{125}I -ApoE-TRL bei 37°C vollzogen. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mehrfach auf Eis bei 4°C mit eiskaltem PBS sowie PBSHeparin vorsichtig gewaschen um oberflächlich gebundene Liganden zu entfernen. Es folgte der Chase für 60 min bei 37° C an einem Drittel der Zellen mit 0,1% BSA in DMEM ohne weitere Zusätze, an einem zweiten Drittel mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HDL₃ in 0,1% BSA in DMEM und einem weiteren Drittel der Zellen mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ delipidierter HDL₃ (=ApoA-I) in 0,1% BSA in DMEM. Anschließend wurden die Chase-Medien von den Zellen abgenommen, über S-200 Gelfiltrationschromatografie aufgetrennt, und der ^{125}I -ApoE-Gehalt der einzelnen Fraktionen im γ -Counter bestimmt. Die Angabe des ^{125}I -ApoE-Recyclings bezieht sich auf die nach dem Pulse in der Zelle vorhandene durchschnittliche ^{125}I -ApoE-Aktivität.

Das Experiment für Abbildung 7 lässt weitere Erkenntnisse über den Peak der Fraktionen 29-32 zu. Zusätzlich zum Chase mit BSA und HDL₃ wurde Chase mit delipidierter HDL₃ unternommen. Delipidierte HDL entspricht als in-vitro hergestellter Modellpartikel nascenter HDL bzw. seinem wesentlichen Strukturprotein: ApoA-I. Bei Anwesenheit von ApoA-I im Chase-Medium kommt es zu einem Recycling von ^{125}I -ApoE, welches sich vor Allem in den Fraktionen 29-32 eluieren lässt. In Fraktion 29-32 eluiert sowohl ApoA-I selbst, als auch das postulierte LpE. Es ist daher anzunehmen, daß es auch bei Chase mit ApoA-I zur Sekretion

von LpE kommt, möglicherweise jedoch auch zur gemeinsamen Sekretion der beiden Apoproteine in einem kleinen Lipoprotein, zusammen mit Cholesterol.

Nach Internalisation ApoE-haltiger TRL und Anwesenheit von HDL im Chase-Medium kommt es einerseits zur intra- oder extrazellulären Aufnahme des TRL-ApoE in die HDL-Fraktion in großen Mengen, zum anderen erfolgt die Sekretion von ApoE ins Medium unabhängig von HDL in Fraktion 29-32, wahrscheinlich in Form des LpE.

Abbildung 8 und Abbildung 9 sind repräsentative Versuche einer Reihe zeitabhängiger Pulse-Chase-Experimente. Sie wurden durchgeführt um die Dynamik des ^{125}I -ApoE-Recyclings sowie ^3H -Cholesterol-Effluxes zu überprüfen. Es wurde vergleichsweise innerhalb eines Experimentes mit einem Teil der Zellen Chase für 10 Minuten, mit einem zweiten Teil Chase für 60 Minuten und einem dritten Teil der Zellen Chase für 240 Minuten angesetzt. Anschließend wurde wiederum über S-200-FPLC aufgetrennt. Die Recycling-Kinetik dieser Versuche zeigten deutliche Übereinstimmung.

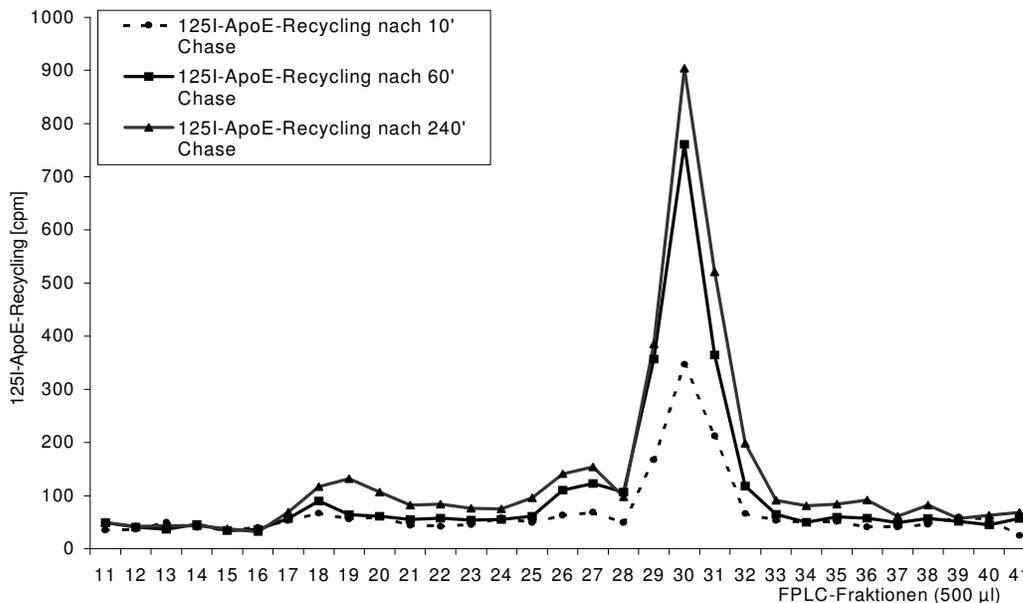


Abbildung 8: Zeitabhängiges ^{125}I -ApoE-Recycling nach Chase mit BSA für 10 min./60 min./240 min.

Es wurde ein Pulse-Chase-Experiment mit unterschiedlichen Chase-Zeiten durchgeführt. Dazu wurden unmarkierte Huh7-Zellen für 60 min. mit reinem DMEM bei 37°C ausgehungert. Für weitere 60 min. wurde der Pulse mit ^{125}I -ApoE-TRL bei 37°C vollzogen. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mehrfach auf Eis bei 4°C mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin vorsichtig gewaschen um oberflächlich gebundene Liganden zu entfernen. Es folgte der Chase mit einem Teil der Zellen für 10 min., einem Teil für 60 min., und einem dritten Teil für 240 min. bei 37°C mit 0,1% BSA in DMEM ohne weitere Zusätze. Die Chase-Medien wurden jeweils von den Zellen abgenommen, über S-200 Gelfiltrationschromatografie aufgetrennt, und der ^{125}I -ApoE-Gehalt der einzelnen Fraktionen im γ -Counter bestimmt. Die Angabe des ^{125}I -ApoE-Recyclings bezieht sich auf die nach dem Pulse in der Zelle vorhandene durchschnittliche ^{125}I -ApoE-Aktivität.

Auf Abbildung 8 ist das ^{125}I -ApoE-Recycling nach Pulse mit entsprechend markierten TRL und Chase mit BSA, also ohne Akzeptor im Chase-Medium, zu sehen. Insbesondere nach 60 bzw. 240 Minuten Chase sind im Medium geringe Mengen ^{125}I -haltige HDL und TRL nachweisbar. Auffallend ist wiederum der hohe Gehalt an ^{125}I -ApoE in Fraktion 29-32. Alle drei Fraktionen nehmen mit der Zeit zu.

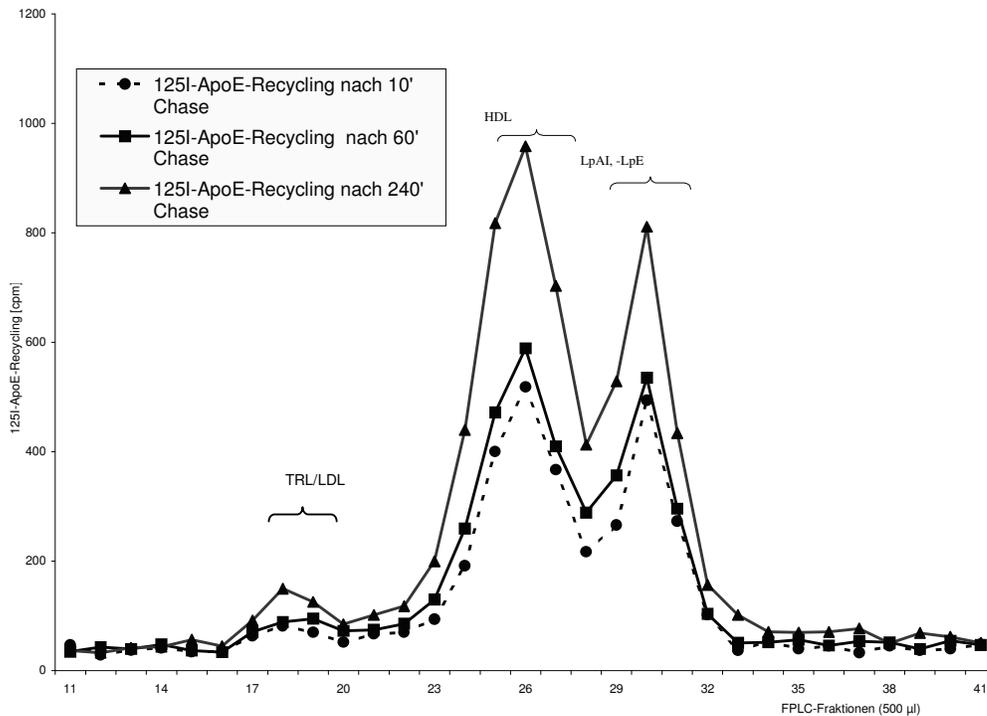


Abbildung 9: Zeitabhängiges ^{125}I -ApoE-Recycling nach Chase mit HDL für 10 min./60 min./240 min.

Es wurde, wie im Versuch zu Abbildung 9, ein Pulse-Chase-Experiment mit unterschiedlichen Chase-Zeiten durchgeführt, mit dem Unterschied, daß nun der Chase mit HDL₃ durchgeführt wurde: Dazu wurden unmarkierte Huh7-Zellen für 60 min. mit reinem DMEM bei 37° C ausgehungert. Für weitere 60 min. wurde der Pulse mit ^{125}I -ApoE-TRL bei 37° C vollzogen. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mehrfach auf Eis bei 4° C mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin vorsichtig gewaschen um oberflächlich gebundene Liganden zu entfernen. Es folgte der Chase mit einem Teil der Zellen für 10 min., einem Teil für 60 min., und einem dritten Teil für 240 min. bei 37° C mit 50 µg/ml HDL₃ in 0,1% BSA-DMEM. Die Chase-Medien wurden jeweils von den Zellen abgenommen, über S-200 Gelfiltrationschromatografie aufgetrennt, und der ^{125}I -ApoE-Gehalt der einzelnen Fraktionen im γ -Counter bestimmt. Die Angabe des ^{125}I -ApoE-Recyclings bezieht sich auf die nach dem Pulse in der Zelle vorhandene ^{125}I -ApoE-Aktivität.

Auch Abbildung 9 entspricht der bereits dargestellten zeitabhängigen Recycling-Kinetik. Ist die ^{125}I -ApoE-haltige TRL-Fraktion auch nach 10 und 60 Minuten noch relativ klein, sezernieren die Zellen nach 240 Minuten schon einen nicht unerheblichen Teil. Auch die HDL-, sowie die LpE-Fraktion verdoppeln sich im Vergleich zwischen 10 und 240 Minuten Chase beinahe.

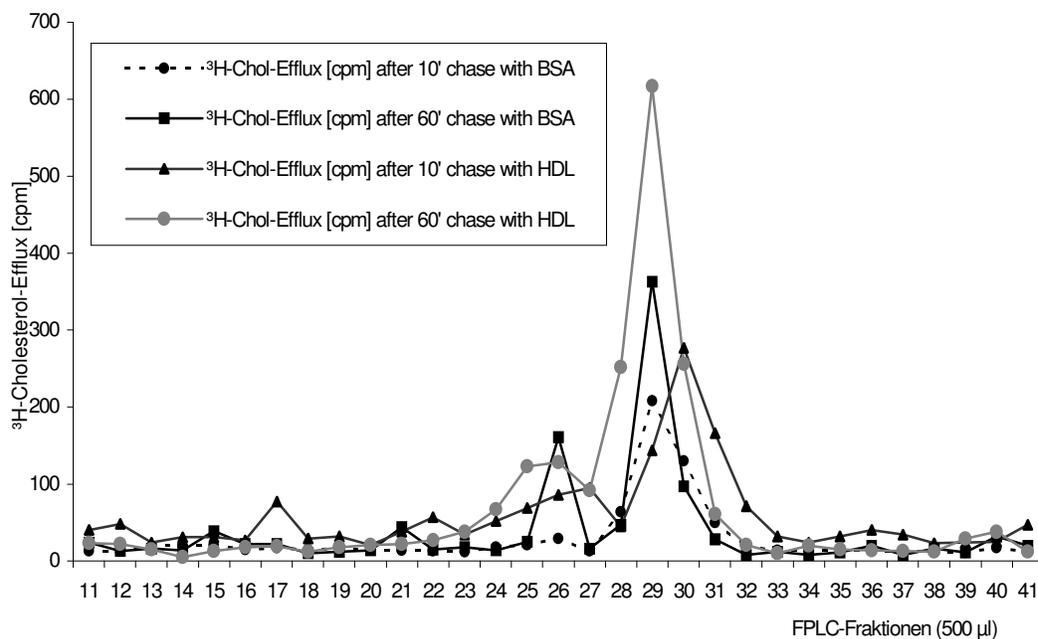


Abbildung 10: Zeitabhängiger ^3H -Cholesterol-Efflux nach Chase mit HDL₃ und BSA für 10 min./60 min..

Zur Darstellung des ^3H -Cholesterol-Effluxes in Abhängigkeit von der Zeit wurde wiederum ein Prepulse-Pulse-Chase-Experiment durchgeführt. Dazu wurden Huh7-Zellen zunächst im Pre-Pulse über Nacht mit ^3H -Cholesterol-LDL bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Radioaktivität abgenommen und die Zellen mit PBS-Heparin gewaschen. Die Zellen wurden dann für 60 min mit reinem DMEM bei 37° C ausgehungert. Für weitere 60 min wurde Pulse mit unmarkierten TRL bei 37° C durchgeführt. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mehrfach auf Eis bei 4° C mit eiskaltem PBS sowie PBS-Heparin vorsichtig gewaschen um oberflächlich gebundene Liganden zu entfernen. Es folgte der Chase bei 37° C an einer Hälfte der Zellen mit 50 µg/ml HDL₃ in 0,1% BSA in DMEM für 10 min bzw. 60 min. im Vergleich und der anderen Hälfte der Zellen mit 0,1% BSA in DMEM ohne weiteren Zusatz ebenfalls für sowohl 10 min als auch 60 min. im Vergleich. Alle von den Zellen abgenommenen Chase-Medien wurden wiederum sofort über S-200 Gelfiltrationschromatografie aufgetrennt, und der ^3H -Cholesterolgehalt der einzelnen Fraktionen im β -Counter bestimmt. Die Angabe des ^3H -Cholesterol-Efflux bezieht sich auf die nach dem Prepulse in der Zelle durchschnittlich vorhandene ^3H -Cholesterol-Aktivität.

Der Cholesterol-Efflux aus der Zelle entspricht ebenfalls der oben beschriebenen Recycling-Kinetik des ApoE. Der höchste Efflux erfolgt bei Chase mit HDL₃ über 60 Minuten zum LpE.

4.4 Analyse des LpE-Peak

Der nicht eindeutig einer Lipoprotein-Klasse zuzuordnende Peak, in dem sowohl ^3H -Cholesterol als auch ^{125}I -ApoE nachzuweisen ist, sollte im folgenden Abschnitt näher charakterisiert werden. Zunächst sollte untersucht werden, ob die verschiedenen Radioaktivitäten einem gemeinsamen Partikel zuzuordnen sind.

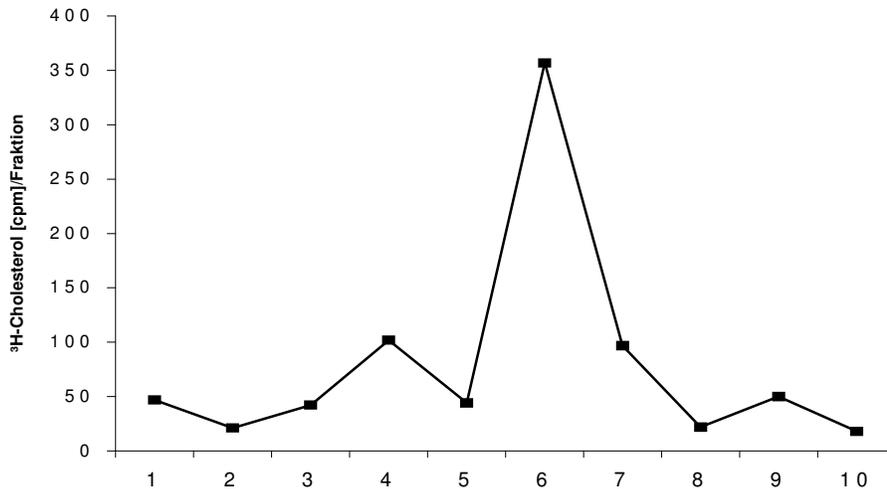


Abbildung 11: α -ApoE-Immunoaffinitätschromatografie zur Analyse von Medium auf ApoE-haltige Partikel.

Zur Analyse des Chase-Medium-Peaks 29-32 auf ApoE-haltige Partikel wurden die Fraktionen 29-32 nach FPLC auf eine Immunoaffinitätssäule gegeben. Anschließend wurde eluiert und ^3H -Cholesterol pro Fraktion gemessen. Die Bindenden Fraktionen zeigen einen deutlichen Peak, der nahelegt, daß die entsprechende Fraktion neben dem ApoE auch ^3H -Cholesterol enthält. Diese Vermutung wurde durch anschließenden Westernblot mit den Bindenden und Nicht-Bindenden Fraktionen bestätigt (siehe unten). Das Chase-Medium stammt von Pulse-Chase-Experiment 27. Hier wurden Huh7-Zellen mit ^3H -Cholesterol über Nacht inkubiert. Dann mit PBS-Heparin gewaschen, für 60 min. mit reinem DMEM ausgehungert und anschließend dem Pulse mit unmarkierten TRL für 60 min. ausgesetzt. Nach erneutem Waschen auf Eis mit eiskaltem PBS und PBS-Heparin folgte 60 min. Chase mit HDL₃. Dieses Medium wurde nach dem Chase abgenommen und für obige Analyse verwendet.

Für Abbildung 11 wurden zunächst wiederum Huh7-Zellen über Nacht mit ^3H -Cholesterol-LDL markiert, am nächsten Tag mit unmarkierten TRL der Pulse und mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HDL₃ der Chase durchgeführt. Das Chase-Medium wurde abgenommen und über die S-200-FPLC in standardisierter Weise aufgetrennt. In den einzelnen Fraktionen der FPLC wurde der ^3H -Cholesterolgehalt bestimmt und so die bereits bekannte Verteilung der Lipoproteine detektiert. Die LpE-Fraktion (F29-31) wurde gepoolt und über Nacht in einer α -ApoE-Immunoaffinitätschromatografie-Säule inkubiert. Am nächsten Tag konnte nun der nicht-bindende Teil aus der Säule abgelassen und aufgefangen werden. Der bindende Teil wurde eluiert und wiederum auf ^3H -Cholesterol im β -Counter überprüft. Abbildung 11 zeigt, daß der Großteil der Radioaktivität in drei zusammenhängenden Fraktionen von der Säule eluiert werden konnten (Binding-Fractionen 5,6,7).

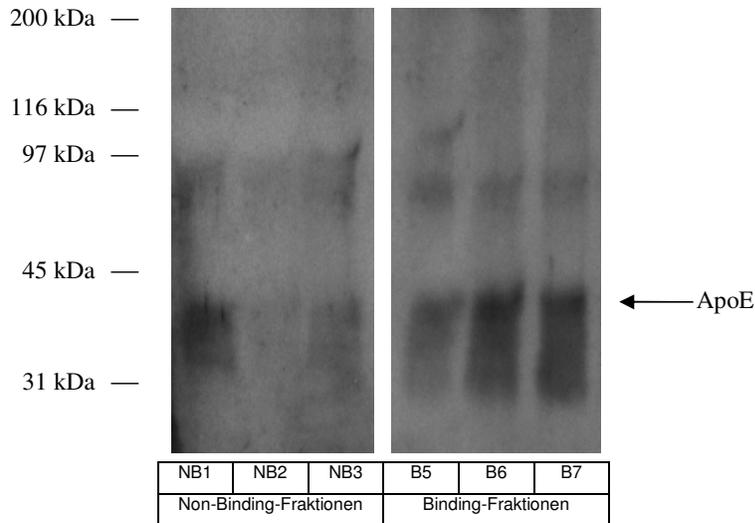


Abbildung 12: α -ApoE-Western-Blot mit allen Immunoaffinitätschromatografie-Fraaktionen bestätigt den Verdacht auf ApoE-haltige Partikel im Chase-Medium.

Huh-7-Zellen wurden über Nacht mit ^3H -Cholesterol-LDL bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Radioaktivität abgenommen und die Zellen mit PBS-Heparin gewaschen. Die Zellen wurden dann für 60 min mit reinem DMEM bei 37° C ausgehungert. Für weitere 60 min wurde Pulse mit unmarkierten TRL bei 37° C durchgeführt. Anschließend wurde mehrfach auf Eis bei 4° C mit eiskaltem PBS sowie vorsichtig gewaschen um oberflächliche Liganden zu entfernen. Es folgte der Chase für 60 min + HDL₃ bei 37° C. Anschließend wurde das Chase-Medium von den Zellen abgenommen und per FPLC S-200 aufgetrennt. Die Fraktionen 29-30 wurden gepoolt und auf eine ApoE-Immunoaffinitätssäule gegeben. Nach Inkubation von 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die gebundenen Partikel eluiert. Der Überstand (Non-Binding-Fraaktionen) und die eluierten Fraktionen (Binding) wurden unter reduzierenden Bedingungen auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit α -ApoE geblottet.

Die in Abbildung 11 hervorgehobenen Fraktionen 5/6/7 (B5-B7) sowie alle anderen Fraktionen und der Überstand der Immunoaffinitätssäulenchromatografie wurden einzeln unter reduzierenden Bedingungen auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetragen und anschließend mit α -ApoE-Antikörpern geblottet.

Abbildung 12 zeigt nun diesen Western-Blot. Es ist zu erkennen daß in den oben bereits erwähnten Fraktionen des Säulen-Eluats 5/6/7 eine deutliche Antikörper-Detektion des ApoE stattgefunden hat. Auch in Fraktion 1 des Überstandes (Non-Binding-Fraaktionen) ist anscheinend ApoE vorhanden. Das deutet auf eine Sättigung der Säule hin, deren Kapazität an wandständigen α -ApoE-Antikörpern offensichtlich in einem Missverhältnis zur großen Menge an ApoE-Antigen im Medium steht.

Mehrere Studien haben Caveolin eine Beteiligung am intrazellulären Cholesterolfstoffwechsel zugeschrieben (Smart et al. 1996, Li et al. 1996, Liu et al. 1999, Gargalovic et al. 2003). Mit den folgenden Experimenten soll näher untersucht werden, ob ApoE-Recycling und dieser Transportweg in einem funktionellen Zusammenhang stehen.

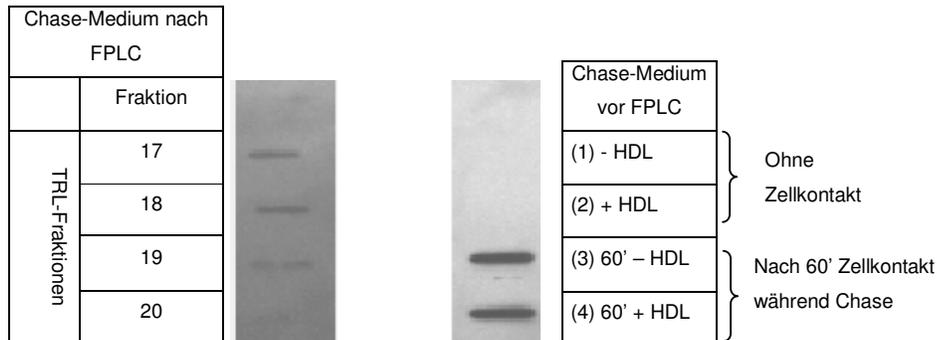


Abbildung 13: α -Caveolin-Slot-Blot nach S-200-FPLC von Medium des Versuchs 28. Detektion des Caveolins in der TRL-/LDL-Fraktion (F17/18/19)

Zur Detektion des Caveolins wurde das Chase-Medium aus Versuch 28 im Slot-Blot aufgetragen und anschließend eine Immunodetektion des Caveolins mit spezifischen Antikörpern vorgenommen (α -Caveolin-poly 1:100). Rechts sind Proben der 4 verschiedenen Chase-Medien vor Durchführung der FPLC aufgetragen: 0 min. Chase +/- HDL₃, 60 min. Chase +/- 50 μ g/ml HDL₃ im Medium. Das Chase Medium 4 wurde über FPLC S-200 aufgetrennt und alle resultierenden FPLC-Fractionen im Slot-Blot aufgetragen, ebenfalls mit anschließender Immunodetektion. Vier Fraktionen davon sind links abgebildet.

Bei der Frage nach der Rolle Caveolins in der Sekretion von Lipoproteinen durch die Zelle gibt Abbildung 13 Hinweis darauf, daß Caveolin tatsächlich während des von uns durchgeführten Chase von der Zelle sezerniert wird. Der rechte Blot zeigt Aliquots der 4 verschiedenen Chase-Medien. Der negative Blot von Medium 1 und 2 weist nach, daß kein Caveolin im Medium selbst ist. Erst nach 60-minütigem Kontakt der Medien mit den Zellen während des Chase (Medium 3 und 4), ist Caveolin nachweisbar. Die Sekretion ist jedoch unabhängig von HDL, was darauf hindeutet, daß das ApoE-Recycling unabhängig von der Caveolin-Sekretion abläuft.

Anschließend wurde Medium 4 über die FPLC getrennt, und die einzelnen Fraktionen ebenfalls einem Slot-Blot mit anschließender α -Caveolin-Antikörper-Immunodetektion unterzogen. Das Ergebnis ist auf der linken Seite zu sehen. Die einzigen Fraktionen in denen Caveolin deutlich nachweisbar war, sind die TRL-Fractionen 17-19. Nur äußerst schwache Detektion war noch in einigen wenigen anderen Fraktionen möglich.

Nachdem die in Abbildung 13 dargestellten Ergebnisse eine Beteiligung Caveolins am Recycling von TRL-Cholesterol und ApoE eher nicht unterstützen, sollte dieser Zusammenhang in Immunfluoreszenz-Versuchen weitergehend aufgeklärt werden. Dabei wurden zunächst humane Fibroblasten für 60 min mit reinem DMEM bei 37 °C ausgehungert und dann für 60 min mit unmarkierten TRL der Pulse vorgenommen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis mit PBS-Heparin und PBS mehrfach gewaschen um an der Oberfläche gebundene Liganden zu entfernen. Die Hälfte der Zellen wurde für 15min einem Chase mit HDL₃ unterzogen. Alle Zellen wurden dann mit Paraformaldehyd fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen ApoE (A,E: α -apoE-mono 1:25), Cholesterol (B,F: Filipin 1:50) und Caveolin (C,G: α -Caveolin-poly 1:100) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte über die Zweitantikörper α -Maus Cy3 (A,E), α -rabbit Cy2 (B,F) und DTAF (C,G) für anschließende Fluoreszenzmikroskopie.

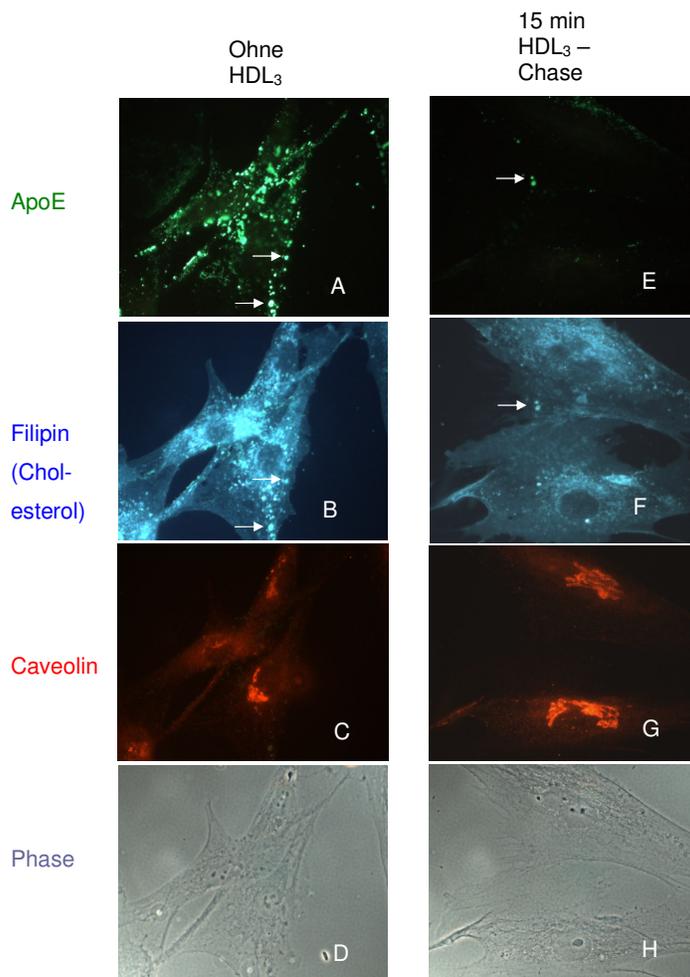


Abbildung 14:
Internalisiertes TRL-ApoE
kolokalisiert mit TRL-
Cholesterol jedoch nicht mit
Caveolin.

Zur Klärung des Zusammenhangs zwischen Caveolin und HDL-Sekretion wurden Immunfluoreszenz-Versuche durchgeführt. Dazu wurden humane Fibroblasten für 60 min mit reinem DMEM bei 37 °C ausgehungert, dann für 60 min mit TRL inkubiert (Pulse) und anschließend auf Eis mit PBS-Heparin und PBS mehrfach gewaschen um an der Oberfläche gebundene Liganden zu entfernen. Ein Teil der Zellen wurde für 15min einem Chase mit HDL₃ unterzogen. Alle Zellen wurden dann mit Paraformaldehyd fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen ApoE (A,E: α -apoE-mono 1:25), Cholesterol (B,F: Filipin 1:50) und Caveolin (C,G: α -Caveolin-poly 1:100) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte über die Zweitantikörper α -Maus Cy3 (A,E), α -rabbit Cy2 (B,F) und DTAF (C,G). Die genaue Methodik ist im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

Die in Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse lassen keine intrazelluläre Kolokalisation zwischen Caveolin und ApoE/Cholesterol erkennen. ApoE und Cholesterol hingegen kolokalisieren eindeutig in peripheren endosomalen Kompartments. Auch lässt sich erneut

die Wirkung des HDL als Induktor von Cholesterol-Efflux und ApoE-Recycling bzw. ApoE/Cholesterol-Recycling beobachten. Was den Zusammenhang mit Caveolin anbelangt, sprechen die Ergebnisse dafür, daß Caveolin über andere intrazelluläre Pfade prozessiert wird, als die TRL bzw. deren Recycling-Remnants.

5 Diskussion

Ziel der Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen dem HDL-induzierten ApoE-Recycling und dem zellulären Lipidmetabolismus näher zu untersuchen. Dabei konnte das ApoE-Recycling als eine Verbindung zwischen TRL- und HDL-Metabolismus identifiziert werden. Ferner ist das ApoE-Recycling an der Sekretion von Lipoproteinpartikel hoher Dichte beteiligt. Es konnte zudem eine Assoziation zwischen dem ApoE-Recycling und dem zellulären Cholesterometabolismus beobachtet werden.

5.1 Experimentelles System (Liganden und Methodik)

Ligandenpräparation

Sobald Chylomikronen von den Enterocyten in die Lymphe abgegeben werden, beginnt ihre Hydrolyse durch Wechselwirkungen zwischen dem Apoprotein C-II und der endothelständigen LpL (Santamarina-Fojo 1992, Olivecrona et Bengtsson-Olivecrona 1993). Sie haben daher im Blut des gesunden Probanden eine sehr kurze Halbwertszeit und lassen sich für Liganden-Studien schlecht präparieren. Patienten mit Typ I HyperTriazyglyzeridämie dagegen akkumulieren Chylomikronen im Blut aufgrund eines Gendefekts für die LpL oder das Apoprotein C-II. Für die vorliegende Arbeit konnten aus dem Blut solcher ApoC-II-defizienter Patienten Chylomikronen mittels Ultrazentrifugation gewonnen werden. Sie wurden anschließend bezüglich ihres Protein-, Cholesterol und Phospholipidgehalts analysiert. Die Zusammensetzung der verwandten Partikel stimmt, wie in Tabelle 2 dargestellt, mit der Zusammensetzung ausführlich in der Literatur charakterisierter Chylomikronen gut überein. Abbildung 1 zeigt die Autoradiografie zweier radioaktiv markierter Liganden. Die ApoE-Bande ist, neben der ApoC-Bande, erwartungsgemäß deutlich prominent; ApoB 48 ist das entscheidende Strukturprotein der Chylomikronen. Außerdem sind geringe Mengen ApoC, ApoA-I sowie FHR IV vorhanden. Da Chylomikronen und VLDL aufgrund ähnlicher Dichte über die Ultrazentrifugation nicht aufzutrennen sind, ist auch ein geringer Anteil an ApoB₁₀₀, dem Strukturprotein der VLDL, in der Präparation zu erwarten. Zur Trennung wäre ein höherer Aufwand, wie die Aufreinigung über die ApoB₁₀₀-spezifische Immunoaffinitätssäulen-Chromatographie nötig (Milne et al.). Der Aufwand ist jedoch angesichts des geringen VLDL-Gehalts im Vergleich zum Gehalt des Serums an TRL nicht gerechtfertigt. Außerdem konnte eine weitgehende metabolische Übereinstimmung von präparierten CM und physiologischen CM gezeigt werden (Heeren et Beisiegel 2001). Wegen der geringen Verunreinigung mit ApoB₁₀₀-enthaltenden VLDL wurden die eingesetzten Liganden nicht Chylomikronen genannt, sondern als Triazyglyzerid-reiche Lipoproteine bezeichnet.

Alternativ ist die Isolierung von VLDL aus dem Plasma von Patienten mit Hypertriglyzeridämie Typ III beschrieben (Chappell 1988). Die vorwiegend hepatische Synthese dieser Partikel bringt jedoch deutliche Unterschiede im Apolipoproteinmuster sowie der Gewichtung der verschiedenen Lipidklassen mit sich (Beisiegel 1995) und schränkt daher ihre Verwendbarkeit als Modell-Chylomikronen deutlich ein. Ross et al. beschrieben des Weiteren 1977 die Verwendung von β -VLDL, die von Kaninchen nach sehr lipidreicher Nahrung akkumuliert werden und sich daher ebenfalls zur Präparation anbieten (Ross et al. 1977).

Die Ligandenmarkierung erfolgte zum einen anhand der 125 Iodierung aller Tyrosin-Reste des Partikels, auch als Gesamt-Protein-Markierung bezeichnet. Zum anderen wurde die isolierte Markierung des Apoprotein E vorgenommen, anschließend wurden ApoE und Partikel reassoziert (McFarlane 1958)

5.2 Das ApoE-Recycling ist assoziiert mit einem Efflux von Zell-Cholesterol

Während es nach zellulärer Aufnahme von TRL zum lysosomalen Abbau von ApoB₁₀₀ sowie des Triacylglycerid-Kerns kommt, erfährt ApoE einen erheblich verlangsamten Abbau und zum Teil die Resekretion an die Zelloberfläche (Wong et al. 1989, Tabas et al. 1990, Beisiegel et al. 1995). Dieser Vorgang wird auch als ApoE-Recycling bezeichnet. Das ApoE wird nicht als einzelnes Protein reseziert, sondern in Assoziation mit LPL und ApoC's (Heeren et al. 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Resekretion außerdem gemeinsam mit Cholesterol erfolgt, welches ebenfalls aus den internalisierten TRL stammt (Abbildung 2). Diese Beobachtung stützt die These der Sekretion von „surface-Remnants“, die in Heeren et al. diskutiert werden (Heeren et al. 1999, Heeren et al. 2001).

Verbindungen zwischen ApoE- und Cholesterol-Metabolismus sind in der Literatur vielfach beschrieben. Dabei steht klinisch vor allem die Atherosklerose sowie die koronare Herzerkrankung als Folgen einer Hypercholesterinämie im Vordergrund (De Knijff et al. 1996, Wilson et al. 1993).

Biochemisch beruht die Wichtigkeit des ApoE auf mehreren Funktionen: Zum einen ist ApoE der Mediator bei der hepatischen Aufnahme von Lipoproteinen (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**), ApoE beeinflusst aber zweitens, über die TRL-Clearance hinaus, auf bisher nicht abschließend geklärte Weise, den Cholesterolmetabolismus. Es wird eine Steigerung des Cholesterol-Effluxes aus lipid-beladenen Makrophagen der Gefäßwand durch ApoE diskutiert (Basu et al. 1982, Zhu et al. 1998). An ApoE-defizienten Mäusen wurden in Langzeitstudien nach Injektion eines Plasmids mit der Geninformation für humanes ApoE in die Muskulatur nach 9 Monaten eine Reduktion der Entwicklung atherosklerotischer Plaques um ca. 25% nachgewiesen (Athanasopoulos et al. 2000). Außerdem konnten erhöhte Cholesterol-Werte von ApoE^{-/-}-Mäusen durch eine Knochenmarkstransplantation mit der genetischen Anlage für ApoE-

produzierende Makrophagen (Bellosta et al. 1995, Boisvert et al. 1995), sowie durch andere Formen der Zufuhr von ApoE gesenkt werden. Dabei scheinen jedoch intrazelluläre Wirkungen im Vordergrund zu stehen, da bei Produktion geringster ApoE-Mengen zwar keine Besserung der Hyperlipidämie erfolgt, der ApoE-Level allerdings ausreicht, um deutliche morphologische Reduktionen atherosklerotischer Gefäßläsionen herbeizuführen (Fazio et al. 1997, Thorngate et al. 2000, Athanasopoulos et al. 2000, Zhu et al. 1998). Außerdem wird die Rolle endogenen sowie exogenen ApoE's in diesem Zusammenhang kontrovers diskutiert. Bei der Mediatorfunktion zur hepatischen TRL-Aufnahme handelt es sich augenscheinlich um exogenes ApoE. Bei der Wirkung auf den zellulären Cholesterolhaushalt hingegen ist diese Abgrenzung schwieriger. Cholesterolefflux aus Zellen erfolgt nach mehreren Untersuchungen in höherem Maße bei Bereitstellung von endogenem gegenüber exogenem, also Lipoprotein-assoziierten, ApoE (Mazzone et al. 1994, Lin et al. 1999). Allgemein scheint aber eine differenzierte Betrachtung der Unterschiede in den biologischen Wirkungen von endogenem und exogenem ApoE notwendig zu sein. Ho et al. verweisen z.B. darauf, daß endogenes ApoE im Gegensatz zu exogenem die hepatische TRL-Aufnahme hemmt und überhaupt nur exogenes ApoE den zellulären Triacylglycerid- und Cholesterolester-Metabolismus beeinflusst. Ho et al. konnten außerdem abweichende zelluläre Lokalisationen feststellen: Während sich endogenes ApoE in perinukleären Golgi-Vesikeln befand, wurde exogenes in lysosomalen Kompartments identifiziert (Ho et al. 2000). Daraus schlossen sie auf unterschiedliche intrazelluläre Stoffwechselwege für exogenes und endogenes ApoE.

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, daß exogenem ApoE eine größere Bedeutung für den intrazellulären Cholesterolmetabolismus zusteht, als vielfach angenommen. Wir konnten zeigen, daß das HDL-induzierte ApoE-Recycling nicht nur gemeinsam mit Cholesterol aus den internalisierten TRL als sogenanntes Surface-Remnant-Recycling erfolgt, sondern zudem mit einem Efflux von Cholesterol aus dem intrazellulären Pool assoziiert ist. Das lässt sich an unseren Experimenten mit radioaktiver Markierung des Zell-Cholesterol-Pools von Hepatocyten und nachfolgendem Pulse-Chase-Experiment mit TRL erkennen (Abbildung 3a/b). Es bedarf weiterer Untersuchungen, um zu klären, über welche Mechanismen die Einflußnahme des ApoE-Recycling auf die intrazellulären Mechanismen der Cholesterolfreisetzung erfolgt.

5.3 ApoE-Recycling: eine Verknüpfung zwischen dem Metabolismus von TRL und HDL

Die Anwesenheit von HDL₃ im extrazellulären Medium steigert das Recycling der Surface-Remnants bzw. des ¹²⁵I-ApoE sowie des TRL-Cholesterol (Abbildung 2a/b). Dazu wird das HDL₃ in die Zelle aufgenommen, intrazellulär mit ApoE, Cholesterol und möglicherweise anderen Bestandteilen der Surface-Remnants angereichert und anschließend reseziert.

Fluoreszenzmikroskopische Bilder zeigen die intrazelluläre Kollokalisierung von HDL, Cholesterol und ApoE (Abbildung 4). Pulse-Chase-Experimente und die anschließenden FPLC-Analysen des Mediums (Abbildung 5) geben darüber Aufschluß, daß ein Großteil des resezierten ApoE sich in der HDL-Fraktion wiederfindet, ein anderer ebenso großer Teil in einer Fraktion, in der keine Lipoproteine erwartet werden.

Auch ohne die extrazelluläre Anwesenheit von HDL₃ kommt es zum Recycling von ¹²⁵I-ApoE und ³H-Cholesterol der internalisierten TRL, das Ziel ist in diesem Fall jedoch beinahe ausschließlich Fraktion 29-32 (s. Abbildung 8). Bei Durchführung des Chase mit delipidierter HDL, die als in-vitro hergestellter Modellpartikel nascenter HDL entspricht, erfährt das ApoE-Recycling zur Fraktion 29-32 (F29-32) eine quantitative Steigerung, die nochmals übertroffen wird durch Chase mit HDL (Abbildung 7). Es handelt sich in all diesen Fällen eindeutig um ein Recycling des TRL-ApoE, wie die radioaktive Markierung zweifelsfrei beweist. Zudem konnten wir zeigen, daß Fraktion 29-32 Ziel eines Efflux von Cholesterol aus dem zellulären Pool ist (s. auch oben), folglich als Cholesterolakzeptor fungiert. Es befindet sich also in Fraktion 29-32 ein ApoE- und Cholesterol-haltiger Partikel, den wir zunächst als LipoproteinE (LpE) bezeichnet haben (s. Abbildung 11, Abbildung 12).

Als Erklärung für die Steigerung des ¹²⁵I-ApoE-Recyclings in Fraktion 29-32 durch delipidierte HDL sind mehrere Möglichkeiten denkbar: Eine Erklärung wäre, daß delipidierte HDL sich ebenfalls in Fraktion 29-32 eluieren lässt und, ebenso wie es für nicht-delipidierte HDL in Fraktion 24-27 (Abbildung 7) zu beobachten ist, ¹²⁵I-markiertes ApoE aufnimmt. Dann bliebe trotzdem die Sekretion des LpE als zusätzliches eigenständiges Phänomen festzuhalten. Es ist jedoch auch möglich, daß die Aufnahme von delipidierter HDL in den Hepatocyten die Sekretion des LpE induziert. Drittens könnte es sich bei LpE und delipidierter HDL um denselben Partikel handeln, der ApoA-I und ApoE enthält. Es bliebe daher eine nächste wichtige Aufgabe, LpE auf seinen ApoA-I-Gehalt zu überprüfen. Schließlich können es auch zwei Partikel sein, die möglicherweise nach Resekretion ineinander konvertieren, oder einen Austausch von Apoproteinen oder Cholesterol untereinander ermöglichen wie es zwischen HDL₂ und HDL₃ oder auch LpA-I und HDL vorkommt.

Analog ist die Steigerung des Peak 29-32 durch nicht-delipidierte HDL zu betrachten: Es könnte sich auch um eine Induktion der LpE-Sekretion durch Chase mit HDL₃ handeln. Zur Abgrenzung ist allerdings festzustellen, daß HDL₃ nicht in F29-32 eluiert.

Unabhängig davon, wie sich der Einfluß von delipidierter und nicht delipidierter HDL auf die Sekretion von LpE gestaltet, lässt sich vermuten, daß es sich bei LpE um nascente ApoE-haltige HDL handelt. Nach derzeitigem Wissensstand entstehen solche HDL-Vorläufer (=nascente, diskoidale HDL) intravaskulär durch Abdissoziation während der LPL-vermittelten Triacylglycerid-Hydrolyse von TRL oder VLDL (Musliner et al. 1991) oder durch

Umwandlung von HDL₂ zu HDL₃ (von Eckardstein et al. 2001). Daher wäre eine gewissermaßen intrazelluläre Dissoziation nascenter HDL von TRL über den Mechanismus des ApoE-Recyclings, wie von uns angenommen, nur folgerichtig. Daß die Produktion nascenter HDL auch in Hepatocyten (Castle et al. 1991) oder in der intestinalen Mukosa (Danielsen et al. 1993) stattfindet, ist bereits seit längerer Zeit bekannt. Diese Lipid-freien Apolipoproteine oder lipid-armen Partikel akquirieren dann Phospholipide und unverestertes Cholesterol von hepatischen und nicht-hepatischen Zellen (Oram et al. 1996). Man weiß weiterhin, daß sie entweder als lipidarmes ApoA-I (prä-β₁-Lp-AI) (Barrans et al. 1996, Fielding et Fielding 2001), ApoE (γ-LpE) (Huang et al. 1994) oder ApoA-IV (Lp-AIV) vorliegen (Duverger et al. 1993, von Eckardstein et al. 1995).

In unseren Pulse-Chase-Studien an Hepatocyten können wir jedoch erstmalig zeigen, daß die Synthese ApoE-haltiger nascenter HDL offensichtlich in intrazellulärem Zusammenhang mit dem Recycling von Apoprotein E sowie Cholesterol aus internalisierten TRL steht.

Aufgrund der späten Elution des LpE (Fraktion 29-32) ist davon auszugehen, daß es entweder eine geringe Dichte oder eine geringe Größe aufweist bzw. sowohl klein als auch dicht ist (s. Abbildung 11). Es könnte sich bei LpE um das bereits erwähnte γ-LpE (Huang et al. 1994) handeln. γ-LpE wird als ein sphärischer Partikel (12-16 nm) charakterisiert, der unverestertes Cholesterol der Zelle mit höherer Potenz als prä-β₁-Lp-AI aufnimmt und nachfolgend an α-HDL überträgt (Huang et al. 1994). Die angegebene γ-LpE-Größe von 12-16 nm spricht jedoch eher gegen eine Übereinstimmung beider Partikel, da in Fraktion 29-32 in der Regel Partikel mit einer Größe von < 8nm, wie z.B. prä-β₁-Lp-AI, eluieren (Koch 2000). Es lässt sich jedoch konstatieren, daß es sich bei der Wiederverwertung von TRL-Bestandteilen für die hepatische Genese von nascenter ApoE-haltiger HDL um eine neue Erkenntnis bezüglich des physiologischen Nutzens dieses Prozesses handelt.

5.4 Die Rolle Caveolins im zellulären Stoffwechsel von ApoE und Lipiden

Caveoline sind eine Familie von Membran-verankerten Proteinen, die mit Membran-Invaginationen, den Caveolae, assoziiert sind. Man unterscheidet Caveolae, als Triton-X-100-resistente, Sphingolipid- und Cholesterol-reiche Membrandomänen von Coated Pits, Clathrin-stabilisierten Plasmamembran-Invaginationen, die weniger Cholesterol und Phospholipide als der Rest der Plasmamembran enthalten (Okamoto 1998). Sowohl Caveolae als auch Coated pits werden mit der zellulären Aufnahme und Abgabe von Lipoproteinen in Verbindung gebracht. Bereits seit den Untersuchungen von Goldstein (1975) ist bekannt, daß sich LDL-Rezeptoren in coated pits sammeln und über diese internalisiert werden (Goldstein et Brown 1975). Die Rolle Caveolins im Lipoproteinstoffwechsel ist jedoch bis heute nicht abschließend geklärt. Es konnte nachgewiesen werden, daß Caveolin am Transport neu synthetisierten Cholesterols aus dem ER zu den Caveolae beteiligt ist, ohne

den Golgi-Apparat zu durchlaufen (Smart et al. 1996). Weiterhin wurde für Caveolin-1 eine Sekretion im Komplex mit Lipoprotein-Partikeln beschrieben (Liu et al. 1999). Diese Beobachtungen führten zu der Folgerung, daß es sich offensichtlich bei coated pits und Caveolae um zwei unterschiedliche vesikuläre Mechanismen handelt. Da es sich bei der hepatischen Aufnahme sowie Prozessierung von LDL und TRL ebenfalls um unterschiedliche intrazelluläre Stoffwechselwege handelt (Heeren et al. 1999) kam man zur Vermutung, eine Funktion Caveolins könne in der Internalisation von TRL bzw. im Recycling von TRL-Bestandteilen liegen.

Unsere Experimente mit immunfluoreszenzmarkiertem Cholesterol, ApoE und Caveolin sprechen dafür, daß Caveolin über andere intrazelluläre Pfade prozessiert wird, als die TRL bzw. deren Recycling-Remnants. In Immunfluoreszenz-Pulse-Chase-Experimenten, die mit einem ApoE-Recycling und Cholesterol-Efflux einhergehen, konnte keine intrazelluläre Kolo-kalisation zwischen Caveolin und ApoE/Cholesterol erkannt werden. Zwar wird der ApoE-Recycling-assoziierte Cholesterol-Efflux durch eine Sekretion von Caveolin begleitet (Abbildung 13), wir nehmen jedoch an, daß zwischen diesen Phänomenen kein direkter Zusammenhang besteht. Man könnte spekulieren, ob es durch ApoE-Recycling zur Sekretion anderer Partikel kommt, die mit Caveolin assoziiert sind. Anfängliche Beobachtungen, wonach die Caveolin-Sekretion durch zusätzliche Beigabe von HDL₃ zum Chase-Medium gehemmt würde, sprächen weiterhin eher für eine Konkurrenz dieser beiden Mechanismen. Diese Ergebnisse ließen sich zumindest vorerst nicht erhärten, die Caveolin-Abgabe scheint in Ab- sowie Anwesenheit von HDL₃ gleichermaßen stattzufinden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß unsere Untersuchungen gegen eine Beteiligung von Caveolae an der Internalisation von TRL sowie dem HDL-induzierten ApoE-Recycling sprechen.

6 Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit sollten die Zusammenhänge zwischen dem HDL-induzierten ApoE-Recycling und anderen Wegen des Lipoproteinmetabolismus untersucht werden, um Hinweise auf die physiologische Relevanz dieses noch unzureichend charakterisierten Mechanismus zu erhalten.

Es konnte zunächst festgestellt werden, daß es nach Internalisation von Triacylglyceridreichen Lipoproteinen (TRL) nicht nur zum Recycling von ApoE sondern auch zur Resekretion von TRL-Cholesterol kommt. Dieser Prozess wird durch Zugabe von HDL oder ApoA-I bzw. delipidierter HDL in das extrazelluläre Medium signifikant gesteigert und unterstützt die Vermutung von „Surface-Remnants“, also dem Recycling von ganzen Oberflächenbestandteilen der internalisierten TRL. Dabei kolokalisieren ApoE und markiertes TRL-Cholesterol intrazellulär in peripheren Endosomen. Das ApoE und TRL-Cholesterol finden sich nach dem Recycling vor allem in der HDL sowie in einem kleinen und dichten ApoE-haltigen Partikel, den wir als Lipoprotein E (LpE) bezeichnet haben. Nach Aufreinigung des Partikels mittels Immunoaffinitätschromatografie wurde radioaktives Cholesterol mit LpE assoziiert vorgefunden, d.h. LpE ist ein lipidarmes ApoE-haltiges Lipoprotein. Ferner konnte gezeigt werden, daß das ApoE-Recycling den Efflux von Cholesterol aus dem zellulären Lipid-Pool stimuliert. Dieser Prozess wird ebenfalls durch ApoA-I oder HDL stimuliert. Der zelluläre Cholesterol-Efflux führt bei Abwesenheit von HDL oder ApoA-I hauptsächlich zur Synthese des oben beschriebenen LpE. Nach HDL-Stimulation wird gleichermaßen LpE und ApoE-angereicherte HDL gebildet. Eine Beteiligung Caveolins im ApoE-Recycling kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

Mit diesen Studien wurde somit erstmalig die intrazelluläre Verknüpfung zwischen dem Metabolismus von TRL und der Generierung ApoE-haltiger HDL über das HDL-induzierte ApoE-Recycling beschrieben. Teile dieser Arbeit konnten im Journal of Biological Chemistry publiziert werden (Heeren et al. 2003).

Abkürzungen

α	Anti
ABCA1	ATP-binding-Cassette-Transporter-A1
ACAT	Acyl:Cholesterol Acyltransferase
Apo	Apolipoprotein
AS	Aminosäure
ATP	Adenylnukleotidtriphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
CM	Chylomikronen
cpm	Counts per minute
CR	Chylomikronen-Remnant
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetale calf serum
FPLC	Fast-Performance-Liquid-Chromatografie
GFP	Green fluorescent protein
HDL	High-density-lipoprotein
HL	Hepatische Lipase
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
HuH7	Humane-Hepatoma-7-(Zellen)
IDL	Intermediate-density-lipoprotein
kDa	Kilodalton
LCAT	Lecithin:Cholesterol Acyltransferase
LDL	Low-density-lipoprotein
LDLR	LDL-Rezeptor
LpL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-Rezeptor-related-Protein
LXR	Liver-X-Rezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
SR	Scavenger-Rezeptor
TRL	Triazylglyzerid-reiche Lipoproteine
VLDL	Very-low-density-lipoprotein
VLDLR	VLDL-Rezeptor

Internationale SI-Einheiten und Abkürzungen des Dudens wurden nicht aufgeführt.

Literaturverzeichnis

- Al-Haideri M, Goldberg IJ, Galeano NF, Gleeson A, Vogel T, Gorecki M, Sturley SL, Deckelbaum RJ (1997) Heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of apolipoprotein E-Triacylglyceride-rich lipoprotein particles: a major pathway at physiological particle concentrations. *Biochemistry* 36:12766-12772
- Anderson RG, Goldstein JL, Brown MS (1976) Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 2434-2438
- Arakawa R, Abe-Dohmae S, Asai M, Ito JI, Yokoyama S (2000) Involvement of caveolin-1 in cholesterol enrichment of high density lipoprotein during its assembly by apolipoprotein and THP-1 cells. *J Lipid Res* 41: 1952-1962
- Assmann G (Hrsg) (1982) *Lipidstoffwechsel und Atherosklerose*. Schattauer, Stuttgart
- Asztalos B, Zhang W, Roheim PS, Wong L (1997) Role of free apolipoprotein A-I in cholesterol efflux. Formation of pre-alpha-migrating high-density lipoprotein particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1630-1636
- Athanasopoulos T, Owen JS, Hassall DG, Dunckley MG, Drew J, Goodman J, Tagalakis AD, Riddell DR, Dickson G (2000) Intramuscular injection of a plasmid vector expressing human apolipoprotein E limits progression of xanthoma and aortic atheroma in apoE-deficient mice. *Hum Mol Genet* 17:2545-2551
- Aufenanger J, Kattermann R. *Lipid und Lipoproteinstoffwechsel* (1995) In: Greiling H, Gressner AM (Hrsg). *Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie*. Schattauer, Stuttgart S. 300-360
- Aulinkas TH, Oram JF, Biermann EL, Coetzee GA, Gevers W, van der Westhuyzen DR (1985) Retro-endocytosis of low density lipoprotein by cultured human skin fibroblasts. *Arteriosclerosis* 5:45-54
- Aulinkas TH, van der Westhuyzen DR, Bierman EL, Gevers W, Coetzee GA (1981) Retro-endocytosis of low density lipoprotein by cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 664:255-265
- Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RG, Xu S, Krieger M (1997) Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem* 272:13242
- Barrans A, Jaspard B, Barbaras R, Chap H, Perret B, Collet X (1996) Pre- β HDL: Structure and metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1300:73-85
- Basu SK, Goldstein JL, Brown MS (1983) Independent pathways for secretion of cholesterol and apolipoprotein E by macrophages. *Science* 219:871-873
- Basu SK, Ho YK, Brown MS, Bilheimer DW, Anderson RG, Goldstein JL (1982) Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J Biol Chem* 257: (16) 9788-95
- Beisiegel U, Heeren J. Lipoprotein lipase targeting of lipoproteins to receptors (1997) *Proc Nutr Soc* 56: 731-737
- Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8342-8346
- Beisiegel U, Weber W, Heeren J, Hilpert J (1995) Intracellular Consequences of Chylomicron Uptake. *Circulation* 92 (suppl.);1-691
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341: 162-164
- Beisiegel U (1992) Apolipoproteins as ligands for lipoprotein receptors. In: Rosseneu M (Hrsg) *Structure and function of apolipoproteins*. CRC Press, Boca Raton, USA. S. 269-294
- Beisiegel U (1995) Receptors for Triacylglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 6:117-122

- Bellosta S, Mahley RW, Sanan DA, Murata J, Newland DL, Taylor JM, Pitas RE (1995) Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. *J Clin Invest* 96:2170-2179
- Bernard D, Rodriguez A, Rothblat GH, Glick JM (1991) CAMP stimulates cholesteryl ester clearance to high density lipoproteins in J774 macro-phages. *J Biol Chem* 266:710–716
- Bielicki JK, McCall MR, Forte TM (1999) Apolipoprotein A-I promotes cholesterol release and apolipoprotein E recruitment from THP-1 macrophage-like foam cells. *J Lipid Res* 40: 85-92
- Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, Diedrich W, Drobnik W, Barlage S, Büchler C, Porsch-Özcürümez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G (1999) The gene encoding ATP binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 22:347–351
- Boisvert WA, Spangenberg J, Curtiss LK (1995) Treatment of severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 96(2):1118-1124
- Borensztajn J, Kotlar TJ (1990) Phospholipids as modulators of hepatic recognition of chylomicron remnants. Observations with emulsified lipoprotein lipids. *Biochem J* 269: 539-542
- Bortnick AE, Rothblat GH, Stoudt G, Hoppe KL, Royer LJ, McNeish J, Francone OL (2000) The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J Biol Chem* 275: 28634
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Bretscher MS, Munro S (1993) Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* 261:1280 –1281
- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J Jr, Hayden MR (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 22:336 –345
- Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47
- Bungert S, Molday LL, Molday RS (2001) Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. *J Biol Chem* 276: 23539-23546
- Calvo M, Enrich C (2000) Biochemical analysis of a caveolae enriched-plasma membrane fraction from rat liver. *Electrophoresis* 21, 3386-3395
- Castle CK, Pape ME, Marotti KR, Melchior GW (1991) Secretion of pre-beta-migrating apo A-I by cynomolgus monkey hepatocytes in culture. *J Lipid Res* 32:439-447
- Castle JD, Jamieson JD, Palade GE (1972) Radioautographic analysis of the secretory process in the parotid acinar cell of the rabbit. *J Cell Biol* 53:290-311
- Castro GR, Fielding CJ (1988) Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* 27: 25-29
- Castro GR, Fielding CJ (1984) Evidence for the distribution of apolipoprotein E between lipoprotein classes in human normocholesterolemic plasma and for the origin of unassociated apolipoprotein E (Lp-E). *J Lipid Res* 25: 58-67
- Chappell DA (1988) Pre-beta-very low density lipoproteins as precursors of beta-very low density lipoproteins. A model for the pathogenesis of familial dysbetalipoproteinemia (type III hyperlipoproteinemia). *J Clin Invest* 82:628-639
- Chen W, Silver DL, Smith JD, Tall AR (2000) Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1-mediated cholesterol efflux in macrophages. *J Biol Chem* 275:30794-30800
- Chen W, Sun Y, Welch C, Gorelik A, Leventhal A R, Tabas I, Tall AR (2001) Preferential ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux from late endosomes/lysosomes. *J Biol Chem* 276(47):43564-43569

- Choi SY, Komaromy MC, Chen J, Fong LG, Cooper AD (1994) Acceleration of uptake of LDL but not chylomicrons or chylomicron remnants by cells that secrete apoE and hepatic lipase. *J Lipid Res* 35(5):848-59
- Cohen J, Vega GL, Grundy SM (1999) Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Curr Opin Lipidol* 10:259-268
- Cooper AD (1997) Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J lipid Res* 38:2173-2192
- Cullen P, Cignarella A, Brennhansen B, Mohr S, Assmann G, von Eckardstein A (1998) Phenotype-dependent differences in apolipoprotein E metabolism and cholesterol homeostasis in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 101:1670-1677
- Cummings RD, Kornfeld S, Schneider WJ, Hobgood KK, Tolleshaug H, Brown MS, Goldstein JL (1983) Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 258: 15261-15273
- Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis (2000) *Curr Opin Lipidol* 11:243-251
- Danielsen EM, Hansen GH, Poulsen MD (1993) Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J Cell Biol* 120: 1347-56
- Davignon J, Cohn JS, Mabile L, Bernier L (1999) Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clin Chim Acta* 286(1-2):115-143
- de Knijff P, Havekes LM (1996) Apolipoprotein E as a risk factor for coronary heart disease: a genetic and molecular biology approach. *Curr Opin Lipidol* 7(2):59-63
- Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42: 1007-1017
- Duverger N, Ghalim N, Ailhaud G, Steinmetz A, Fruchart JC, Castro G (1993) Characterization of apoA-IV-containing lipoprotein particles isolated from human plasma and interstitial fluid. *Arterioscler Thromb* 13:126-132
- Fazio S, Babaev VR, Murray AB, Hasty AH, Carter KJ, Gleaves LA, Atkinson JB, Linton MF (1997) Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4647-4652
- Fazio S, Linton MF, Hasty AH, Swift LL (1999) Recycling of Apolipoprotein E in mouse liver. *J Biol Chem* 274: 8247-8253
- Fazio S, Major AS, Swift LL, Gleaves LA, Accad M, Linton MF, Farese RV Jr (2001) Increased atherosclerosis in LDL receptor-null mice lacking ACAT1 in macrophages. *J Clin Invest* 107(2):163-171
- Fazio S, Sanan DA, Lee YL, Ji ZS, Mahley RW, Rall SC Jr (1994) Susceptibility to diet-induced atherosclerosis in transgenic mice expressing a dysfunctional human apolipoprotein E(Arg 112,Cys142). *Arterioscler Thromb* 14(11):1873-1879
- Felts JM, Itakura H, Crane RT (1975) The mechanisms of assimilation of constituents of chylomicrons, very low density lipoproteins and remnants – anew theory. *Biochem Biophys Res Comm* 66: 1467-1475
- Fielding CJ et Fielding PE (2001) Cellular cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta* 1533(3):175-89
- Fielding CJ, Bist A, Fielding PE (1999) Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts. *Biochemistry* 38: 2506–2513
- Fielding CJ, Fielding PE (2001) Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv Drug Deliv Rev* 49(3): 251-264
- Fielding CJ, Fielding PE (1997) Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* 38:1503-1521
- Fielding CJ, Fielding PE (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 36:211-228
- Fielding PE, Fielding CJ (1991) Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system. In: Vance DE, Vance J (Hrsg) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier Press, Amsterdam, 427-459
- Fojo SS, Baggio G, Gabelli C, Higuchi K, Bojanovski M, Gregg RE, Brewer HB jr (1988) Apolipoprotein C-II deficiency: identification of a structural variant ApoC-II Padova. *Biochem Biophys Res Commun* 154(1):73-79
- Forte TM, Goth-Goldstein R, Nordhausen RW, McCall MR (1993) Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogenous nascent HDL particles. *J Lipid Res* 34:317-324

- Francis GA, Tsujita M, Terry TL (1999) Apolipoprotein A-I efficiently binds to and mediates cholesterol and phospholipid efflux from human but not from rat aortic smooth muscle cells. *Biochemistry* 38: 16315–16322
- Fraser R, Dobbs BR, Rogers GWT (1995) Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. *Hepatology* 21: 863-874
- Garcia A, Barbaras R, Collet X, Bogyo A, Chap H, Perret B (1996) High-density lipoprotein 3 receptor-dependent endocytosis pathway in a human hepatoma cell line (HepG2). *Biochemistry* 35: 13064
- Gianturco SH, Gotto AM Jr, Hwang SL, Karlin JB, Lin AH, Prasad SC, Bradley WA (1983) Apolipoprotein E mediates uptake of Sf 100-400 hypertriglyceridemic very low density lipoproteins by the low density lipoprotein receptor pathway in normal human fibroblasts. *J Biol Chem* 258(7): 4526-4533
- Gillotte KL, Zaiou M, Lund-Katz S, Anantharamaiah GM, Holvoet P, Dhoest A, Palgunachari MN, Segrest JP, Weisgraber KH, Rothblat GH, Phillips MC (1999) Apolipoprotein-mediated plasma membrane microsolubilization. Role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *J Biol Chem* 274:2021-2028
- Ginsberg HN (1995) Synthesis and secretion of apolipoprotein B from cultured liver cells. *Curr Opin Lipidol* 6:275-280
- Goldberg IJ, Kandel JJ, Blum CB, Ginsberg HN (1986) Association of plasma lipoproteins with postheparin lipase activities. *J Clin Invest* 78: 1523-1528
- Goldberg IJ, Merkel M (2001) Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry and molecular biology. *Front Biosci* 6: D388-D405
- Goldstein JL, Brown MS (1975) Lipoprotein receptors, cholesterol metabolism, and atherosclerosis. *Arch Pathol* 99(4):181-184
- Gotto AM jr, Pownall HJ, Havel RJ (1986) Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol* 128: 3-41
- Griffin BA, Packard CJ (1994) Metabolism of VLDL and LDL subclasses. *Curr Opin Lipidol* 5:200-206
- Gu X, Trigatti B, Xu S, Acton S, Babitt J, 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: 26338-26348
- Hammad SM, Steffansson S, Twal WO, Drake CJ, Fleming P, Remaley A, Brewer HB Jr, Argraves WS (1999) Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10158 –10163
- Hara H, Yokoyama S (1991) Interaction of free apolipoproteins with macrophages: formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J Biol Chem* 266: 3080-3086
- Heeren J, Beisiegel U (1999) Apoprotein recycling of Triacylglycerid-rich lipoproteins: a process controlled by exogenous HDL. *Atherosclerosis* 144:127
- Heeren J, Weber W, Beisiegel U (1999) Intracellular processing of endocytosed Triacylglyceride-rich lipoproteins comprise both recycling and degradation. *J Cell Sci* 112: 349-359
- Heeren J, Beisiegel U (2001) Intracellular metabolism of Triacylglyceride-rich lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 12:255-260
- Heeren J, Grewal T, Jäckle S, Beisiegel U (2001) Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J Biol Chem* 276: 42333-42338
- Heeren J, Niemeier A, Merkel M, Beisiegel U (2002) Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial Triacylglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J Mol Med* 80:576-584
- Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J* 7(13):4119-4127
- Herz J (1993) The LDL-receptor-related protein – portrait of a multifunctional receptor. *Curr Opin Lipidol* 4: 97-103
- Ho YY, Al-Haideri M, Mazzone T, Vogel T, Presley JF, Sturley SL, Deckelbaum RJ (2000) Endogenously expressed apolipoprotein E has different effects on cell lipid metabolism as compared to exogenous apolipoprotein E carried on

- Triacylglyceride-rich particles. *Biochemistry* 39: 4746-4754
- Hornick CA, Thouron C, DeLamatre JG, Huang J (1992) Triacylglycerol hydrolysis in isolated hepatic endosomes. *J Biol Chem* 267(5):3396-3401
- Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Maeda N, Assmann G (1994) A solely apolipoprotein E containing plasma lipoprotein with electrophoretic γ -mobility takes up cellular cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1834-1838
- Husemann J, Silverstein SC (2001) Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimers disease brain. *Am J Pathol* 158: 825-832
- Hussain MM, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Bakillah A (1996) Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim Biophys Acta* 1300: 151-170
- Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Rall SC Jr., Mahley RW (1984) Normalization of receptor binding of apolipoprotein E2. Evidence for modulation of the binding site conformation. *J Biol Chem* 259:7261-7267
- Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS (1994) The two receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4431-4435
- Iverius PH, Östlund-Lindquist AM (1976) Lipoprotein lipase from bovine milk: isolation procedure, chemical characterization and molecular weight analysis. *J Biol Chem* 251: 7791-7796
- Ji ZS, Brecht WJ, Miranda RD, Hussain MM, Innerarity TL, Mahley RW (1993) Role of heparane sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J Biol Chem* 268: 10160-10167
- Ji ZS, Lauer SJ, Fazio S, Bensadoun A, Taylor JM, Mahley RW (1994) Enhanced binding and uptake of remnant lipoproteins by hepatic lipase-secreting hepatoma cells in culture. *J Biol Chem* 269(18):13429-13436
- Ji ZS, Sanan DA, Mahley RW (1995) Intravenous heparinase inhibits remnant lipoprotein clearance from the plasma and uptake by the liver: in vivo role of heparane sulfate proteoglycans. *J Lipid Res* 36: 583-592
- Kane JP (1996) Structure and Function of the Plasma Lipoproteins and Their Receptors. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ (Hrsg). *Atherosclerosis and Coronary Disease*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia S. 89-103.
- Kita T, Brown MS, Bilheimer DW, Goldstein JL (1982) Delayed clearance of very low density and intermediate density lipoproteins with enhanced conversion to low density lipoprotein in WHHL rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(18): 5693-5697
- Klucken J, Büchler C, Orso E, Kaminski WE, Porsch-Özcürümez M, Liebisch G, Kapinsky M, Diedrich W, Drobnik W, Dean M, Allikmets R, Schmitz G (2000) ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:817-822
- Koch S (2000) Charakterisierung der Lipoproteine in humanem Liquor cerebrospinalis und Analyse der Lipoproteinrezeptoren in murinen neuronalen Primaerkulturen. *Biol. Diss. Universität Hamburg*.
- Krieger M, Herz J (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 63: 601-637
- Krieger M (1999) Charting the fate of the good cholesterol: identification and characterization of the high density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem* 68: 523-558
- Krieger M (2001) Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 108: 793-797
- Kristensen T, Moestrup SK, Gliemann J, Bendtsen L, Sand O, Sottrup-Jensen L (1990) Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor. *FEBS Lett* 276(1-2):151-155
- Kurzchiella TV, Parton RG (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 11: 424-431
- Kuusi T, Nikkilä EA, Virtanen I, Kinnunen PKJ (1979) Localization of the heparin-releasable lipase in situ in the rat liver. *Biochem J* 181: 245-246

- Langer C, Huang Y, Cullen P, Wiesenhütter B, Mahley RW, Assman G, von Eckardstein A (2000) Endogenous apolipoprotein E modulates cholesterol efflux and cholesteryl ester hydrolysis mediated by high-density lipoprotein-3 and lipid-free apolipoproteins in mouse peritoneal macrophages. *J Mol Med* 78:217-227
- Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani M-F, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G (1999) Molecular cloning of the human ATP binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 257:29-33
- Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wanfg X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF (1999) The Tangier disease gene product controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* 104:R25-R31
- Li Q, Yokoyama S (1995) Independent regulation of cholesterol incorporation into free apolipoprotein-mediated cellular lipid efflux in rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269:26216-26223
- Liang HQ, Rye KA, Barter PJ (1996) Remodelling of reconstituted high density lipoproteins by lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* 37:1962-1970
- Lin CY, Duan H, Mazzone T (1999) Apolipoprotein E-dependent cholesterol efflux from macrophages: kinetic study and divergent mechanisms for endogenous versus exogenous apolipoprotein E. *J Lipid Res* 40:1618-1626
- Lin G, Oram JF (2000) Apolipoprotein binding to protruding membrane domains during removal of excess cellular cholesterol. *Atherosclerosis* 149:359-70
- Lindholm EM, Palmer AM, Graham A (2001) Triacylglycerol-rich lipoproteins alter the secretion, and the cholesterol-effluxing function, of apolipoprotein E-containing lipoprotein particles from human (THP-1) macrophages. *Biochem J* 356:515-523
- Liscum L, Munn NJ (1999) Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1438: 19-37
- Liu P, Li WP, Machleidt T, Anderson RG (1999) Identification of Caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells. *Nat Cell Biol* 1(6):369-375
- Lombardi P, Mulder M, van der Boom H, Frants RR, Havekes LM (1993) Inefficient degradation of triacylglyceride-rich lipoprotein by HepG2 cells is due to a retarded transport to the lysosomal compartment. *J Biol Chem* 268: 26113-26119
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275
- Lucas M, Iverius PH, Strickland DK, Mazzone T (1997) Lipoprotein lipase reduces secretion of apolipoprotein E from macrophages. *J Biol Chem* 272(20):13000-13005
- Mahley RW, Huang Y (1999) Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol* 10: 207-217
- Mahley RW, Hussain MM (1991) Chylomicron and chylomicron remnant catabolism. *Curr Opin Lipidol* 2: 170-176
- Mahley RW, Ji ZS, Brecht WJ, Miranda RD, He D (1994) Role of heparan sulfate proteoglycans and the LDL receptor-related protein in remnant lipoprotein metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 737:39-52
- Mahley RW, Ji ZS (1999) Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 40:1-16
- Mahley RW, Weisgraber KH, Hussain MM, Greenman B, Fisher M, Vogel T, Gorecki M (1989) Intravenous infusion of apolipoprotein E accelerates clearance of plasma lipoproteins in rabbits. *J Clin Invest* 83: 2125-2130
- Mazzone T, Reardon C (1994) Expression of heterologous human apolipoprotein E by J774 macrophages enhances cholesterol efflux to HDL3. *J Lipid Res* 35:1345-1353
- Mazzone T (1996) Apolipoprotein E secretion by macrophages: its potential functions. *Curr Opin Lipidol* 7:303-310
- McFarlane AS (1958) Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 182:53
- McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL (2000) High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-

- binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4245-4250
- Miida T, Kawano M, Fielding CJ, Fielding PE (1992) Regulation of the concentration of pre high density lipoprotein in normal plasma by cell membranes and lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* 31:11112-11120
- Milne R, Theolis R Jr, Maurice R, Pease RJ, Weech PK, Rassart E, Fruchart JC, Scott J, Marcel YL (1989) The use of monoclonal antibodies to localize the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B. *J Biol Chem* 264(33):19754-19760
- Musliner TA, Long MD, Forte TM, Nichols AV, Gong EL, Blanche PJ, Krauss RM (1991) Dissociation of high density lipoprotein precursors from apolipoprotein B-containing lipoproteins in the presence of unesterified fatty acids and a source of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 32: 917-933
- Myers JN, Tabas I, Jones NL, Maxfield FR (1993) Beta-very low density lipoprotein is sequestered in surface-connected tubules in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol* 123: 1389-1402
- Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M, Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr (2001) Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem* 276: 27584-27590
- Neville DM Jr (1971) Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J Biol Chem* 246(20):6328-6334.
- Niemeier A, Gafvels M, Heeren J, Meyer N, Angelin B, Beisiegel U (1996) VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J Lipid Res* 37: 1733-1742
- Okamoto CT (1998) Endocytosis and transcytosis. *Adv Drug Deliv Rev* 29(3):215-228
- Olivecrona G, Olivecrona T (1995) Triacylglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 6: 291-305
- Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G, Ostergaard P, Liu G, Chevreuril O, Hultin M (1993) New aspects on heparin and lipoprotein metabolism. *Haemostasis* 23 Suppl 1: 150-160
- Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP (2000) ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem* 275: 34508-34511
- Oram JF, Yokoyama S (2000) Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res* 37: 2473-91
- Oram JF (2002) ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* 13: 373-381
- Pepe MG, Curtiss LK (1986) Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL-In. *J Immunol* 136:3716-3723
- Rader D, Jaye M (2000) Endothelial lipase: a new member of the Triacylglyceride lipase gene family. *Curr Opin Lipidol* 11:141-148
- Rensen PC, Jong MC, van Vark LC, van der Boom H, Hendriks WL, van Berkel TJC, Biessen EAL, Havekes LM (2000) Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for Retroendocytosis. *J Biol Chem* 275:8564-8571
- Rodrigueza WV, Thuahnai ST, Temel RE, Lund-Katz S, Phillips MC, Williams DL (1999) Mechanism of scavenger receptor class B type-I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells. *J Biol Chem* 274: 20344-20350
- Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J (1998) Inducible Inactivation of Hepatic LRP Gene by Cre-mediated Recombination Confirms Role of LRP in Clearance of Chylomicron Remnants. *J Clin Invest* 101: 689-695
- Ross AC, Zilversmit DB (1977) Chylomicron remnant cholesteryl esters as the major constituent of very low density lipoproteins in plasma of cholesterol-fed rabbits. *J Lipid Res* 18:169-181
- Rothblat GH, de la Llera Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC (1999) Cell cholesterol efflux:

- integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res* 40:781–796
- Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denefle P, Brewer HB jr (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 22: 352–255
- Santamarina-Fojo S, Remaley AT, Neufeld EB, Brewer HB Jr (2001) Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J Lipid Res* 42: 1339-1345
- Santamarina-Fojo S (1992) Genetic Dyslipoproteinemias: Role of Lipoprotein Lipase and Apolipoprotein C-II. *Curr Opin Lipidol* 3:186-195
- Schmitz G, Assmann G, Robenek H, Brennhause B (1985) Tangier disease: a disorder of intracellular membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:6305-6311
- Schmitz G, Langmann T (2001) Structure, function and regulation of the ABC1 gene product. *Curr Opin Lipidol* 12: 129-140
- Schmitz G, Robenek H, Lohmann U, 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: 613-622
- Schneider WJ, Nimpf J, Bujo H (1997) Novel members of the low density lipoprotein receptor superfamily and their potential roles in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 8: 315-319
- Schwartz CC, Berman M, Vlahcevic ZR (1978) Multicompartmental analysis of cholesterol metabolism in man. Characterization of the hepatic bile acid and biliary cholesterol precursor sites. *J Clin Invest* 61: 408-423
- Schwartz CC, Halloran LG, Vlahcevic ZR, Gregory DH, Swell L (1978) Preferential utilization of free cholesterol from high-density lipoproteins for biliary cholesterol secretion in man. *Science* 200: 62-64
- Shore VG, Shore B (1973) Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 12: 502-507
- Silver DL, Tall AR (2001) The cellular biology of scavenger receptor class B type I. *Curr Opin Lipidol* 12: 497-504
- Silver DL, Wang N, Tall AR (2000) Defective HDL particle uptake in ob/ob hepatocytes causes decreased recycling, degradation, and selective lipid uptake. *J Clin Invest* 105: 151
- Silver DL, Wang N, Xiao X, Tall AR (2001) HDL particle uptake mediated by SR-BI results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J Biol Chem* 276: 25287-25293
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572
- Smart EJ, Ying YS, Donzell WC, Anderson RGW (1996) A Role for Caveolin in Transport of Cholesterol from Endoplasmic Reticulum to Plasma Membrane. *J Biol Chem* 271: 29427-29435
- Sprecher DL, Taaam L, Gregg RE, Fojo SS, Wilson DM, Kashyap ML, Brewer jr HB (1988) Identification of an apoC-II variant (apoC-II(Bethesda)) in a kindred with apoC-II deficiency and type I hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res* 29(3): 273-278
- Strittmatter WJ et Hill CB (2002) Molecular biology of apolipoprotein E. *Curr Opin Lipidol* 13:119-123
- Swift LL, Farkas MH, Major AS, Valyi-Nagy K, Linton MF, Fazio S (2001) A Recycling Pathway for Resecretion of Internalized Apolipoprotein E in Liver Cells. *J Biol Chem* 276: 22965-22970
- Tabas I, Lim S, Xu XX, Maxfield FR (1990) Endocytosed beta-VLDL and LDL are delivered to different intracellular vesicles in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol* 111:929-940
- Tabas I, Myers JN, Innerarity TL, Xu XX, Arnold K, Boyles J, Maxfield FR (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* 115:1547-1560
- Takahashi Y, Smith JL (1999) Cholesterol efflux to apolipoprotein A-I involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11358-11363
- Tall AR, Jiang XC, Luo Y, Silver D (2000) George Lyman Duff Memorial Lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism and

- atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1185–1188
- Thorngate FE, Rudel LL, Walzem RL, Williams DL (2000) Low levels of extrahepatic nonmacrophage ApoE inhibit atherosclerosis without correcting hypercholesterolemia in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1939-1945
- Thuren T (2000) Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol* 11:277–284
- Trigatti B, Rigotti A, Krieger M (2000) The role of high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol* 11: 123–132
- van Tol A, van Berkel TJ (1980) Uptake and degradation of rat and human very low density (remnant) apolipoprotein by parenchymal and non-parenchymal rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* 619(1):156-166
- von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G (1994) Physiological role and clinical relevance of high density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 5:404-416
- von Eckardstein A (1996) Cholesterol efflux from macrophages and other cells. *Curr Opin Lipidol* 7:308-319
- von Eckardstein A, Huang Y, Kastelein JJP, Geisel J, Réal J, Miccoli R, Nosedà G, Kuivenhoven JA, Assmann G (1998) Lipid-free apolipoprotein (apo) A-I is converted into alpha-migrating high density lipoproteins by lipoprotein depleted plasma of normolipidemic donors and apoA-I-deficient patients but not of Tangier disease patients. *Atherosclerosis* 138:25–34
- von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G (2001) High Density Lipoproteins and Arteriosclerosis. Role of Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 13-27
- Weisgraber KH (1994) Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* 45: 249-302
- Williams DL, Dawson PA, Newman TC, Rudel LL (1985) Synthesis of apolipoprotein E by peripheral tissues. Potential functions in reverse cholesterol transport and cellular cholesterol metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 454:222-229
- Willnow TE, Sheng Z, Ishibashi S, Herz J (1994) Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science* 264: 1471-1474
- Wilson HM, Patel JC, Russell D, Skinner ER (1993) Alterations in the concentration of an apolipoprotein E-containing subfraction of plasma high-density-lipoprotein in coronary heart-disease. *Clin Chim Acta* 220:175-187
- Wong L (1989) Contribution of endosomes to intrahepatic distribution of apolipoprotein B and apolipoprotein E. *J Cell Physiol* 141(2):441-452
- Zaiou M et Arnold KS (2000) Apolipoprotein E-low density lipoprotein receptor interaction : Influences of basic residue and amphipathic-helix organization in the ligand. *J Lipid Res* 41: 1087-1095
- Zannis VI et Breslow JL (1981) Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochemistry* 20:1033-1041
- Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468-471
- Zhao Y, Marcel YL (1996) Serum albumin is a significant intermediate in cholesterol transfer between cells and lipoproteins. *Biochemistry* 35:7174-7180
- Zhu Y, Bellosta S, Langer C, Bernini F, Pitas RE, Mahley RW, Assmann G, von Eckardstein A (1998) Low-dose expression of a human apolipoprotein E transgene in macrophages restores cholesterol efflux capacity of apolipoprotein E-deficient mouse plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13):7585-7590
- Zsigmond E, Scheffler E, Forte TM, Potenz R, Wu W, Chan L (1997) Transgenic mice expressing human lipoprotein lipase driven by the mouse metallothionein promoter. A phenotype associated with increased perinatal mortality and reduced plasma very low density lipoprotein of normal size. *J Biol Chem* 272:1921-1933

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel für die Überlassung des Themas, für ihre Förderung und Betreuung.

Bei Dr. Jörg Heeren bedanke ich mich für seine Anleitung und Hilfestellung in allen Phasen dieser Arbeit.

Ich danke weiterhin allen anderen Mitarbeitern des Labors gleichermaßen für Ihre Unterstützung.

Bei der DFG bedanke ich mich für die Förderung durch das Graduiertenkolleg 336 „Molekulare Endokrinologie und Stoffwechsel“.

Mein Dank gilt schließlich in besonderer Weise meinen Eltern.

Lebenslauf

Name	Daniel Rottke
Geburtsdatum	21.10.1979
Geburtsort	Hamburg
Nationalität	Deutsch
Eltern	Bernhard Rottke Karin Rottke geb. Becker
Familienstand	Ledig
Schulausbildung	Einschulung im Sommer 1985 Gymnasium Bondenwald, Hamburg ab Sommer 1989 Abitur im Sommer 1998, Hamburg
Medizinstudium	12 Semester: Oktober 1998 bis Oktober 2004 10 Semester an der Universität Hamburg 2 Semester (PJ) an der Humboldt-Universität Berlin Chirurgie-PJ am New-York-University-Medical Center, New York. 3. Staatsexamen April 2005 in Berlin
Dissertation	Juli 2001 bis März 2003 im Labor von Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel, UKE, Hamburg. Gefördert durch ein Stipendium der DFG im Graduiertenkolleg 336 „Molekulare Endokrinologie und Stoffwechsel“.

Eidesstattliche Versicherung

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