

Einfluss der
Apolipoprotein E-Isoformen auf den
Lipidstoffwechsel muriner neuronaler Zellen
(*Mus musculus*)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Lars Rellin
aus Hamburg

Hamburg
2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. Konrad Wiese
Tag der Disputation: 27. Oktober 2006

Hamburg, den 13. Oktober 2006



A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. Lieberei".

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1. Einleitung	3
<hr/>	
1.1. Cholesterolhomeostase des Gehirns	3
1.2. Lipoproteine	10
1.3. Apolipoprotein E	17
1.4. Lipoproteinrezeptoren im Gehirn	21
1.5. Apolipoprotein E-Recycling	29
1.6. Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP)	34
Ziel der Arbeit	37
2. Material und Methoden	38
<hr/>	
2.1. Zellbiologische Arbeiten	38
2.1.1. Zellkultur	38
2.1.2. Gewinnung von Zell-Lysaten	40
2.1.3. Immunhistochemie	40
2.2. Isolierung und Präparation der Liganden	44
2.2.1. Isolierung von Gesamt-HDL aus humanem Spenderblut	44
2.2.2. Isolierung von Apo E-freier HDL	47
2.2.3. Anreicherung von HDL mit den Apo E-Isoformen	48
2.2.4. Anreicherung von HDL mit radioaktiv markiertem Apo E3 und E4	49
2.2.5. Herstellung von Apo E-haltigen „HDL-ähnlichen“ Liposomen	50
2.2.6. Gelfiltrationschromatographie von Lipoproteinen (FPLC)	50
2.3. Analytische Methoden	52
2.3.1. Proteinbestimmung	52
2.3.2. Cholesterolbestimmung	53
2.3.3. Triglyzeridbestimmung	54
2.3.4. Phospholipidbestimmung	55
2.3.5. Apo E-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	55
2.4. Proteinchemische Methoden	56

2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	56
2.4.2. Proteinfärbung im Polyacrylamidgel (Coomassie Färbung)	58
2.4.3. Elektrobplot-Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen und anschliessende Immundetektion (Western Blot)	58
2.4.4. Densitometrische Auswertung von Western-Blots	59
2.5. Untersuchungen zum intrazellulären Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen	60
2.5.1. Aufnahme von HDL-assoziiertem Apo E3 und E4 in neuronale Zellen	60
2.5.2. Recycling von HDL-assoziierten Apo E3 und E4 in neuronalen Zellen	61
2.5.3. Cholesterolefflux aus neuronalen Zellen	63
2.6. Untersuchungen des Einflusses des Apo E-Recyclings auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) in neuronalen Zellen	65
2.6.1. APP-Expression und Prozessierung in HT-22 Zellen	65
2.6.2. Cholesterolsensitivität der APP-Prozessierung	65
2.6.3. APP-Prozessierung in Gegenwart von Apo E3 und E4-angereicherter HDL	66
3. Ergebnisse	68
<hr/>	
3.1. Auswahl und Charakterisierung des Zellsystems	68
3.1.1. Die untersuchten Zell-Linien	69
3.1.2. Lipoproteinrezeptoren	70
3.1.3. Funktionalität der Lipoproteinrezeptoren	73
3.1.4. Neuronale Marker	74
3.2. Präparation und Charakterisierung der Modell-Liganden	75
3.2.1. Präparation und Charakterisierung von Plasma-HDL	76
3.2.2. Affinitätschromatographische Präparation Apo E-freier HDL	80
3.2.3. Charakterisierung radioaktiver Liganden	81
3.3. Aufnahme von Apo E3 und Apo E4 in HT-22 Zellen	85
3.3.1. Immunhistochemische Untersuchung der Apo E3 und Apo E4-Aufnahme	86
3.3.2. Radiochemische Untersuchung der Apo E3 und Apo E4-Aufnahme und Bindung	87
3.4. Apo E-Recycling in HT-22 Zellen	90
3.4.1. Radiochemische Untersuchung des Apo E-Recyclings	90
3.4.2. Proteinchemische Untersuchung des Apo E-Recyclings	92
3.5. Cholesterolefflux aus HT-22 Zellen	94

3.5.1. Radiochemische Untersuchung zum Cholesterol-Efflux mit HDL-assoziiertem Apo E	95
3.5.2. Radiochemische Untersuchung zum Cholesterol-Efflux mit Liposomen-assoziiertem Apo E	97
3.6. Einfluss der Apo E-Isoform auf die APP-Prozessierung in HT-22 Zellen	100
3.6.1. APP-Prozessierung in HT-22 Zellen	101
3.6.2. Cholesterol und APP-Prozessierung in HT-22 Zellen	102
3.6.3. Apo E und APP-Prozessierung in HT-22 Zellen	105
4. Diskussion	107
<hr/>	
4.1. Auswahl und Charakterisierung des Zellsystems	107
4.2. Präparation und Charakterisierung der Modell-Liganden	110
4.3. Einfluss der Apolipoprotein E-Isoformen auf den Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen	113
4.3.1. Bindung und Aufnahme von Apo E3 und Apo E4	113
4.3.2. Apo E-Recycling in HT-22 Zellen	115
4.3.3. Cholesterol-Efflux aus HT-22 Zellen	117
4.4. Apo E und APP Prozessierung in HT-22-Zellen	120
Zusammenfassung	123
Abbildungsverzeichnis	124
Literatur	126
Danksagung	140

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
ABCA1	ATP-binding Cassette A1
ABCG1	ATP-binding Cassette G1
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Apo	Apolipoprotein
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
APS	Ammonium Persulfat
Bp	Basenpaare
CETP	Cholesterylestertransferprotein
CPM	Counts per Minute
CSF	Liquor cerebrospinalis, Hirnflüssigkeit
CSF-Lp	Liquor-Lipoprotein
CYP46	24S-Cholesterol-Hydroxylase
d	Durchmesser
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DAPT	(N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	Fötales Rinderserum
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA	Hydroxamethylglutaryl-CoA
HSPG	Heparansulfat Proteoglykane
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
KDa	Kilo-Dalton
KBr	Kaliumbromid
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptor

LPDS	Lipoprotein-defizientes Serum
LRP	Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein
LRP1	Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1
LXR	Liver X Receptor
m	Masse
MAP2c	Microtubule-associated Protein 2c
mRNA	Messenger RNA
MBTPS1	Membrane bound Transcription Factor Protease, Site 1 (Protease)
MEGF7	Multiple Epidermal Growth Factor-like Domains 7
Murin	Aus der Maus (<i>Mus musculus</i>)
PBS	Phosphate Buffered Saline
RAP	Receptor-associated Protein
SCAP	SREBP Cleavage-activating Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SorLA	Sorting Protein-related Receptor containing LDLR Class A Repeats
SREPB	Sterol Regulatory Element Binding Protein
Tab.	Tabelle
TRL	Triglyzeridreiche Lipoproteine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VLDL-R	VLDL-Rezeptor
Vergl.	Vergleiche
WB	Western Blot

1. Einleitung

Da sich die vorliegende Arbeit mit ausgewählten Aspekten der neuralen Lipidhomeostase beschäftigt, soll in diesem ersten Teil ein allgemeiner Überblick über die Cholesterolumhomeostase des Gehirns gegeben werden. Anschließend erfolgt die detaillierte Vorstellung einiger der beteiligten Akteure, wie der Lipoproteine, dem Apolipoprotein E sowie den Lipoproteinrezeptoren. Abschließend wird prägnant auf die intrazelluläre Prozessierung des wichtigsten neuralen Apolipoproteins, dem Apolipoprotein E, eingegangen. Die dargelegten Fakten und Modelle geben die theoretischen Grundlagen für die Darstellung der Ergebnisse.

1.1. Cholesterolumhomeostase des Gehirns

Obwohl die Masse des menschlichen Gehirns lediglich 2% des Körpergewichtes ausmacht, enthält es doch etwa 23% des gesamten im Körper befindlichen Cholesterols (Dietschy and Turley, 2004). Der größte Teil davon liegt unverestert vor (>99,5%) und ist auf zellulärer Ebene im wesentlichen in zwei Bereichen lokalisiert. Etwa 70% des Cholesterols findet sich im Myelin, welches die elektrische Isolation der neuralen Axone gewährleistet und im Zentralnervensystem von den Oligodendrozyten gebildet wird. Die restlichen 30% sind in den Plasmamembranen von Astrozyten und Neuronen zu finden (Snipes and Suter, 1997; Muse et al., 2001).

Cholesterolsynthese

Nahezu das gesamte Cholesterolum wird im Gehirn lokal synthetisiert, d.h. es kommt zu fast keinem Austausch mit dem lipoproteinassozierten Cholesterolum im Plasma, da dies effektiv durch die Blut-Hirn-Schranke verhindert wird (Chobanian and Hollander, 1962; Edmond et al., 1991; Jurevics and Morell, 1995). Gleichzeitig gibt es einen effizienten Apolipoprotein-abhängigen Recyclingmechanismus für das Cholesterolum im Gehirn, welcher wiederum nur einen geringen Verlust an den Blutkreislauf zulässt (Bjorkhem and Meaney, 2004). Dieser Recyclingprozess ermöglicht eine Halbwertszeit für den Großteil des neuronalen Cholesterols von bis zu 5 Jahren (Bjorkhem et al., 1998; Bjorkhem et al., 1999).

Cholesterolexkretion

Die Exkretion überschüssigen Cholesterols aus dem Gehirn erfolgt über seine enzymatische Konvertierung zu 24S-Hydroxy-Cholesterolum, welches hydrophilere Eigenschaften besitzt und auf bisher ungeklärte Weise in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Bjorkhem et al., 1999). Über den Blutkreislauf gelangt es in die Leber, wird zur Hälfte zu Gallensäure

umgesetzt und schließlich über die Galle ausgeschieden. Die andere Hälfte wird sulfatiert oder glukoronidiert und ebenfalls mit der Galle ausgeschieden (Bjorkhem et al., 2002).

Cholesterolhomeostase während der cerebralen Entwicklung

Während der Cholesterolgehalt des adulten Gehirnes bei den meisten Spezies nahezu konstant ist, variiert er doch stark bei der Entwicklung vom juvenilen zum adulten Individuum. Perinatal liegt der Cholesterolgehalt des humanen Gehirnes bei etwa 6 mg/g und erreicht beim jungen Erwachsenen einen Wert von 23 mg/g. Diese Zunahme des Cholesterolgehaltes ist auf die fortschreitende Myelinisierung der Neurone zurückzuführen, welche postnatal stark zunimmt (Dietschy et al., 2004). Gleichzeitig ist die Plasmakonzentration von 24S-Hydroxy-Cholesterol im juvenilen Organismus erhöht, welches auf den verstärkten Cholesterolumsatz im sich entwickelnden Gehirn und die möglicherweise größere Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen ist (Bjorkhem et al., 1999). Im adulten Individuum stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein, bei welchem trotz der hohen basalen metabolischen Aktivität des Gehirnes, pro Tag lediglich 0,03% des lokalen Cholesterols umgesetzt werden. Im Vergleich dazu ist die Metabolisierungsrate des gesamten körpereigenen Cholesterols um den Faktor 20 höher und liegt bei etwa 0,7% pro Tag (Dietschy and Turley, 2001).

Aus diesen Fakten wird deutlich, dass das Gehirn in Bezug auf die Cholesterolhomeostase ein weitgehend isoliertes und gut reguliertes System darstellt, welches die funktionelle und zelluläre Integrität des Organs gewährleistet.

Cholesterolhomeostase auf zellulärer Ebene

Auf zellulärer Ebene stellt sich die Cholesterolhomeostase des Gehirns wie folgt dar (vergl. Abb. 1, Seite 9): Wie bereits erwähnt, ist für die Trennung des Gehirn- vom Plasmacholesterolstoffwechsel die Blut-Hirn-Schranke verantwortlich. Diese wird von den untereinander mit *tight junctions* verbundenen Endothelzellen der lokalen Blutgefäße gebildet. Stoffe, welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden wollen, müssen daher die apikale sowie die basolaterale Plasmamembran der Endothelzelle passieren, um vom Lumen des Blutgefäßes in das Interstitium oder umgekehrt zu gelangen. Diese Membranen sind frei permeabel für Wasser, aber auch in begrenztem Maße für 24S-Hydroxy-Cholesterol, so dass ein Efflux dieses Cholesterol-Metaboliten möglich ist (Bjorkhem et al., 1999). Die Endothelzellen exprimieren zwar mRNAs von potentiellen Cholesteroltransportern, wie ABCA1 (ATP-binding cassette subfamily A member 1), SR-BI (Scavenger receptor class B member 1) (Panzenboeck et al., 2002) und dem LDL-Rezeptor (Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor). Es konnte jedoch in verschiedenen *in vivo* Untersuchungen bisher kein Influx von

Cholesterol über Plasma-Lipoproteine (Low-Density-Lipoproteine (LDL) bzw. High-Density-Lipoproteine (HDL)), durch passiven Transport oder die selektive Aufnahme von Plasmacholesterol über die Cholesteroltransporter gezeigt werden (Dietschy *et al.*, 2004). Der überwiegende Teil des Cholesterols im adulten Gehirn resultiert demnach aus lokaler Synthese.

Zelluläre Cholesterolsynthese

Für die Synthese sind in erster Linie die Oligodendrozyten verantwortlich, gefolgt von den Astrozyten und nur in geringem Maße die Neurone. Die Oligodendrozyten und Astrozyten gehören zur großen Gruppe der Gliazellen, welches ein Sammelbegriff für die strukturell und funktionell von den Neuronen abgrenzbaren Zellen im Nervengewebe ist. **Oligodendrozyten** bilden die elektrische Isolation (Myelin) der Axone der Neurone und entsprechen den Schwannschen Zellen der peripheren Nerven. Sie können jedoch mehrere Axonabschnitte verschiedener Neurone gleichzeitig umwickeln. Astrozyten bilden die Mehrheit der Gliazellen im Säugetiergehirn. Es sind sternförmig verzweigte Zellen, die Grenzmembranen zur Gehirnoberfläche (Pia mater) und den Blutgefäßen bilden. Sie sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Elektrolythaushaltes des Gehirns beteiligt und versorgen die Neurone mit Nährstoffen. Die **Neurone** sind die auf Erregungsleitung spezialisierten Zellen des Gehirns. Sie sind aus einem Zellkörper (Soma), welcher den Zellkern und die Zellorganellen (Mitochondrien, raues und glattes Endoplasmatisches Retikulum) enthält, den Dendriten und dem Axon aufgebaut. Über Synapsen stehen sie in Kontakt mit anderen Neuronen. Sie stellen hochspezialisierte Zellen dar, die für die Aufrechterhaltung ihrer Funktionsfähigkeit auf die Unterstützung der Gliazellen angewiesen sind.

In vitro Experimente haben gezeigt, dass die Astrozyten eine etwa zwei- bis dreifach höhere Cholesterolsynthese-Kapazität haben als Neurone, welche aber noch von den Oligodendrozyten übertroffen wird (Saito *et al.*, 1987; Bjorkhem *et al.*, 2004). Die Cholesterolsynthese im Gehirn ist, wie bereits beschrieben, starken Schwankungen während der einzelnen Entwicklungsphasen des Individuums unterworfen. Im juvenilen Gehirn treiben die Oligodendrozyten die Myelinisierung voran und haben eine entsprechend hohe Cholesterolsyntheserate (Dietschy *et al.*, 2004). Sie können pro Tag bis zum Dreifachen des eigenen Gewichtes an Myelin produzieren (Bjorkhem *et al.*, 2004). Während der Embryonalentwicklung produzieren auch die Neurone noch signifikante Mengen Cholesterol. Postnatal scheinen sie diese energieaufwendige Stoffwechselaktivität jedoch einzustellen, um sich auf die Erregungsleitung zu fokussieren. Die Synaptogenese ist dann von der Zufuhr astrozytären Cholesterols abhängig (Mauch *et al.*, 2001; Pfrieger, 2003). Im adulten Gehirn sinkt die Cholesterolsyntheserate schließlich auf ein basales Niveau, wobei sie lokal unter bestimmten Umständen auch wieder ansteigen kann, z.B. bei Nervenzellschädigungen.

Hauptproduzenten des benötigten Cholesterols sind aber auch dann die Gliazellen (Dietschy *et al.*, 2004). Oligodendrozyten und Astrozyten generieren Cholesterol über viele Zwischenstufen aus Acetyl-CoA, wobei die HMG-CoA Reduktase Schlüsselenzym dieser Synthese ist. Sie katalysiert die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat und wird komplex reguliert. Ihre Aktivität verhält sich invers zum intrazellulären Cholesterolspiegel. Ist dieser hoch, so wird die Aktivität des Enzyms gehemmt. Dies geschieht über vier Mechanismen: 1. Direkte negative Rückkopplungshemmung durch Cholesterol und seine Vorstufe Lanosterol, 2. Phosphorylierung und Dephosphorylierung über die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), 3. Proteindegradation über cholesterolsensitive Ubiquitylierung sowie 4. transkriptionell durch Transkriptionsfaktoren, die unter Mitwirkung von SCAP (SREBP cleavage activating protein) durch MBTPS1 proteolytisch aus SREBPs (sterol regulatory element binding protein) gewonnen werden. SCAP ist inaktiv, wenn es Cholesterol gebunden hat. Die Hemmung dieses Schlüsselenzymes ist auch von pharmakologischem Interesse. So ist es Angriffspunkt für eine Gruppe von cholesterolsenkenden Medikamenten, den Statinen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die HMG-CoA Reduktase auch in Gliazellen das Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese ist (Snipes *et al.*, 1997) und sich durch Cholesterolüberschuß hemmen lässt (Bjorkhem *et al.*, 2004).

Cholesteroltransport im Liquor cerebrospinalis und Aufnahme in die Zielzellen

Der Transport des synthetisierten Cholesterols von den Astrozyten zu den Neuronen erfolgt über Lipoproteinpartikel in der Hirnflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis, CSF) (eine detaillierte Beschreibung dieser Lipoproteine erfolgt in Abschnitt 1.2.). Diese Liquor-Lipoproteinpartikel setzen sich aus einem Lipid- und einem Proteinanteil (Apolipoprotein) zusammen, wobei der Lipidanteil durch Phospholipide und Cholesterol gebildet wird (LaDu *et al.*, 1998; Koch *et al.*, 2001). Das wichtigste Apolipoprotein im Zentralnervensystem ist das Apolipoprotein E (Apo E). Es wird von den Astrozyten synthetisiert und in Form von kleinen Lipoproteinen hoher Dichte sezerniert (Boyles *et al.*, 1985; Shanmugaratnam *et al.*, 1997; DeMattos *et al.*, 2001a; Gong *et al.*, 2002). Neurone sind unter normalen Stoffwechselbedingungen dagegen nicht in der Lage Apo E zu synthetisieren (Boyles *et al.*, 1985; Danik *et al.*, 1999). Eine neurale Apo E-Expression als Antwort auf Zellschädigungen ist jedoch nicht ausgeschlossen (Boschert *et al.*, 1999a; Dekroon and Armati, 2001; Xu *et al.*, 2006). Da es aber durch die Blut-Hirn-Schranke zu keinem Austausch mit Apo E aus dem Plasma kommt, ist nahezu das gesamte Apo E im Zentralnervensystem lokalen Ursprungs (Linton *et al.*, 1991). An der astrozytären Sekretion der Apo E-haltigen Liquor-Lipoproteine sind die Cholesteroltransporter ABCA1 und ABCG1 beteiligt, die vermutlich für die Beladung der Partikel mit Cholesterol verantwortlich sind (Bjorkhem *et al.*, 2004; Hirsch-Reinshagen *et al.*, 2004; Hirsch-Reinshagen *et al.*, 2005; Abildayeva *et al.*, 2006; Karten *et al.*, 2006). Die

sezernierten Liquor-Lipoproteinpartikel gelangen über die Hirnflüssigkeit zu den Neuronen und werden schließlich Apo E-vermittelt über Mitglieder der Low-Density-Lipoprotein-Rezeptorfamilie (LDL-R-Familie) aufgenommen (Fagan et al., 1996; DeMattos et al., 2001b). In Neuronen konnten verschiedene Mitglieder dieser Rezeptorfamilie identifiziert werden (Herz and Bock, 2002). Von besonderer Bedeutung für die Lipoproteinaufnahme in Neuronen scheint jedoch LRP1 (Low-density-lipoprotein receptor-related Protein 1) zu sein (Holtzman et al., 1995; Williams et al., 1998; Hayashi et al., 2004). Neuronen sind während der Synaptogenese, der Regeneration nach Zellschädigungen und zur Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität auf diese Zufuhr astrozytären Cholesterols angewiesen (Dietschy et al., 2004). Gleichzeitig müssen sie über einen effektiven Mechanismus zur Entfernung überschüssigen Cholesterols verfügen.

Zelluläre Cholesterolexkretion

Neurone können überschüssiges Cholesterol über die Umwandlung zu 24S-Hydroxy-Cholesterol entsorgen. Dieses Oxysterol wird von einer speziellen Isoform des Cytochrom P450, dem CYP46 gebildet, welches nur von Neuronen und nicht von Oligodendrozyten oder Astrozyten exprimiert wird (Lund et al., 1999). Das gebildete 24S-Hydroxy-Cholesterol kann auf bisher nicht geklärte Weise aus der Zelle ausgeschleust werden und gelangt aufgrund seiner veränderten physikochemischen Eigenschaften durch die Blut-Hirn-Schranke in den Blutkreislauf, um von der Leber zu Gallensäure umgesetzt und schließlich mit der Galle ausgeschieden zu werden (Bjorkhem et al., 1999). Neben der Exkretion scheint dem 24S-Hydroxy-Cholesterol noch eine regulatorische Funktion zuzukommen. 24S-Hydroxy-Cholesterol ist ein Ligand des Liver-X-Rezeptors (LXR), welcher zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren zählt. Die Isoformen LXR α und LXR β werden im Gehirn exprimiert (Whitney et al., 2002), und ihnen wird eine wichtige Rolle bei der Regulation der lokalen Cholesterolhomeostase zugesprochen. So konnte gezeigt werden, dass das in den Neuronen gebildete 24S-Hydroxy-Cholesterol in astrozytären Zellen über LXR den Apo E und ABCA1/ABCG1 mediierten Cholesterolefflux fördert. Ursache hierfür ist eine verstärkte Expression von Apo E, ABCA1 sowie ABCG1. Für Neurone trifft dies jedoch nicht zu (Abildayeva et al., 2006). Etwa 60% der Cholesterolexkretion aus dem Gehirn erfolgt über die Konvertierung zu 24S-Hydroxy-Cholesterol; die Mechanismen, die der Exkretion der restlichen 40% zugrunde liegen, sind noch unbekannt (Dietschy et al., 2001). Möglicherweise erfolgt die Cholesterolexkretion auch über die Sekretion überschüssigen Cholesterols mit Hilfe von Lipoproteinen (Raffai and Weisgraber, 2003). Neurone exprimieren ABCA1, einen Cholesteroltransporter, der in der Lage ist Apolipoproteine und nascente Lipoproteine mit Cholesterol zu beladen (Fukumoto et al., 2002; Wellington et al., 2002). Da Neurone aber unter normalen Bedingungen kein Apo E synthetisieren, sind sie auf eine Wiederverwendung

des mit den Liquor-Lipoproteinen aufgenommenen Apo E angewiesen. Ein solcher Wiederverwendungsprozess (Recycling) von Apo E konnte bereits für andere Zelltypen gezeigt werden (Heeren et al., 2006a). Die sekretierten Lipoproteine können dann über Rezeptoren der LDL-R-Familie von anderen Neuronen oder Astrozyten aufgenommen werden (Pitas et al., 1987a), wodurch sich der Cholesterolkreislauf im Gehirn schließen würde. Neben dem Apo E könnte auch das Apolipoprotein AI (Apo AI) als Cholesterolakzeptor fungieren. Es ist ebenfalls im Liquor cerebrospinalis nachweisbar (Koch et al., 2001), seine Herkunft ist jedoch weitgehend unbekannt. Es wird davon ausgegangen, dass es nicht im Gehirn synthetisiert wird (Elshourbagy et al., 1985a), sondern auf bisher unbekannte Weise die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und aus dem Blutkreislauf stammt. Möglicherweise erfolgt auch eine Synthese und Sekretion von den cerebrovaskulären Endothelzellen. Eine lokale Synthese ist jedoch nach dem derzeitigen Wissenstand nicht vollkommen ausgeschlossen (Fujii et al., 2002; Yang et al., 2005). Apo AI könnte mit dem zellulären Cholesterin beladen werden und es während der Zirkulation in der Hirnflüssigkeit an Apo E-haltige Liquor-Lipoproteine abgeben. Ein Hinweis dafür liefert die Anwesenheit von Apo AI in der humanen Hirnflüssigkeit, welche sowohl Apo AI als auch Apo E tragen (Koch et al., 2001). Ein weiteres Indiz für den Lipid- und Proteinaustausch zwischen den einzelnen Liquor-Lipoproteinen ist auch die Expression des Cholesterylester-Transfer-Proteins (CETP) durch Astrozyten (Albers et al., 1992; Yamada et al., 1995). CETP ist in der Lage diesen Austausch zu vermitteln. Alternativ könnte es jedoch auch zu einer Aufnahme von Apo AI-haltigen Liquor-Lipoproteinen durch Oligodendrocyten kommen, da diese Megalin (LRP2, gp330) exprimieren (Wicher et al., 2006), welches als Co-Rezeptor für Cubilin an der Aufnahme von Apo AI-haltigen Lipoproteinen beteiligt ist (Moestrup and Kozyraki, 2000). Überlappende Expressionsmuster von Cubilin und Megalin sind im Gehirn gefunden worden (Assemat et al., 2005). Sowohl der Katabolismus des Apo AI im Gehirn als auch die neurale Cholesterinsekretion mit Hilfe von Lipoproteinen ist zu diesem Zeitpunkt hypothetisch und experimentell noch nicht gezeigt worden.

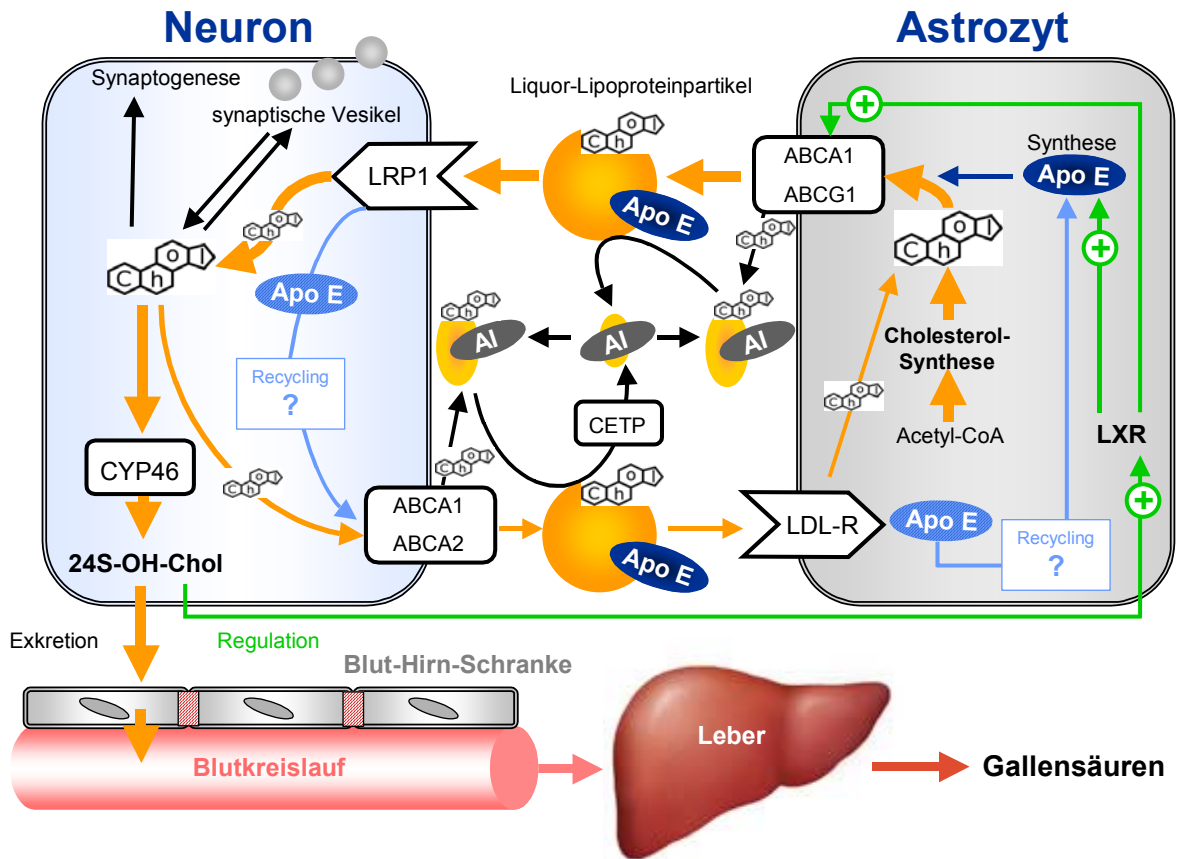


Abb. 1: Cholesterolhomeostase des Gehirns.

Die Cholesterolhomeostase des Gehirns stellt ein von der Plasmacholesterolhomeostase isoliertes System dar, bei dem die Blut-Hirn-Schranke effektiv den Influx von Plasmacholesterol unterbindet. Im adulten Gehirn sind Neurone prinzipiell zur Cholesterol-Biosynthese fähig, aus energetischen Gründen stellen sie diese Stoffwechselaktivität jedoch ein und nehmen exogen von den sie umgebenden Astrozyten gebildetes Cholesterol auf. Besonders während der Synaptogenese, nach Zellschädigungen und zur Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität bedürfen sie der Zufuhr zusätzlichen Cholesterols. Das Cholesterol wird über zahlreiche Zwischenstufen von den Astrozyten aus Acetyl-CoA gebildet. Ebenfalls astrozytär gebildetes Apolipoprotein E (**Apo E**) wird unter Mitwirkung der Cholesteroltransporter **ABCA1** und **ABCG1** mit Cholesterol beladen und in Form von Lipoproteinen sekretiert. Diese diffundieren durch den Liquor cerebrospinalis zu den Neuronen und werden über einen Lipoproteinrezeptor (vermutlich **LRP1**) endozytiert. Das Cholesterol gelangt in den intrazellulären Cholesterolspeicher und steht für zahlreiche Verwendungen zur Verfügung (Bildung von sekretorischen Vesikeln, Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität etc.). Die Exkretion überschüssigen Cholesterols erfolgt hauptsächlich über seine Konvertierung zu 24S-Hydroxy-Cholesterol (**24S-OH-Chol**). Dies geschieht mit Hilfe einer neural exprimierten Isoform des Cytochrom P450, dem **CYP 46**. 24S-Hydroxy-Cholesterol kann die Bluthirnschranke überwinden, gelangt über den Blutkreislauf in die Leber und wird nach der Umwandlung in Gallensäuren mit der Galle ausgeschieden. 24S-Hydroxy-Cholesterol hat jedoch auch eine regulatorische Funktion. Es verstärkt über den nukleären Hormonrezeptor **LXR** (Liver-X-Rezeptor) die Expression von Apo E sowie ABCA1/ABCG1 und stimuliert damit die astrozytäre Cholesterolsekretion. Ein Teil des überschüssigen Cholesterols wird möglicherweise über ABCA1/2 auf wiederverwendetes Apo E übertragen und in Form von Lipoproteinen sezerniert, welche dann von anderen Neuronen oder Astrozyten rezeptorvermittelt (Rezeptoren der **LDL-R**-Familie) aufgenommen werden. Alternativ kann auch wenig lipidiertes Apolipoprotein AI (**AI**) aus dem Plasma oder sezerniert von den cerebrovaskulären Endothelzellen mit Cholesterol beladen werden. Die Apo AI-haltigen Liquor-Lipoproteine können dann ihren Lipid- und Proteinanteil mit den Apo E-haltigen Lipoproteinen mit Hilfe des Cholesterylester-Transfer-Proteins (**CETP**) austauschen. Das Apo AI unterliegt möglicherweise einer kontinuierlichen proteolytischen Degradation im Liquor cerebrospinalis. Die Cholesterolexkretion mittels Lipoproteinsekretion ist jedoch hypothetisch. Die Bedeutung des angenommenen Apo E-Recyclings könnte den geringen Cholesterolumsatz trotz hoher metabolischer Aktivität erklären (Abb. adaptiert und ergänzt nach (Pfrieger, 2003; Bjorkhem *et al.*, 2004; Dietschy *et al.*, 2004; Abildayeva *et al.*, 2006) .

1.2. Lipoproteine

Der Organismus muss zur Aufrechterhaltung vieler biologischer Funktionen in der Lage sein Lipide über den Blutkreislauf oder auch die Hirnflüssigkeit zu transportieren (s.o.). Lipide sind eine große Gruppe von Substanzen biologischen Ursprungs, die sich in organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Aceton, Chloroform und Benzen gut lösen (Definition der Lipide). Sie sind für den Menschen ein wichtiger Nahrungsbestandteil und erfüllen im Organismus zahlreiche Aufgaben. Sie fungieren als Energie-Träger, Reservestoffe und Liganden für Transkriptionsfaktoren, sind Hauptbestandteil biologischer Membranen und Vorstufen von Hormonen sowie wichtige Isolatoren für die thermische Isolierung des menschlichen Körpers und der einzelnen Organe. Zu den Lipiden gehören u.a. die Triglyzeride, die Glyco- und Phospholipide sowie das Cholesterol, welches auch Ausgangsstoff für die Synthese von Gallensäuren und Steroidhormonen ist. Bis auf einige fettlösliche Vitamine und essentielle Fettsäuren kann der menschliche Organismus alle Lipide selbst synthetisieren.

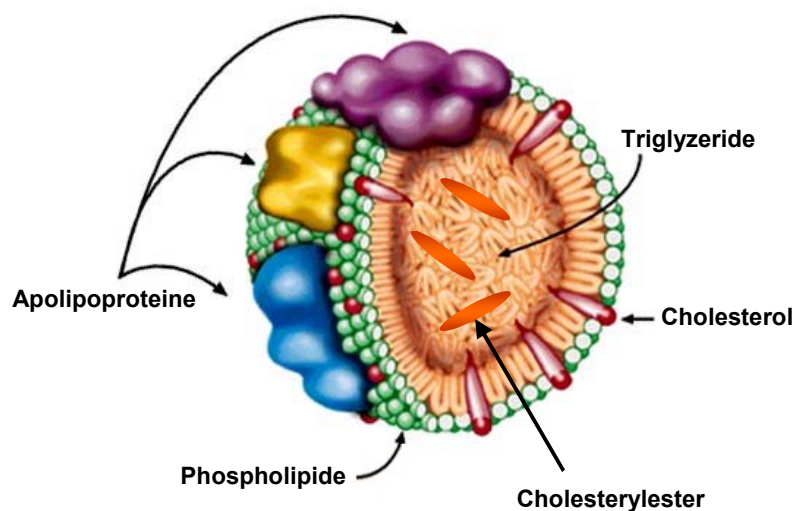


Abb. 2: Aufbau eines Lipoproteins.

Lipoproteine stellen sphärische Komplexe (Mizellen) aus Lipiden und Proteinen dar. Die unpolaren Lipide (Triglyzeride und Cholesterylester) befinden sich im Kern des Partikels, die amphiphilen Lipide (Phospholipide und Cholesterol) sowie die Apolipoproteine bilden die Hülle. Die hydrophile Oberfläche der Partikel ermöglicht den Transport von Lipiden im wässrigen Milieu der Körperflüssigkeiten (Abb. adaptiert aus dem World-Wide-Web; Internetseite der Firma Peprotech (Rocky Hill, NJ USA).

Lipoproteine

Da Lipide hydrophobe Moleküle sind, müssen sie im wässrigen Milieu des Blutplasmas oder der Hirnflüssigkeit in speziellen Komplexen transportiert werden, den Lipoproteinen. Diese sind Mizellen aus einem Kern von unpolaren Lipiden (Triglyzeride und Cholesterylester) sowie einer etwa 2 nm dicken Hülle aus Apolipoproteinen und amphiphilen Lipiden

(Phospholipide und Cholesterol)(vergl. Abb. 2). Diese Hüllschicht ist nach außen hin polar und hält so die Lipide in der wässrigen Umgebung löslich.

Plasmalipoproteine

Die Lipoproteine des Blutplasmas werden in fünf Klassen eingeteilt (Gotto, Jr. et al., 1986). Nach abnehmender Größe sind dies die Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants (CR), Lipoproteine sehr geringer Dichte (very low density lipoprotein, VLDL), Lipoproteine mittlerer Dichte (intermediate density lipoprotein, IDL), Lipoproteine geringer Dichte (low density lipoprotein, LDL) und Lipoproteine hoher Dichte (high density lipoproteins, HDL). Die Bezeichnung der Lipoproteine entsprechend ihrer Dichte basiert auf der Trennung der Fraktionen in einem Kaliumbromid(KBr)-Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation (Havel et al., 1955). Neben ihrer Größe und Dichte unterscheiden sich die einzelnen Klassen auch in ihrer Lipid- und Apolipoproteinzusammensetzung, dem Ort der Synthese sowie der daraus resultierenden Bedeutung im Stoffwechsel.

Chylomikronen

Die Chylomikronen transportieren die Nahrungslipide vom Darm zu den Geweben. Sie entstehen in der Darmmucosa aus resorbierten und wieder veresterten langkettigen Fettsäuren, Monoacylglycerol und Cholesterol durch Assoziation mit den Apolipoproteinen B-48, A-I und A-IV. Sie gelangen durch den Ductus thoracicus in die Blutbahn (Hussain et al., 1996). Im Muskel- und Fettgewebe verlieren sie schnell durch die Aktivität der Lipoproteinlipase (stimuliert durch das Apolipoprotein CII) (Olivecrona et al., 1993) den Großteil ihrer Triglyzeride (Eisenberg et al., 1992). Durch Interaktionen mit HDL kommt es zum partiellen Austausch von Apolipoproteinen. Die entstehenden Abbauprodukte werden als CR bezeichnet. Diese tragen als hauptsächlichen Apolipoproteinbestandteil neben dem Apolipoprotein B-48 auch das Apolipoprotein E, welches schließlich die rezeptorvermittelte Aufnahme der Partikel in die Leberzellen ermöglicht (Kowal et al., 1989). Dieser Weg der Nahrungslipide wird als **exogener Lipoproteinstoffwechsel** bezeichnet.

VLDL, IDL und LDL

VLDL, IDL und LDL sind eng miteinander verwandt. Sie transportieren Triglyzeride, Cholesterol und Phospholipide von der Leber zu den peripheren Geweben und sind so für den **endogenen Lipoproteinstoffwechsel** verantwortlich. VLDL werden in der Leber gebildet und tragen neben dem Strukturapolipoprotein B-100 das Apolipoprotein E als hauptsächlichen Proteinbestandteil (Ginsberg, 1995). Durch Abgabe von Fettsäuren analog der Hydrolyse der Chylomikronen gehen sie zunächst in IDL und schließlich in

cholesterolreiche LDL über (Griffin and Packard, 1994). IDL und LDL werden im Zielgewebe durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen (Havel and Hamilton, 1988).

HDL

Die HDL stellen eine heterogene Gruppe von kleinen protein- und cholesterolesterreichen Partikeln dar. Ihre Strukturapolipoproteine sind im Wesentlichen AI und/oder AII. Sie können aber auch Apolipoprotein E und Apolipoprotein C in unterschiedlichen Mengen tragen (Fielding and Fielding, 1995). HDL sind essentiell für den **reversen Cholesteroltransport**, einem Prozess, der den Nettotransfer von überschüssigem Cholesterol aus den peripheren Geweben zur Leber beschreibt (Pieters et al., 1991). Das Apolipoprotein AI (Apo AI) wird in der Leber oder dem Darm synthetisiert und in wenig lipidierter Form sezerniert. Diese lipidarmen Partikel (Vorläufer-HDL) werden in den peripheren Geweben über spezielle Cholesteroltransporter (ABCA1) mit Cholesterol und Phospholipiden beladen, wodurch zunächst nascente HDL-Partikel und später Pre β -HDL entstehen. Alternativ können diese nascenten HDL auch bei der Lipolyse von triglyzeridreichen Lipoproteinen (VLDL, Chylomikronen) generiert werden. Während des weiteren Transportes wird das Cholesterol durch Übertragung von Fettsäuren des Lecithins acyliert. Dies geschieht durch die HDL-assoziierte Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT)(Ishida et al., 1990). Dabei entstehen aus den Pre β -HDL HDL₃-Partikel. Deren Entstehung wird zusätzlich durch das Phospholipid Transporter Protein (PLTP) ermöglicht, welches durch den Transfer von Phospholipiden und Apolipoproteinen die Fusion kleinerer zu größeren HDL-Partikeln begünstigt. Die HDL₃ gelangen zur Leber, wo die selektive Aufnahme von Cholesterol und Cholesterylestern aus den HDL über SR-BI erfolgt. Auf diese Weise wird die Entstehung triglyzeridreicher HDL begünstigt, die wiederum ein Substrat für Lipasen (Hepatische Lipase, Endothelständige Lipase) darstellen, so dass eine Überführung in Pre β -HDL möglich ist. Diese können wiederum als Cholesterolakzeptor fungieren, wodurch sich der HDL-Zyklus im Plasma schließt. Das in die Leber transportierte Cholesterol wird in Gallensäuren umgewandelt und dann mit der Galle exkretiert.

Alternativ zur selektiven Aufnahme von Cholesterol und Cholesterylestern aus den HDL₃ kann es auch zur rezeptorvermittelten Endozytose des kompletten HDL₃-Partikel in die Leberzellen kommen. Die verantwortlichen Rezeptoren sind jedoch noch nicht eindeutig identifiziert worden. Eine Beteiligung von SR-BI und LRP1 wird diskutiert (Heeren et al., 2003). Die internalisierte HDL₃ kann intrazellulär mit Komplexen aus Apo E und Cholesterol interagieren, welches in der Resekretion von HDL₂ resultiert. Diese Apo E/Cholesterol-Komplexe entstehen in den Leberzellen während des Apo E-Recyclings in der postprandialen Phase (vergl. Abschnitt 1.5.). Eine Bildung von Apo E-haltigen HDL in Folge des Apo E-Recyclings ist auch außerhalb der Leber in peripheren Zellen möglich. Die Apo E-

haltigen HDL₂ können durch den Einfluss der LCAT weiter wachsen und es kommt zur Bildung großer Apo E-haltiger HDL, den HDL₁ oder auch HDL_E. Diese finden sich im Vergleich zu den HDL₂ aber in einer nur sehr geringen Konzentration im Plasma wieder. Alternativ kann HDL₂ Apo E-vermittelt in die Leber und andere Gewebe, welche Rezeptoren der LDL-R Familie exprimieren, aufgenommen werden. In der postprandialen Phase kommt den Apo E-haltigen HDL eine wichtige Funktion als Apo E-Donator für triglyzeridreiche Lipoproteine zu, die nach erfolgter Apo E-Anreicherung in die Leber aufgenommen werden (Heeren et al., 2006b). Der HDL-Metabolismus des Plasmas ist in schematisch in Abb. 3 dargestellt.

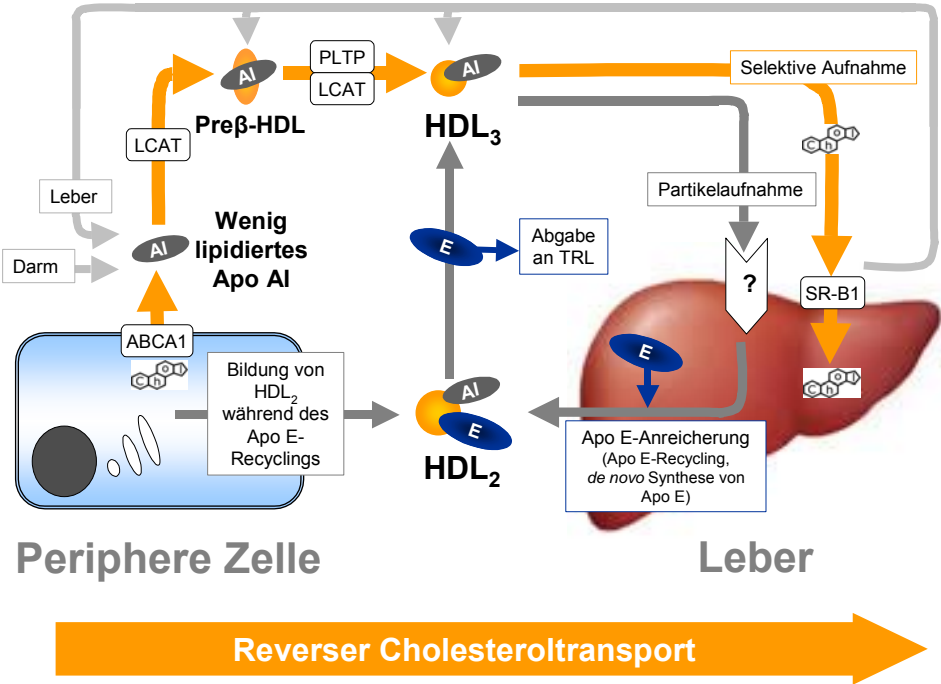


Abb. 3: HDL-Metabolismus im Plasma.
Erläuterungen im Text.

Liquor-Lipoproteine

Neben dem Lipidtransport im Plasma kommt den Lipoproteine auch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Cholesterolhomeostase des Gehirnes zu. Sie sind dort am Austausch der Lipide zwischen den Neuronen und Astrozyten über den Liquor cerebrospinalis beteiligt (vergl. Abschn. 1.1.). Da die Blut-Hirn-Schranke effektiv einen Einstrom von Plasmalipoproteinen verhindert, sind die Lipoproteine im Liquor cerebrospinalis (Liquor-Lipoproteine, CSF-Lp) lokalen Ursprungs.

Der Liquor cerebrospinalis ist eine weitgehend zellfreie und klare Flüssigkeit, welche das Ventrikelsystem (Hohlraumsystem) des Gehirns und den spaltförmigen Raum (Subarachnoidalraum) um das Zentralnervensystem (Gehirn und Rückenmark) ausfüllt. Er steht in Verbindung mit der interstitiellen Flüssigkeit des Gehirns und wird zu 70% von

speziell differenzierten Epithelzellen des Plexus choroideus (Adergeflechtgebilde im Ventrikelsystems des Gehirns) gebildet. Der restliche Anteil entsteht durch Übertritt aus dem Kapillarbett des Gehirns oder durch metabolischen Wasseraustritt aus dem Parenchym. Sein Gesamtvolumen beträgt beim Erwachsenen etwa 140 ml.

Bereits vor 50 Jahren erfolgten die ersten Untersuchungen zur Charakterisierung der Liquor-Lipoproteine. So beschrieben Bauer (Bauer, 1956) und Dencker et al. (Dencker and Swahn, 1961) Lipoproteinkomplexen im Liquor cerebrospinalis, die in ihrem Migrationsverhalten bei der Papierelektrophorese den β - und α_1 -Lipoproteinkomplexen des Plasmas ähneln. Nach heutiger Nomenklatur entspricht dies den HDL (α -Lipoproteine) bzw. LDL (β -Lipoproteine). Eine genauere Charakterisierung und Klassifizierung der CSF-Lp erfolgte jedoch erst gute 30 Jahre später. Diese Untersuchungen bestätigten die Vermutung, dass die Liquor-Lipoproteine hinsichtlich wichtiger Parameter deutliche Ähnlichkeiten zu den Plasma-HDL aufweisen. Sie verfügen über eine ähnliche Dichte (1,060 -1,25 g/ml), einen geringfügig größeren Partikeldurchmesser (10-22 nm) sowie einen nahezu identischen Besatz mit Apolipoproteinen (Hauptapolipoproteine E und AI) (Abb. 4 und Tab. 1) (Pitas et al., 1987b;Guyton et al., 1998;Beisiegel and Spector, 2001).

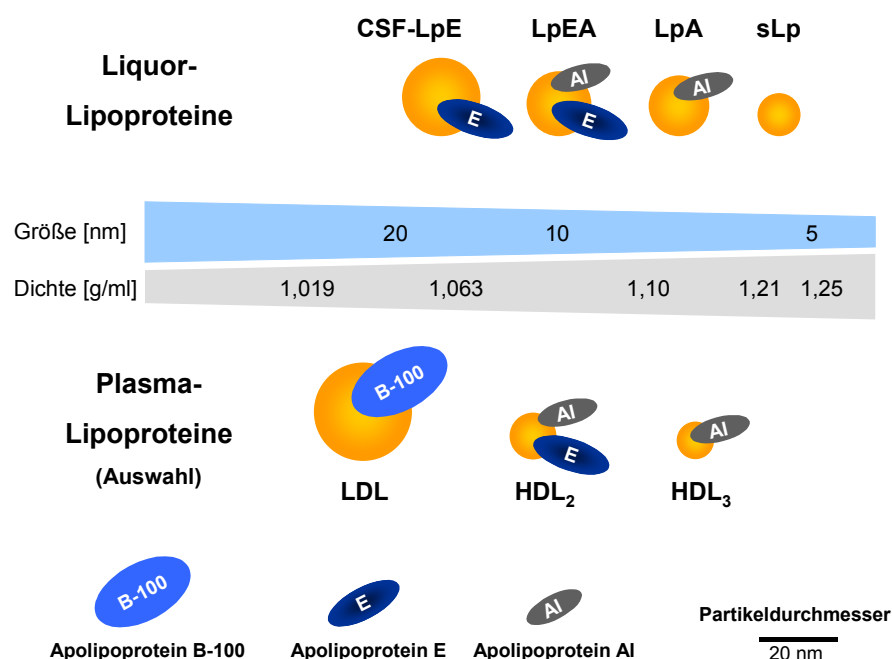


Abb. 4: Gegenüberstellung der Plasma- und Liquor-Lipoproteine.

Die vier Subklassen der Liquor-Lipoproteine sind den korrespondierenden Plasma-Lipoproteinen bezüglich ihrer Dichte, des Durchmessers sowie des charakteristischen Apolipoproteinbesatzes gegenübergestellt. Die Dichte der Partikel nimmt von links nach rechts zu. Der Durchmesser der Partikel ist an den gezeigten Größenbalken angepasst (Apolipoproteine nicht maßstabsgetreu dargestellt). Daten aus (Pitas *et al.*, 1987b; Koch *et al.*, 2001).

Weitergehende systematische Untersuchungen von humanen Liquorproben führten zur Identifizierung von vier distinkten Subklassen, für die folgende Nomenklatur vorgeschlagen

wurde: Nach abnehmendem Durchmesser und dem charakteristischen Apolipoproteinbesatz sind dies die CSF-LpE, CSF-LpEA, CSF-LpA und CSF-sLp (Koch *et al.*, 2001). Die biochemischen Parameter der CSF-Lp sind in Tabelle 1 zusammengefasst und den korrespondierenden Plasmalipoproteinen gegenübergestellt.

	Plasmalipoproteine (Auswahl)				Liquor-Lipoproteine			
	LDL	HDL ₁ /HDL _E	HDL ₂	HDL ₃	CSF-LpE	CSF-LpEA	CSF-LpA	CSF-sLp
Dichte [g/ml]	1,019-1,063	<1,125	1,063-1,125	1,126-1,21	1,060 – 1,25			
Durchmesser [nm]	15-25	12	9-11	8-9	18-22	13-20	13-18	10-12
Gesamtcholesterol [%]	35	30	18	18	17	14	15	k.A.
Triglyzeride [%]	25	1	5	3	nicht nachweisbar			
Phospholipide [%]	20	34	35	23	27	20	32	k.A.
Lipide (total) [%]	80	65	58	44	44	34	46	k.A.
Protein (total) [%]	20	35	42	56	56	66	54	k.A.
Hauptapolipoproteine	B-100	E	E, AI	AI	E	E, AI	AI	---
Apolipoproteine		(AI)	AII, AIV, C	AII, AIV, D	AIV, D, J	AIV, D, H, J	AII, AIV, D, J	AIV, D, H, J

Tab. 1: Gegenüberstellung der Biochemische Parameter der Plasma- und Liquor-Lipoproteine (Pitas *et al.*, 1987b; Guyton *et al.*, 1998; Koch *et al.*, 2001).

Wie bereits erwähnt sind die wichtigsten Apolipoproteine der CSF-Lp das Apolipoprotein E (Apo E) und das Apolipoprotein AI (Apo AI) (Pitas *et al.*, 1987b), weshalb sie auch deren Klassifizierung zugrunde liegen. CSF-LpE sind die größten Lipoproteine im Liquor cerebrospinalis mit dem höchsten Cholesterolgehalt. Sie tragen an ihrer Oberfläche das Apo E, jedoch kein Apo AI. CSF-LpEA haben einen etwas geringeren Durchmesser und verfügen sowohl über Apo E als auch Apo AI. Sie stellen quantitativ die größte Subklasse der CSF-Lp dar. Noch kleineren Durchmessers sind die CSF-LpA, welche an ihrer Oberfläche zwar Apo AI tragen, jedoch kein Apo E. Sie weisen dafür den höchsten Gehalt an Phospholipiden auf und verfügen zusätzlich über das Apolipoprotein AII (Apo AII). Die kleinsten CSF-Lp sind die CSF-sLp (small CSF-Lp). Sie bestehen aus wenig lipidisiertem Apo AIV, Apo D, Apo H und Apo J. Neben den Hauptapolipoproteinen E und AI sind auch auf den anderen CSF-Lp-Subklassen noch weitere Apolipoproteine wie Apo AIV, Apo D, Apo H, Apo J nachgewiesen worden (siehe Tabelle 1)(Koch *et al.*, 2001). Die Funktionen dieser Apolipoproteine sind noch weitgehend unklar. Allen gemeinsam ist jedoch, dass sie ebenfalls im Plasma vorkommen und dort überwiegend an HDL assoziiert sind .

Im Vergleich zu den HDL des Plasmas weisen die CSF-Lp einen deutlich größeren Anteil von unverestertem Cholesterol am Gesamtcholesterolgehalt auf. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass nahezu das gesamte Cholesterol im Gehirn unverestert vorliegt.

Außerdem enthalten die CSF-Lp im Gegensatz zu den Plasmalipoproteinen keine Triglyzeride. Dies liegt vor allem daran, dass Fettsäuren im Gehirn nicht verstoffwechselt werden, weil die Energiegewinnung über die Zufuhr von Glucose erfolgt. Die Hauptapolipoproteine der CSF-Lp Apo E und Apo AI sind unterschiedlicher Herkunft. Während das Apo E ausschließlich lokalen Ursprungs ist und im Gehirn synthetisiert wird (Pitas *et al.*, 1987a;Linton *et al.*, 1991), ist dies für das Apo AI noch nicht vollständig geklärt. Mehrheitlich wird jedoch davon ausgegangen, dass es über einen noch unbekanntem Mechanismus aus dem Plasma eingeschleust wird und nicht aus lokaler Synthese resultiert (Elshourbagy *et al.*, 1985a;Pitas *et al.*, 1987b). Eine Expression im Gehirn ist jedoch nicht ausgeschlossen (Fujii *et al.*, 2002;Yang *et al.*, 2005).

Die Funktionen der einzelnen CSF-Lp Subklassen sind noch unklar. Insgesamt scheinen sie jedoch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Cholesterohomeostase im Gehirn zu spielen und an der Ver- und Entsorgung der Neurone mit Cholesteroll beteiligt zu sein. Details zum zellulären CSF-Lp-Metabolismus sind dem Abschnitt 1.1. zu entnehmen. Die CSF-LpA gehen vermutlich aus wenig lipidiertem Apo AI hervor, welches im Gehirn mit Cholesteroll beladen wird. Dieses Cholesteroll kann sowohl von den Astrozyten als auch von den Neuronen stammen. Das Schicksal dieser Partikel ist jedoch unklar. Sie sind vermutlich in der Lage, ihren Lipid- und Proteinanteil mit anderen CSF-Lp auszutauschen. Eine rezeptorvermittelte Aufnahme in Oligonendrozyten ist ebenfalls nicht ausgeschlossen (Moestrup *et al.*, 2000;Koch *et al.*, 2001;Wicher *et al.*, 2005;Assemat *et al.*, 2005;Wicher *et al.*, 2006). Der Transport in das Plasma scheint dagegen unwahrscheinlich. Die großen CSF-LpE entstehen vermutlich aus nascenten CSF-LpE Partikeln, die vornehmlich von den Astrozyten sezerniert werden. Durch weitere Aufnahme von zellulärem Cholesteroll gewinnen sie an Größe und werden schließlich Apo E-vermittelt von Neuronen aber auch von Astrozyten aufgenommen. Die CSF-LpEA resultieren vermutlich aus Interkonversion von CSF-LpE und CSF-LpA (Pitas *et al.*, 1987b;Koch *et al.*, 2001).

	Plasma	Liquor cerebrospinalis
Gesamtcholesteroll	161 - 277 mg/dl	0,40 - 0,80 mg/dl
Phospholipide	171 - 291 mg/dl	0,25 - 0,85 mg/dl
Fettsäuren (gesamt)	178 - 666 mg/dl	1,60 - 3,00 mg/dl
Apolipoprotein E	22 - 114 µg/ml	1 - 5 µg/ml
Apolipoprotein AI	930 - 1890 µg/ml	2,9 - 4,5 µg/ml

Tab. 2: Lipid- und Apolipoproteinkonzentration im humanen Plasma und Liquor cerebrospinalis (Koch *et al.*, 2001) .

Im Vergleich zum Plasma ist die Apolipoprotein- und Lipidkonzentration im Liquor cerebrospinalis sehr viel geringer (siehe Tab. 2), was u.a. auch daran liegt, dass die

Halbwertszeit des humanen Liquor cerebrospinalis weniger als 4 Stunden beträgt und er somit dreimal täglich ausgetauscht wird (Pitas *et al.*, 1987b). Die geringe Konzentration, das kleine Liquorvolumen und die schwere Zugänglichkeit macht die CSF-Lp zu schwer zugänglichen Studienobjekten.

1.3. Apolipoprotein E

Shore und Shore wiesen 1973 erstmals in der Eiweißfraktion der Lipoproteine ein argininreiches Protein mit einer Molmasse von 34 kDa nach, welches später als Apolipoprotein E (Apo E) bezeichnet wurde (Shore and Shore, 1973). Es ist vor allem in den Chylomikronen-Remnants, den VLDL, den IDL und den HDL₁/HDL_E zu finden und hat im humanen Plasma eine mittlere Konzentration von 30-50 mg/l. Synthesorte sind die Leber, die Makrophagen und das Gehirn (Elshourbagy *et al.*, 1985b; Xu *et al.*, 2006).

Das Apo E-Gen

Die Gene der Apolipoproteine A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III und E stammen von einem gemeinsamen Vorläufergen ab (Lauer *et al.*, 1988). Aus diesem sind sie durch Duplikationen des Genes bzw. einzelner repetitiver Sequenzen und durch Deletion hervorgegangen. Das Apo E-Gen ist beim Menschen auf Chromosom 19 lokalisiert. Es weist vier Exons (44, 66, 193 und 860 bp) sowie drei Introns auf und hat eine Gesamtlänge von 3597 bp. Das erste Intron (760 bp) unterbricht die 5'-nichttranslatierte Region des Gens. Intron 2 (1092 bp) ist in die Basensequenz des Signalpeptides in der Nähe des Spaltortes eingebaut. Intron 3 (582 bp) schließlich ist in der codierende Sequenz des Apolipoproteingens positioniert. Die aus der Transkription des Apo E-Gens resultierende reife mRNA hat eine Größe von 1163 Basen (Paik *et al.*, 1985).

Für das Apo E-Gen sind zahlreiche Allel-Varianten beschrieben worden (de Knijff *et al.*, 1994). Die drei wichtigsten Allele sind jedoch das ϵ 2, das ϵ 3 und das ϵ 4-Allel. Bezogen auf die Normalbevölkerung kommt das ϵ 3-Allel mit 70-85 % am häufigsten vor und wird daher auch als Wildtyp-Allel angesehen. Gefolgt vom ϵ 4-Allel mit 12-18 % und dem ϵ 2-Allel mit 3-12 % (Zannis *et al.*, 1982). Die Allele manifestieren sich phänotypisch in den Isoproteinen Apo E2, E3 und E4. Ursache für diesen genetischen Polymorphismus sind Punktmutationen im Bereich der Aminosäuren 112 und 158, die zu einer Substitution von Cystein-112 durch Arginin (E4) bzw. Arginin-158 durch Cystein (E2) führen (Zannis *et al.*, 1982). Durch diesen Aminosäureaustausch trägt Apo E2 im Vergleich zu Apo E3 eine positive Ladung weniger und Apo E4 eine mehr. Diese Ladungsunterschiede wirken sich auf die räumliche Struktur der Isoproteine aus, so dass es zu einer veränderten Bindungsaffinität zwischen Rezeptoren und Lipoproteinen kommt ((Weisgraber *et al.*, 1985; Weisgraber, 1990). Daneben

ermöglichen die unterschiedlichen Nettoladungen der Hauptisoformen die Analyse des Apo E-Phänotyps in der isoelektrischen Fokussierung. Die Häufigkeit der einzelnen Phänotypen ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

Phänotyp	E4/4	E4/3	E3/3	E3/2	E2/2
Häufigkeit	2,8 %	26 %	55 %	4,9 %	1 %

Tabelle 3: Häufigkeit der Apo E-Phänotypen in der Normalbevölkerung (Schwandt P., 1995).

Die anderen Allel-Varianten stellen Subisoformen der drei Hauptisoformen dar und sind durch zusätzliche Aminosäureaustausche, aber auch durch Aminosäure-Insertionen und Deletionen gekennzeichnet. Wegen ihres sehr seltenen Vorkommens wird auf diese nicht weiter eingegangen.

Biosynthese von Apo E

Nachdem das Primärtranskript des Apo E-Genes polyadenyliert wurde und durch Spleißen die reife mRNA entstanden ist, erfolgt im Cytosol die Translation. Apo E-mRNA konnte in fast allen Geweben nachgewiesen werden. Die Hauptorte der Expression sind jedoch die Leber und das Gehirn (Elshourbagy *et al.*, 1985b). Apo E wird zunächst als 317 Aminosäuren umfassendes Prä-Apo E gebildet. Dabei bilden 18 N-terminale Aminosäuren ein Signalpeptid, das den Transport durch die Membranen des endoplasmatischen Retikulum (ER) ermöglicht. Das Signalpeptid besteht aus einem positiv geladenen N-Terminus, einer zentralen hydrophoben Region und einem stark polaren C-Terminus. An diesem erfolgt auch die Abspaltung der Signalsequenz nach dem Transport in das ER (Zannis *et al.*, 1984). Im Golgi-Apparat wird das Apo E am Threonin 194 glykosyliert. Hierbei wird das Protein vermutlich zunächst mit einem Oligosaccharid aus Aminosackern (N-Acetyl-D-Glucosamin) verknüpft, von welchem im weiteren Verlauf der Glykosylierung Zuckerreste abgespalten und wieder ergänzt werden. Abschließend werden am äußeren Ende der Struktur bis zu 6 N-Acetylneuraminsäurereste (Sialinsäurereste) angeheftet (Wernette-Hammond *et al.*, 1989). Nach Sekretion des Proteins ins Plasma und dem Einbau in Lipoproteine werden die Sialinsäurereste durch eine Neuraminidase des Gefäßendothels abgebaut. Ihnen wird eine regulatorische Bedeutung für den VLDL Katabolismus zugeschrieben, da die Partikel mit abnehmenden Sialysierungsgrad rascher aus dem Plasma eliminiert werden (Dargel R., 1991). Besonders stark sialysiert ist das Apo E im Liquor cerebrospinalis. Ursache ist vermutlich die geringere Neuraminidaseaktivität im Liquorraum (Pitas *et al.*, 1987b). Es ist jedoch noch unklar, ob dem höheren Sialysierungsgrad im Gehirn eine funktionelle Bedeutung zukommt. Da die Anzahl der Zuckerreste aber Einfluß auf die Nettoladung (pro

Sialinsäurerest eine negative Ladung) des Proteins hat, wird durch den unterschiedlichen Sialysierungsgrad die Apo E-Phänotypisierung mittels isoelektrischer Fokussierung erschwert.

Die Sekundärstruktur des Proteins ist von α -helicalen Bereichen dominiert. Der C-Terminus (Aminosäuren 216-299) mit seiner amphiphatischen α -Helix ist dabei für die Lipid-Bindung verantwortlich. Die Interaktion mit dem LDL-Rezeptor wird dagegen im Bereich zwischen den Aminosäuren 126 und 191 vermittelt (Aggerbeck et al., 1988; Mahley, 1988; Chou et al., 2006). Die eigentliche Bindung erfolgt dabei über ein Motiv positiv geladener Aminosäurereste von Aminosäure 140 bis 160, welches komplementär zu den negativ geladenen Bindungsstellen des LDL-Rezeptors ist (Weisgraber et al., 1985; Weisgraber et al., 1986). Im Plasma liegt Apo E teilweise als Multimer oder Heterodimer mit ApoA-II vor. Diese Oligomerisierung wird über Disulfidbrücken stabilisiert. Von den drei Hauptisoformen sind nur Apo E3 und E2 hierzu in der Lage, da nur sie einen bzw. zwei Cysteinreste in ihrer Primärstruktur aufweisen. Apo E4 enthält keinen Cysteinrest, liegt also ausschließlich als Monomer vor (Weisgraber and Shinto, 1991). Eine Übersicht zur Primär- und Sekundärstruktur ist in Abb. 5 dargestellt.

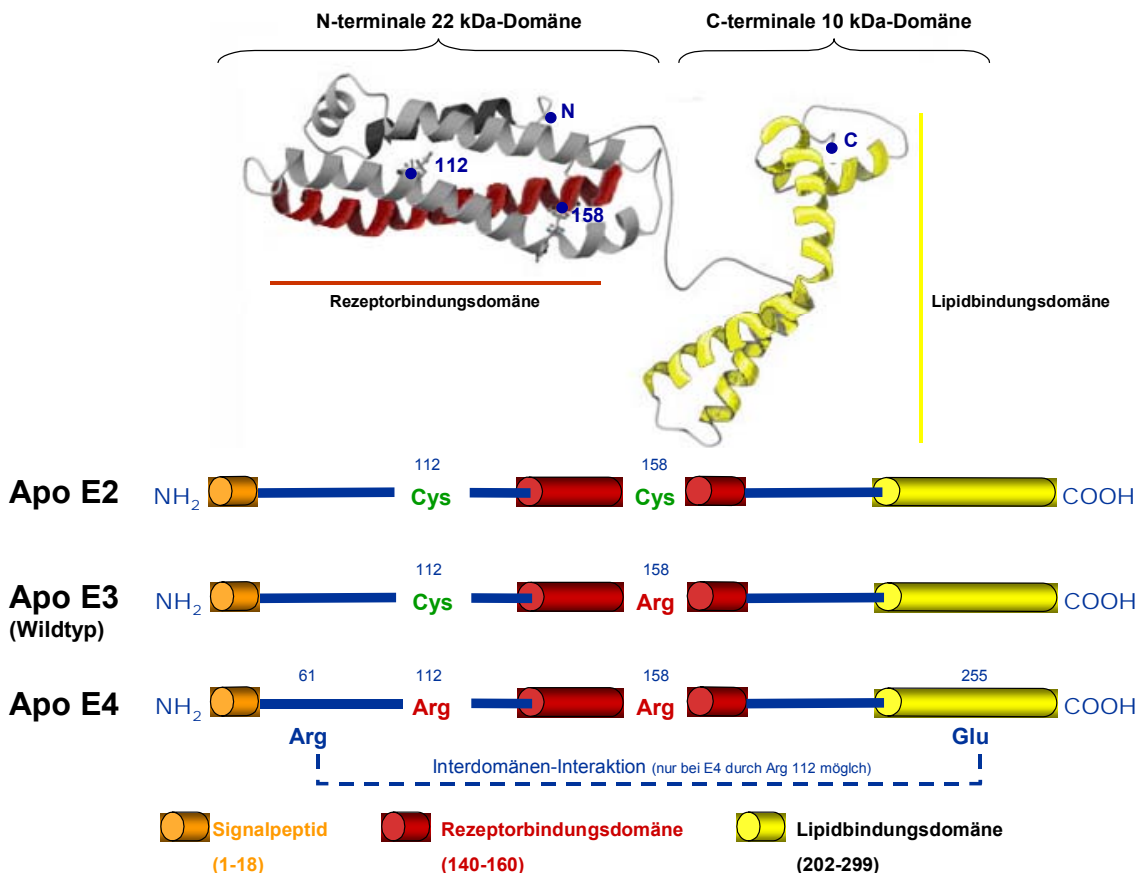


Abb. 5: Primär- und Sekundärstruktur des Apolipoprotein E (adaptiert aus Chou et al., 2006). Erläuterungen im Text.

Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Apo E

Wie bereits erwähnt vermittelt Apo E die Aufnahme von Lipoproteinen in Zellen durch Bindung an die Rezeptoren der LDL-R-Familie (Beisiegel U., 1992). So ermöglicht es beispielsweise die Aufnahme von Chylomikronen-Remnants (via Chylomikronen-Remnant-Rezeptor) in die Leber und ist verantwortlich für den Abbau von VLDL-Remnants (via LDL- und Chylomikronen-Remnant-Rezeptor). Es konnte gezeigt werden, dass Apo E im Vergleich zum ApoB-100 intrazellulär nicht degradiert wird (Beisiegel, 1995; Schwiegelshohn et al., 1995), sondern durch Recycling-Prozesse dem Lipoproteinstoffwechsel erhalten bleibt (Beisiegel, 1995; Heeren et al., 1999; Heeren et al., 2001; Heeren *et al.*, 2003; Heeren *et al.*, 2006b). Auf den Vorgang dieses Apo E-Recyclings wird in Abschnitt 1.5. genauer eingegangen. Neben der Funktion als bedeutender Regulator für den Lipoproteinmetabolismus im Plasma (Mahley, 1988) kommt dem Apo E im Gehirn eine besondere Bedeutung zu. Hier ist es ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der neuronalen Cholesterohomeostase und hilft bei der Regeneration von Neuronen nach Zellschädigung. Wie bereits erwähnt gelangt es über rezeptorvermittelte Endozytose und gebunden an Cholesterol in die geschädigten Nervenzellen und koordiniert dort die lokale Mobilisierung und Neuverteilung von Cholesterol. Dies spielt u.a. bei der Reparatur von Zellmembranen eine Rolle (Boschert et al., 1999b).

Der genetische Apo E-Polymorphismus hat großen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins und steht so in Zusammenhang mit Fettstoffwechselstörungen (z.B. Typ III-Hyperlipoproteinämie) und anderen Erkrankungen wie z.B. der Alzheimer-Erkrankung.

Apo E2 trägt, bedingt durch den Aminosäureaustausch Arg158 vs Cys, eine positive Ladung weniger in der Rezeptorbindungsdomäne als Apo E3 und E4. Daraus resultiert eine geringere Bindungsaffinität zum LDL- und Chylomikronen-Remnantrezeptor (Havel et al., 1980). Dies korreliert mit der Beobachtung, dass homozygote Merkmalsträger (ϵ 2/2) eine Hyperlipidämie entwickeln können. Diese ist aber nur bei etwa 5% der Betroffenen zu beobachten (Zannis *et al.*, 1982). Die Hyperlipidämie tritt nur dann auf, wenn andere Störungen des Lipidstoffwechsels, eine Hypothyreose oder ein Diabetes mellitus hinzukommen. Dies ist vermutlich auf eine residuale Bindungsaktivität von Apo E2 zum LDL-Remnant-Rezeptor bzw. LRP-Protein oder auf die nicht verminderte Heparinbindung zurückzuführen (Beisiegel U., 1992; Mahley, 1996), denn ein kompletter Apo E-Mangel ist immer mit einer Hyperlipidämie verbunden (Schaefer et al., 1986).

Die sehr seltenen Apo E-Varianten E1, E2-Christchurch, E3-Leiden, E5 und E7 stehen ebenfalls im Zusammenhang mit Hyperlipidämien (Wardell et al., 1987; de Knijff et al.,

1991;Matsunaga et al., 1995;Schwandt P., 1995). Diese Isoformen zeichnen sich desgleichen durch eine verringerte Rezeptorbindungsaffinität aus (Dargel R., 1991).

Das Apo E4 hat bisherigen *in vitro* Versuchen zur Folge im Vergleich zu Apo E3 keine veränderte Rezeptorbindungsaffinität. *In vivo* kann es jedoch durch fehlende Cysteinreste keine Oligomere wie Apo E2 und E3 bilden. Dies führt zu einer „erhöhten“ Rezeptorbindungsaffinität, so dass die Aufnahme von Remnants in die Leber verstärkt ist, und die Expression des LDL-Rezeptors verringert wird (Down-Regulator). Die Folge ist eine Erhöhung des LDL-Cholesterols und damit ein gesteigertes Risiko für eine vorzeitige Koronarsklerose (Schwandt P., 1995). Neben der fehlenden Möglichkeit zur Oligomerisierung weist das Apo E4 noch weitere strukturelle Besonderheit auf. So macht die Anwesenheit von Arg an Position 112 eine Interdomäneninteraktion zwischen Arg-61 und Glu-255 möglich, welche in einer präferentiellen Bindung des Apo E4 an große Lipoproteinpartikel resultiert. (Weisgraber, 1990;Weisgraber, 1994;Dong and Weisgraber, 1996). Gleichzeitig scheint das Apo E4 anfälliger für die proteolytische Degradation zu sein (Morrow et al., 2002).

Der Apo E-Polymorphismus spielt auch als Risikofaktor bei der Alzheimer-Erkrankung (AK) eine wichtige Rolle. Bei Alzheimer-Patienten ist die Allelfrequenz von $\epsilon 4$ rund dreimal höher als bei gesunden kaukasischen Personen (Corder et al., 1993;Poirier et al., 1993;Saunders et al., 1993;Lautenschlager et al., 1999). Wie bereits erwähnt ist das Genprodukt des $\epsilon 3$ -Allels an den Regenerations- und Reparaturprozessen in der Nervenzelle beteiligt. Träger von einem oder zwei $\epsilon 4$ -Allelen scheinen in dieser Hinsicht jedoch ein Defizit aufzuweisen (Poirier, 1996). Das $\epsilon 4$ -Allel begünstigt zudem die Bildung der für die AK-Pathologie charakteristischen, β -Amyloid-Ablagerungen (Schneider et al., 1995). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Apo E4 das Tau-Protein bindet und damit die Bildung der ebenfalls für die AK charakteristischen Neurofibrillären-Ablagerungen fördert (Marz et al., 1996).

1.4. Lipoproteinrezeptoren im Gehirn

Die Aufnahme von Lipoproteinen in die Zielzellen erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose. Zahlreiche dieser Lipoproteinrezeptoren konnten auch in den Zellen des Gehirns nachgewiesen werden. Unter ihnen sind die Mitglieder der erweiterten LDL-R-Familie sowie die an der selektiven Aufnahme von Lipiden beteiligten Scavenger Rezeptoren der Klasse B (SR-BI und SR-BII) (Herz et al., 2002).

Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Familie

Die LDL-R-Familie besteht bei den Säugetieren aus sieben Kernmitgliedern. Dies sind der LDL-Rezeptor (LDL-R), das LDL receptor-related Protein 1 (LRP1) und das eng verwandte LRP1B, Megalin (auch bekannt als LRP2 oder Glykoprotein 330 (gp330)), der VLDL-Rezeptor (VLDL-R), der Apolipoprotein E-Rezeptor-2 (Apo ER2 oder auch LRP8) sowie das Protein MEGF7. Zu diesen Kernmitgliedern gesellen sich noch drei weitere, aber etwas entferntere Verwandte: Das LRP5 und LRP6 sowie SorLA (auch bekannt als LR11). Den sieben Kernmitgliedern ist gemein, dass sie Apolipoprotein E binden und im Gehirn exprimiert werden. Sie teilen auch wichtige strukturelle Gemeinsamkeiten. Dazu gehören das Ligandenbindungs-Motiv, EGF (Epidermal Growth Factor)-Vorläufer homologe Domänen, welche die intrazelluläre und säureinduzierte Freisetzung der gebundenen Liganden ermöglichen, die Transmembrandomäne und der cytoplasmatische Teil mit mindestens einem NPxY-Motiv. Dieses Motiv ist sowohl an der Regulation der Endozytose beteiligt als auch an der Signaltransduktion über die Interaktion mit den Phosphotyrosin-Bindungsdomänen (PTB) enthaltenen Proteinen (Beffert et al., 2004)(vergl. Abb. 6). Im folgenden Abschnitt soll ein kurzer Überblick über die Funktion dieser Rezeptoren im Gehirn gegeben werden. Auf die Rolle der einzelnen Rezeptoren in anderen Organen oder Geweben wird nicht näher eingegangen.

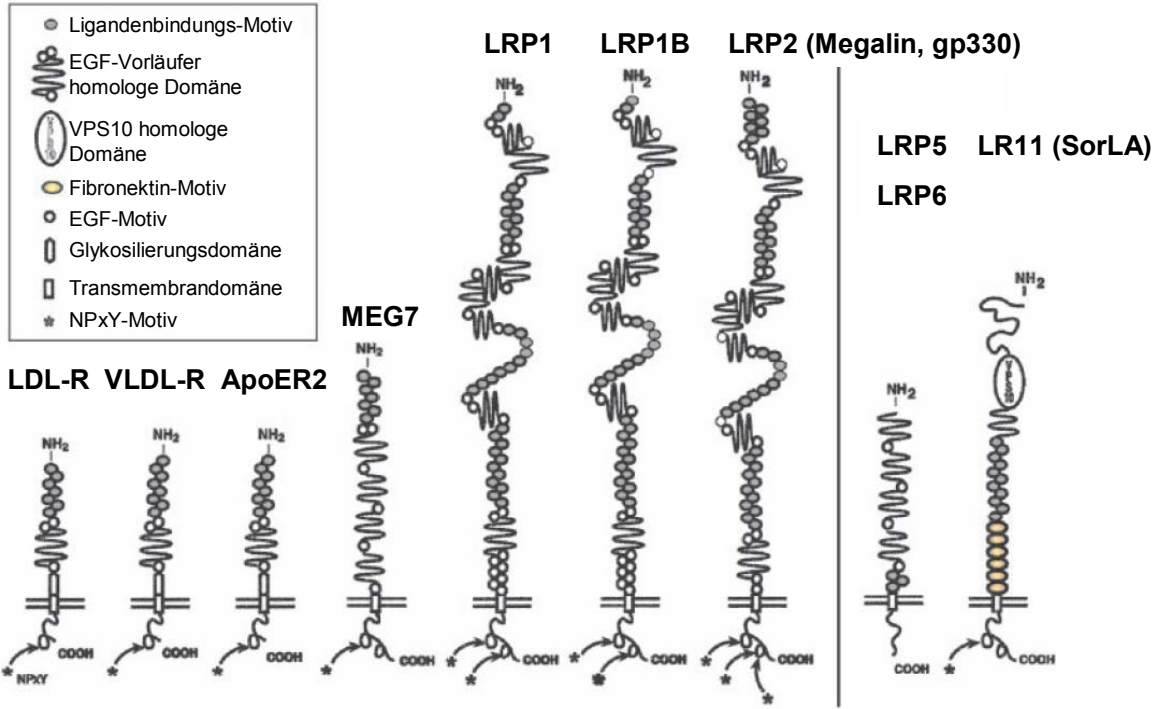


Abb. 6: Schematische Darstellung der erweiterten LDL-Rezeptorfamilie der Säugetiere (aus Herz et al., 2002). Erläuterungen im Text.

Der LDL-Rezeptor

Der LDL-R als Namensgeber dieser Rezeptorfamilie ist ein in vielen Geweben des menschlichen Körpers exprimiertes Glykoprotein. Er ist einer der ersten Zelloberflächenrezeptoren für den gezeigt werden konnte, dass nach Bindung eines Liganden, hier LDL-Partikel, die Endozytose des gesamten Rezeptor-Liganden-Komplexes erfolgt, wobei der Ligand in lysosomale Kompartimente dirigiert wird (Brown and Goldstein, 1986). Durch seinen hohen Glykosylierungsgrad weist er in der Gelelektrophorese ein apparentes Molekulargewicht von 110 - 160 kDa auf, obwohl das berechnete Molekulargewicht bei lediglich 95 kDa liegt.

Im Gehirn wird er überwiegend von Gliazellen und nur in geringem Maße von Neuronen exprimiert, wobei sein extrazellulärer Ligand das Apo E ist (LaDu et al., 2000). Funktionell scheint er an der Aufnahme von Apo E-haltigen Liquor-Lipoproteinen in Gliazellen beteiligt zu sein und damit einen möglichen Beitrag zum Cholesteroll-Recycling im Gehirn zu leisten. Verschieden Untersuchungen im menschlichen und tierischen System haben jedoch keinen Beweis dafür erbracht, dass dem LDL-R eine zentrale Rolle im Gehirn zukäme. Vermutlich gibt es ausreichend redundante Mechanismen, wie z.B. andere Lipoproteinrezeptoren oder die endogene Cholesterolsynthese bzw. -oxidation, die einen Ausfall des LDL-R kompensieren können (Herz *et al.*, 2002)

LRP1

Das ca. 600 kDa große LDL receptor-related Protein 1 (LRP1) war der zweite Rezeptor aus der LDL-R Familie, der identifiziert wurde (Herz et al., 1988;Beisiegel et al., 1989). Er besteht aus zwei nicht kovalent verbunden Untereinheiten, die durch proteolytische Prozessierung (Protease Furin) aus einem ca. 600 kDa Vorläuferprotein hervorgehen. Die 85 kDa β -Kette beinhaltet einen kurzen extrazellulären Teil, die Transmembrandomäne sowie den cytoplasmatischen Teil. Die 515 kDa α -Kette stellt den extrazellulären Teil des Rezeptors dar und ist im Wesentlichen eine lineare Aneinanderreihung von vier Kopien der LDL-R Extrazellulärdomäne. Auch LRP1 liegt glykosyliert vor, wobei der Grad der Glykosylierung gewebsspezifisch ist. Im Gehirn scheint LRP1 weniger stark glykosyliert zu sein als in der Leber. Die Glykosylierung erfolgt N-glykosidisch an der 85 kDa β -Kette und hat evtl. Einfluss auf die proteolytische Stabilität des Rezeptors (May et al., 2003).

LRP1 wird im Gehirn überwiegend von Neuronen exprimiert und verfügt über ein großes Ligandenspektrum (LaDu *et al.*, 2000;Herz *et al.*, 2002). Hauptligand im Gehirn scheint jedoch auch das Apo E zu sein, so dass LRP1 funktionell eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Apo E-haltigen Liquor-Lipoproteinpartikeln in Neuronen zukommt. Er ist damit an ihrer Versorgung mit exogenem Cholesteroll beteiligt. Für nicht neuronale Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass LRP1 nicht nur die Aufnahme von Apo E vermitteln kann,

sondern auch an der Wiederverwendung und Retroendozytose des Proteins beteiligt ist (Heeren *et al.*, 2006b). Dieses Apo E-Recycling wird in Abschnitt 1.5. näher erläutert.

Neben der Lipoproteinaufnahme kommen LRP1 noch weitere wichtige biologische Funktionen zu. LRP1 defiziente Mäuse versterben bereits sehr früh während der embryonalen Entwicklung, weshalb LRP1 eine wichtige Rolle bei der Embryogenese zugeschrieben wird (Herz *et al.*, 1992; Herz *et al.*, 1993). Weitere Liganden für LRP1 sind Lipasen (Beisiegel *et al.*, 1991), Gerinnungsfaktoren (Warshawsky *et al.*, 1994), Toxine (Kounnas *et al.*, 1992) und viele mehr. Ob die letztgenannten Liganden im Gehirn eine Rolle spielen, ist nicht bekannt.

Ein weiterer Ligand für LRP1 im Gehirn ist jedoch pathophysiologisch von besonderem Interesse. LRP1 bindet direkt an die extrazelluläre Domäne des Amyloid-Vorläuferproteins (APP), jenes Proteins, das nach proteolytischer Prozessierung durch β - und γ -Sekretase die A β -Peptide freisetzt, welche zu den charakteristischen Amyloid-Plaques bei der Alzheimer Krankheit aggregieren (Kounnas *et al.*, 1995). LRP1 ist zudem in der Lage, indirekt unter Vermittlung des Adapterproteines Fe65 mit dem cytoplasmatischen Teil von APP zu interagieren (Trommsdorff *et al.*, 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass LRP1 als kompetitives Substrat für die γ -Sekretase fungiert (Lleo *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Beobachtungen postuliert man eine mögliche Beeinflussung der Alzheimer-Pathogenese durch LRP1. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich diese Hypothese bewahrheitet.

LRP1B

Dieser Rezeptor ist das jüngste Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie und trägt den Zusatz B, weil 60% seiner Aminosäuresequenz mit LRP1 übereinstimmt. Im Vergleich zu LRP1 verfügt er jedoch über ein zusätzliches Ligandenbindungsmotiv in Ligandenbindungsdomäne IV und eine 33 Aminosäuren-Insertion im cytoplasmatischen Teil. Das errechnete Molekulargewicht ohne Glykosylierung liegt bei 500 kDa. Hauptexpressionsort ist das Gehirn (Marschang *et al.*, 2004). Untersuchungen an Tumorzell-Linien haben gezeigt, dass das LRP1B-Gen ein Tumor-Suppressorgen ist (Liu *et al.*, 2000). Seine Funktion bei der Bindung und Aufnahme von Apo E-haltigen Liquor-Lipoproteinen ist unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Endozytose von LRP1B gebundenen Liganden nur halb so schnell verläuft, wie bei LRP1 (Liu *et al.*, 2001), was zu der Vermutung Anlass gibt, dass sein Beitrag zur Endozytose von Lipoproteinen eher gering ist. Untersuchungen an LRP1B defizienten Tieren haben keine phänotypischen Auffälligkeiten analog zu LRP1 zu Tage gefördert, weshalb davon ausgegangen wird, dass ein Ausfall von LRP1B funktionell von LRP1 kompensiert werden kann (Marschang *et al.*, 2004). Von besonderem Interesse sind jedoch experimentelle Hinweise, dass LRP1B analog zu LRP1 in der Lage ist APP zu binden. In der Folge konnte

eine Akkumulation von APP an der Zelloberfläche beobachtet werden, die in einer verringerten Prozessierung zum Alzheimer-Peptid A β resultierte (Cam et al., 2004). Der Expression von LRP1B könnte also im Gehirn eine Alzheimer protektive Wirkung zugeschrieben werden. Der Einfluss von LRP1B auf die Pathogenese der Alzheimer Krankheit bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

LRP2 (synonyme Bezeichnungen: Glykoprotein 330 (gp330), Megalin)

LRP2 gehört mit LRP1 und LRP1B zu den größten Mitgliedern der LDL-R Familie. Er besteht lediglich aus einer Kette mit einem Molekulargewicht von etwa 600 kDa. Die extrazelluläre Domäne enthält analog zu LRP1 und LRP1B ebenfalls 4 Ligandenbindungsdomänen, die durch EGF-Vorläufer homologe Domänen getrennt sind. Er spielt eine wichtige Rolle in der Ca²⁺-Homeostase durch Reabsorption von Vitamin D₃ sowie Bindung und Aufnahme von Parathyroidhormon in der Niere (Verroust and Christensen, 2002). Als Mitglied der LDL-R Familie ist auch LRP2 in der Lage, die Endozytose von Apo E-haltigen Lipoproteinpartikeln zu vermitteln. Neben der Bindung und Aufnahme von Apo E-haltigen Lipoproteinpartikeln ist LRP2 auch als Co-Rezeptor für Cubilin (gp 280), einem 460 kDa Transmembranprotein, an der Aufnahme von lipidarmem Apo AI sowie HDL-Partikeln beteiligt (Moestrup *et al.*, 2000). Im Gehirn findet sich LRP2 in den Zellen des Plexus choroideus, des Ependyms und in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (Kounnas et al., 1994; LaDu *et al.*, 2000). Eine Expression durch Neuronen oder Gliazellen wurde lange Zeit ausgeschlossen. Jüngste Untersuchungen konnten jedoch eine Expression von LRP2 in Oligodendrozyten nachweisen. Es wird angenommen, dass LRP2 dort eine Rolle während der Myelinisierung der Neurone spielt und über die Aufnahme von Liquor-Lipoproteinen dazu beiträgt, den erhöhten Cholesterolbedarf der Oligodendrozyten zu decken (Wicher *et al.*, 2006). Neben der Aufnahme von Apo E-haltigen Liquor-Lipoproteinen kann LRP2 auch an der Aufnahme von Apo AI-haltigen Liquor-Lipoproteinen beteiligt sein. Möglicherweise fungiert LRP2 im Gehirn ebenfalls als Co-Rezeptor für Cubilin und vermittelt so die Aufnahme dieser Partikel. Die überlappende Expression von LRP2 und Cubilin im Gehirn unterstützt diese These (Assemat *et al.*, 2005). Gleichzeitig ist LRP2 auch Rezeptor für das von den Gliazellen exprimierte Apolipoprotein J (auch Clusterin), welches sich auf allen Subklassen der Liquor-Lipoproteine findet (Morales et al., 1996; Koch *et al.*, 2001). Apo J interagiert mit dem A β -Peptid und fördert seine Cytotoxizität (DeMattos et al., 2002). Eine konkrete Beteiligung von LRP2 an der Alzheimer Pathogenese ist jedoch noch nicht nachgewiesen.

VLDL-Rezeptor (LR 8)

Der VLDL-Rezeptor ist strukturell sehr eng mit dem LDL-Rezeptor verwandt, er weist jedoch ein zusätzliches Ligandenbindungsmotiv in der N-terminalen Ligandenbindungsdomäne auf.

Sein apparentes Molekulargewicht liegt zwischen 105 und 130 kDa. Die Affinität zum Liganden Apo E ist mit der des LDL-Rezeptors identisch, so dass auch der VLDL-R die Aufnahme von Apo E-haltigen Lipoproteinen vermittelt. Im Gehirn wird der VLDL-R überwiegend von Neuronen und nicht von Gliazellen exprimiert (LaDu *et al.*, 2000). Seine Rolle im Liquor-Lipoproteinstoffwechsel ist unbekannt. Jenseits der Lipoproteinaufnahme scheint dem VLDL-R aber eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Zentralnervensystems zuzukommen. Der VLDL-R bindet das große sekretierte Protein Reelin. Reelin wird während der Embryonalentwicklung von spezialisierten Pionier-Neuronen exprimiert und fungiert vermutlich als Stoppsignal für migrierende Neuronen, so dass diese nach Erreichen der richtigen Position im Cortex die Migration einstellen. Der VLD-R vermittelt dieses Signal über verschiedene Phosphorylierungskaskaden in die Zelle. Weitere Adapterproteine sorgen dann für eine Weiterleitung des Signals bis auf die Ebene der Transkriptionskontrolle (Herz *et al.*, 2002). Eine Beteiligung des VLDL-R an der Alzheimer Pathogenese wird bisher noch sehr kontrovers beurteilt. Epidemiologische Studien kommen hier zu gegensätzlichen Schlussfolgerungen.

ApoER2 (auch LRP8, LR7 oder LR8B)

Strukturell ist der ApoER2 weitgehend mit dem VLDL-R identisch. Er wird überwiegend im Gehirn exprimiert, wo man ihn vorwiegend auf Neuronen findet. Analog zum VLDL-R kommt ihm eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Zentralnervensystems zu. Er bindet ebenfalls Reelin und vermittelt die Signaltransduktion in die Zelle. VLDL-R und ApoER2 scheinen daher als redundante Rezeptoren für Reelin zu fungieren. Mäuse, die für beide Rezeptoren defizient sind, weisen schwere neurologische Defizite auf und zeichnen sich durch einen trudelnden Gang aus (analog zu den Reeler-Mäusen, reel = rollen) (Herz *et al.*, 2002).

ApoER2 ist ebenfalls in der Lage die Endozytose von Apo E-haltigen Lipoproteinpartikel und damit die Aufnahme von Lipiden zu vermitteln.

Für ApoER2 wurde auch eine Interaktion mit APP über extrazelluläre Adapterproteine gezeigt und postuliert, dass dies zu einer reduzierten Produktion des Alzheimer A β -Peptides führt (Hoe *et al.*, 2005).

MEGF7 (LRP4)

MEGF7 steht strukturell zwischen VLDL-R/ApoER2 und den größeren Mitgliedern der LDL-R Familie wie LRP1. Er weist im Vergleich zu VLDL-R/ApoER2 zusätzliche EGF-Vorläufer homologe Domänen auf. Seine Funktion im Lipoproteinstoffwechsel ist unbekannt. Vielmehr kommt MEGF7 ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung zu. MEGF7 defiziente Mäuse zeigen ein retardiertes Wachstum und Fehlbildungen an den Zähnen sowie

andere Auffälligkeiten. Bei MEGF7 scheinen jedoch andere Signaltransduktionswege und Liganden eine Rolle zu spielen als bei VLDL-R und ApoER2 (Johnson et al., 2005). Welche Rolle MEGF7 im adulten Säugerhirn spielt, ist unbekannt.

LRP5 und LRP6

LRP5 und 6 sind entferntere Mitglieder der LDL-R-Familie, die untereinander aber strukturell sehr eng verwandt sind. Extrazellulär besitzen sie eine Ligandenbindungsdomäne mit EGF-Vorläufer homologen Domänen, welche jedoch anders organisiert ist, als bei den Kernmitgliedern der LDL-R Familie. Die erweiterte Ligandenbindungsdomäne mündet direkt in die Transmembrandomäne, welcher sich der cytoplasmatische Teil anschließt. Im Gegensatz zu den Kernmitgliedern findet sich hier kein NPxY-Motiv. Dennoch sind cytoplasmatisch andere Protein-Protein-Interaktionsmotive vorhanden. Auch LRP5 und 6 wird eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung zugeschrieben (Herz *et al.*, 2002).

SorLA (LR11)

Ein weiteres entferntes Mitglied der LDL-R Familie ist SorLA. Dieser ca. 250 kDa große Klasse 1 Transmembranrezeptor besitzt einige strukturelle Merkmale der LDL-R Familie, weist jedoch zusätzlich eine VPS10-Domäne auf, welche das Neuropeptid Kopfaktivator bindet. Er steht damit zwischen der LDL-R Familie und der Familie der Rezeptoren mit VPS10 (vacuolar protein sorting 10 protein)-Domäne. SorLa kann zwar Apo E-haltige Lipoproteine binden, seine Hauptliganden, zumindest im sich entwickelnden Organismus, scheinen jedoch Wachstumsfaktoren und das Neuropeptid Kopfaktivator zu sein. SorLA wird überwiegend von Neuronen exprimiert und wird als Prä-Proprotein synthetisiert, welches intrazellulär durch die Protease Furin gespalten wird und sich nach weiteren Reifungsprozessen an der Zelloberfläche wiederfindet. SorLA spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung, der intrazellulären Proteinsortierung und vielen anderen Prozessen (Bohm et al., 2006). Jüngere Untersuchungen postulieren auch eine Rolle von SorLA bei der Pathogenese der Alzheimer Krankheit. So konnte gezeigt werden, dass SorLA mit APP interagiert und dessen intrazelluläre Distribution beeinflusst, wodurch die Bildung des Alzheimer Peptids A β reduziert wird (Andersen et al., 2006; Offe et al., 2006).

Jüngste Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass SorLA analog zu APP durch die γ -Sekretase prozessiert wird und die freigesetzte Intrazellulärdomäne möglicherweise die Transkriptionskontrolle für bestimmte Gene im Zellkern beeinflusst (Bohm *et al.*, 2006).

Scavenger Rezeptoren der Klasse B (SR-B)

Der Begriff Scavenger-Rezeptor wurde vor ca. 20 Jahren geprägt und beschrieb unidentifizierte hochaffine Bindungstellen für acetylierte Lipoproteine auf Makrophagen. Später wurde gezeigt, dass auch in anderen Zellen und Geweben Rezeptoren exprimiert werden, die modifizierte (oxidiert, acetyliert) Lipoproteine binden können. Diese unterschiedlichen Rezeptoren wurden dann in der Scavenger-Rezeptor-Superfamilie zusammengefasst. Scavenger Rezeptoren haben ein sehr breites Ligandenspektrum und spielen daher auch immunologisch eine wichtige Rolle bei der Bindung von pathogenen Komponenten (Krieger, 2001). Eine Subfamilie der Scavenger-Rezeptoren im Säugetier sind die Scavenger-Rezeptoren der Klasse B (SR-BI und SR-BII). Von besonderem Interesse für den Lipoproteinstoffwechsel ist der Scavenger-Rezeptor der Klasse B Typ I (SR-BI). Für ihn konnte erstmals die selektive Aufnahme von Lipiden aus Lipoproteinpartikeln gezeigt werden. Es existiert jedoch noch die Spleißvariante SR-BII, auf die hier aber nicht weiter eingegangen werden soll (Husemann et al., 2002).

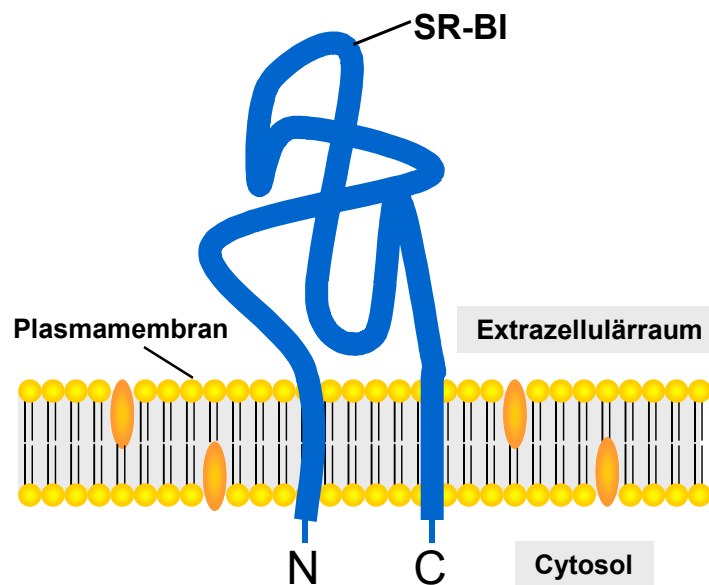


Abb. 7: Strukturmodell von SR-BI.

Erläuterungen im Text (Abb. adaptiert aus Connelly et al., 1999).

Scavenger Rezeptor der Klasse B Typ I (SR-BI)

Dieser stark glykosylierte Transmembranrezeptor mit zwei Transmembrandomänen sowie einer großen extrazellulären Schleife wird u.a. im Gehirn exprimiert und hat ein apparentes Molekulargewicht von 82-84 kDa (Connelly *et al.*, 1999)(vergl. Abb. 7). Er ist aber auch in anderen Geweben zu finden, die eine erhöhte Produktion von oder Bedarf an Cholesterol

aufweisen. SR-BI bindet neben einem großen Spektrum polyanionischer Liganden auch modifizierte und native LDL, VLDL, lipidiertes Apo AI sowie HDL. Wegen seiner hohen Bindungsaffinität zu HDL wird er auch als HDL-Rezeptor bezeichnet (Krieger, 2001). Er vermittelt die selektive Aufnahme von Cholesterol und Cholesterylestern aus den gebundenen HDL in die Zelle. Die HDL-assoziierten Apolipoproteine werden bei diesem Vorgang nicht internalisiert (Ji et al., 1999; Swarnakar et al., 1999). Für die selektive Lipidaufnahme scheint die unmittelbare räumliche Nähe zwischen Partikel und Zellmembran notwendig zu sein, wobei der genaue Mechanismus jedoch noch unbekannt ist (Husemann *et al.*, 2002). Die Rolle von SR-BI beim reversen Cholesteroltransport und der Aufnahme von Cholesterol und Cholesterylestern in die Leber wurde bereits in Abschnitt 1.2. erwähnt. Neben der Aufnahme von Cholesterylestern scheint SR-BI aber auch den Efflux von Cholesterol zu ermöglichen (Llera-Moya et al., 1999).

In Gehirn wird SR-BI überwiegend von Mikroglia und Astrozyten exprimiert, wobei die Expression in den Mikroglia postnatal stark abnimmt. Eine Expression durch die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke wurde ebenfalls diskutiert. (Husemann and Silverstein, 2001; Husemann *et al.*, 2002). Analog zu seiner Funktion im reversen Cholesteroltransport zur Leber, könnte SR-BI auch eine ähnliche Funktion im Gehirn haben (Husemann *et al.*, 2002). Er könnte die Aufnahme von Cholesterol und Cholesterylestern aus Liquor-Lipoproteinen in Astrozyten vermitteln und so am Recycling neuronalen Cholesterols beteiligt sein (siehe auch Abschnitt 1.1.). Für SR-BI wurde auch eine Rolle bei der Alzheimer Pathogenese diskutiert. Die bisherigen Daten sind jedoch nicht konsistent. Auch wurde die Frage diskutiert, ob SR-BI neben der selektiven Aufnahme von Lipiden aus Lipoproteinen auch die Endozytose der Lipoproteine selbst vermitteln kann. Aber auch dies wird bisher noch kontrovers diskutiert.

1.5. Apolipoprotein E-Recycling

Auf die Rolle des Apolipoproteins E (Apo E) bei Aufrechterhaltung der Lipidhomeostase im Plasma und im Liquor cerebrospinalis wurde bereits in den Abschnitten 1.1. und 1.2. eingegangen. Ebenso wurden die Biogenese und die strukturellen Eigenschaften des Proteins sowie die Apo E-bindenden Rezeptoren in Abschnitt 1.3. und 1.4. vorgestellt. An dieser Stelle soll auf die intrazelluläre Prozessierung des Apo E eingegangen werden.

Die Untersuchungen zum Apo E-Recycling erfolgten überwiegend mit triglyzeridreichen Lipoproteinen in nicht neuronalen Zellsystemen (Heeren *et al.*, 2006b), so dass das in Abb. 8 vorgestellte Apo E-Recycling nur als grundlegendes Modell für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente zu verstehen ist.

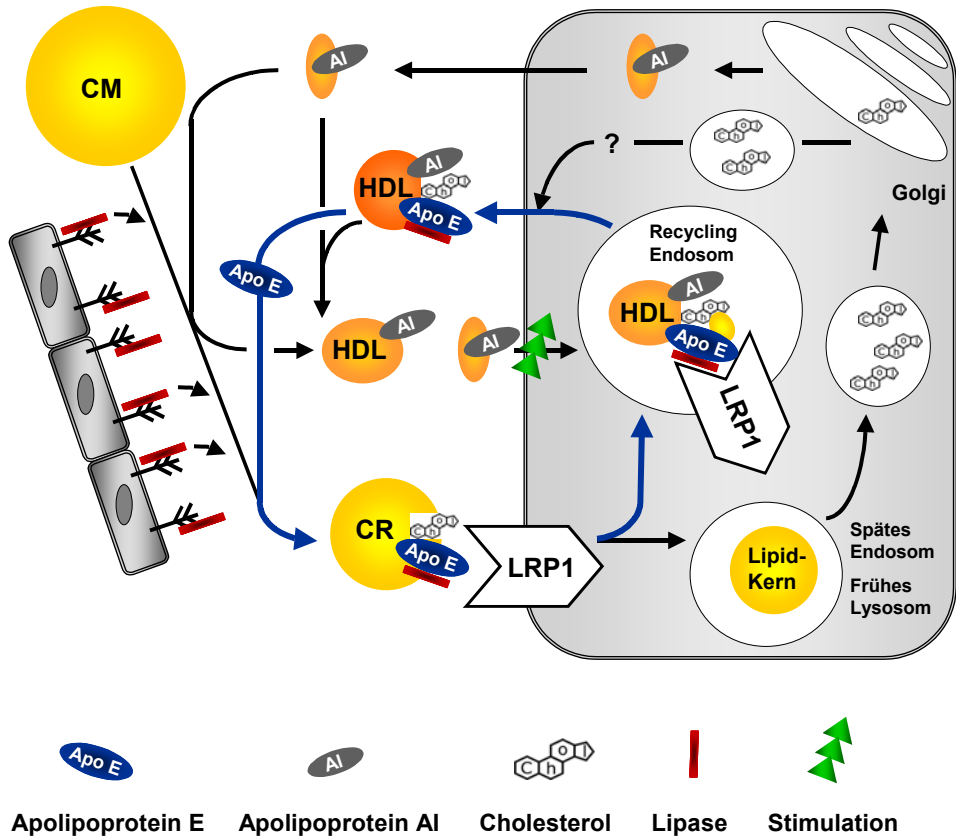


Abb. 8. Modell des Apo E-Recyclings.

Erläuterungen im Text (Abb. adaptiert aus Heeren et al., 2006)

Endozytose Apo E-haltiger Lipoproteine

Triglyzeridreiche Plasma Lipoproteine (TRL) aus dem exogenen und endogenen Lipoproteinstoffwechsel (Chylomikronen und VLDL) werden im Blutkreislauf rasch durch die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert. Dabei assoziiert die Lipase an die Partikel und generiert CR und IDL. Diese Remnantpartikel werden auf ihrem Weg durch den Blutkreislauf mit Apo E angereichert, welches sie von Apo E-haltiger HDL übernehmen. Die Partikel werden vor der Aufnahme in die Leber zunächst im Disse-Raum (Einstülpungen in der Leberoberfläche) durch die Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane (HPSG) auf der Zelloberfläche retardiert. Die rasche Endozytose der Remnant-Partikel kann dann auf zwei Wegen vermittelt werden. Zum einen über die Bindung von Apo E und LPL an LRP1 (CR), zum anderen über die Bindung von Apo-B100 und Apo E an den LDL-Rezeptor (IDL) (Beisiegel *et al.*, 1989;Mahley and Ji, 1999;Heeren et al., 2002;Merkel et al., 2002). Beide Rezeptoren sind so an der Entfernung der Remnantpartikel aus der Blutbahn beteiligt. Untersuchungen in verschiedenen murinen Tiermodellen haben jedoch gezeigt, dass LRP1 überwiegend für die Aufnahme von TRL-Remnantpartikeln aus dem exogenen

Lipoproteinstoffwechsel (CR) verantwortlich ist und keine signifikante Rolle bei der Aufnahme von TRL aus dem endogenen Lipoproteinstoffwechsel (IDL) spielt.

Intrazelluläre Prozessierung der Apo E-haltigen Lipoproteinpartikel

Die intrazelluläre Prozessierung von TRL-Remnantpartikeln divergiert vom klassischen Abbauweg internalisierter LDL. Während LDL nach ihrer Endozytose über den LDL-Rezeptor rasch lysosomal degradiert werden (Brown *et al.*, 1986), scheint dies für TRL-Partikel nur in begrenztem Maße zuzutreffen. Ihr Transfer in lysosomale Kompartimente scheint retardiert zu sein und insbesondere das assoziierte Apo E wird nicht proteolytisch abgebaut (Lombardi *et al.*, 1993;Rensen *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen ließen Rensen *et al.* zu dem Schluss kommen, dass das Apo E der lysosomalen Degradation durch Resekretion entgeht. Weitergehende Untersuchungen haben zeigen können, dass die einzelnen Lipid- und Proteinkomponenten der TRL einer unterschiedlichen intrazellulären Prozessierung unterliegen. Während Apo B und die in den TRL enthaltenen Lipide in lysosomale Kompartimente gelangen, werden das Apo E, Apo C und die LPL zurück zur Zelloberfläche dirigiert, wo es zu ihrer Resekretion kommt (Heeren *et al.*, 1999;Heeren *et al.*, 2001). In Bezug auf das Apo E kamen verschiedene Untersuchungen übereinstimmend zu dem Schluss, dass bis zu 60% des endozytierten Apo E auf diese Weise wiederverwendet (recycelt) wird (Fazio *et al.*, 1999;Rensen *et al.*, 2000;Heeren *et al.*, 2001;Swift *et al.*, 2001).

Apolipoprotein E-Recycling

Der intrazelluläre Recyclingweg von TRL-assoziiertem Apo E wurde wie folgt beschrieben. Die Apo E-haltigen TRL-Partikel desintegrieren in peripheren Sortierungs-Endosomen (sorting endosomes), und das freigesetzte Apo E gelangt in Recycling-Endosomen, von wo aus es retroendozytiert werden kann (Heeren *et al.*, 2001). Der Großteil des Apo E der endozytierten TRL wird wahrscheinlich aus solchen peripheren endosomalen Kompartimenten resekretiert. Diese weisen ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster auf (Heeren *et al.*, 1999).

Die genauere Untersuchung des Apo E-Recyclings offenbarte seine enge Verknüpfung mit dem HDL-Metabolismus der Zelle. Es zeigte sich, dass HDL-Partikel oder lipidarmes Apo AI notwendig sind, um das Apo E-Recycling in verschiedenen nicht-neuronalen Zellen wie z.B. Hepatozyten und Fibroblasten zu stimulieren (Heeren *et al.*, 1999;Rensen *et al.*, 2000;Heeren *et al.*, 2003).

Apolipoprotein E-Recycling und Cholesterol-Efflux

HDL und Apo E sind unabhängig voneinander in der Lage, den Efflux von Cholesterol aus der Zelle zu vermitteln (von Eckardstein et al., 2001). Das Apo E-Recycling scheint jedoch diese beiden Möglichkeiten zur zellulären Cholesterolsekretion miteinander zu verknüpfen.

In Hepatozyten konnte gezeigt werden, dass Apo AI aus HDL mit Apo E und Cholesterol in frühen endosomalen Kompartimenten kolokalisiert. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass das Apo AI in bereits existierenden Apo E- und cholesterohaltige Endosomen dirigiert wird und das Apo E-Recycling und den damit assoziierten Cholesterolefflux stimuliert (Heeren *et al.*, 2003;Hasty et al., 2005). Die Exkretion des recycelten Apo E und des assoziierten Cholesterols erfolgt dabei in Form von kleinen HDL-Partikeln (Hasty *et al.*, 2005).

Lipoproteinrezeptoren und das Apo E-Recycling

Wie bereits erwähnt sind sowohl der LDL-R als auch LRP1 an der Aufnahme der Apo E-haltigen Remnantpartikel in die Leber beteiligt. Die Aufnahme der TRL-Remnants aus dem exogenen Lipoproteinstoffwechsel (CR) scheint jedoch prädominant von LRP1 vermittelt zu werden. Die Tatsache, dass LRP1 mit dem internalisierten Apo E und Cholesterol in den frühen endosomalen Kompartimenten assoziiert bleibt, favorisiert die These, dass LRP1 wahrscheinlich eine entscheidende Rolle beim Apo E-Recycling zukommt (Heeren *et al.*, 2006b).

Einfluss der Apo E-Isoform auf das Apo E-Recycling

Wie in Abschnitt 1.3. bereits dargestellt, existiert das Apo E in den drei Hauptisoformen Apo E2, E3 und E4. Die Bindungsaffinität der Apo E2-Isoform zum LDL-R ist stark reduziert, wohingegen die Bindungsaffinitäten von Apo E3 und E4 zu LDL-R und LRP1 nahezu identisch sind. Für Apo E4 lässt sich allenfalls eine leicht erhöhte Bindungsaffinität konstatieren (Heeren *et al.*, 2006b).

Dennoch zeigen epidemiologische Untersuchungen, dass Apo E3 und E4 sehr unterschiedliche Effekte auf den Lipoproteinstoffwechsel haben. So steht Apo E4 mit atherosklerotischen Erkrankungen sowie der Alzheimer Krankheit in Verbindung (Davignon et al., 1988;Roses, 1996). Die zellulären Mechanismen, die diesem Unterschied von Apo E3 und Apo E4 zugrunde liegen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

Ein isoformspezifisches Apo E-Recycling könnte ein Hinweis auf diese zellulären Mechanismen sein. Tatsächlich ist für Apo E4 im Vergleich zu Apo E3 ein reduziertes Recycling zu beobachten. In Hepatozyten führt dies auch zu einem verringerten Cholesterolefflux und damit zu einer intrazellulären Cholesterolakkumulation (Heeren *et al.*, 2003;Heeren et al., 2004).

Eine mögliche molekulare Erklärung für diese Beobachtung könnten die bereits in Abschnitt 1.3. erläuterten physikochemischen Unterschiede zwischen Apo E3 und E4 sein. So bindet Apo E4 aufgrund einer nur bei dieser Isoform möglichen Interdomäneninteraktion präferentiell große Lipoproteine. Da das Apo E-Recycling jedoch in der Resekretion von kleinen HDL-ähnlichen Lipoproteinen resultiert, könnte diese Präferenz von Apo E4 die Assoziation mit internalisiertem Apo AI und Cholesterol zu den resekretierten HDL_E erschweren. Die Folge wäre das beobachtete verringerte Recycling und der damit verbundene reduzierte Cholesterol-Efflux (Heeren *et al.*, 2006b).

Eine weitere molekulare Ursache für das verringerte Apo E4-Recycling könnte die beobachtete geringere Stabilität von Apo E4 sein (Mahley *et al.*, 2006). So denaturiert es bei pH-Wert- und Temperaturänderungen leichter als Apo E3, was dazu führen könnte, dass Apo E4 nicht aus den Sortierungsendosomen in die Recyclingendosomen gelangt, sondern in die lysosomalen Kompartimente dirigiert und degradiert wird (Heeren *et al.*, 2006b).

Apo E-Recycling im Gehirn und seine mögliche pathologische Implikation

Wie bereits in Abschnitt 1.3. erwähnt, ist das Apo E4 ein Risikofaktor für die Entwicklung der Alzheimer Krankheit. Die zellulären Mechanismen, die diesen pathologischen Effekt von Apo E4 im Gehirn vermitteln, sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Es konnte *in vitro* und in Tiermodellen gezeigt werden, dass Apo E4 sowohl direkt als auch indirekt die Ablagerung des Alzheimer-Peptids A β fördert und auch die pathologische Hyperphosphorylierung des tau-Proteins begünstigt, was ebenfalls in der Bildung von cytotoxischen Proteinablagerungen im Gehirn resultiert (Mahley *et al.*, 2006).

Zunehmend wird jedoch auch eine mögliche Dysregulation der cerebralen Cholesterolhomeostase durch Apo E4 als mögliche Ursache für den negativen Effekt dieser Isoform auf die Pathogenese der Alzheimer Krankheit diskutiert. Besonderes Gewicht bekommt diese Diskussion vor dem Hintergrund epidemiologischer Studien, die zeigen, dass der Einsatz cholesterolsenkender Medikamente (Statine) das Risiko für die Entwicklung einer Alzheimer Krankheit reduzieren kann (Jick *et al.*, 2000; Wolozin *et al.*, 2000). Obwohl diese retrospektiven Studien noch durch prospektive Studien validiert werden müssen, gibt es bereits erste Hinweise auf molekularer Ebene, wie sich eine Dysregulation der cerebralen Cholesterolhomeostase auf die Pathogenese der Alzheimer Krankheit auswirken könnte.

So konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) zum Alzheimer-Peptid A β cholesterolsensitiv ist. *In vitro* befördert ein hoher intrazellulärer Cholesterolspiegel die Bildung von A β indem die Aktivität der beteiligten Sekretasen (β - und γ -Sekretase) verstärkt ist. Ein niedriger intrazellulärer Cholesterolspiegel begünstigt dagegen die nicht-pathogene Prozessierung von APP indem die Aktivität der an dieser Prozessierung

beteiligten Sekretase (α -Sekretase) verstärkt ist (Vance et al., 2005). Eine detaillierte Beschreibung des APP und seiner Prozessierung erfolgt in Abschnitt 1.6..

Wie könnte nun Apo E4 seinen pathogenen Effekt auf die zelluläre Cholesterohomeostase vermitteln?

Eine Hypothese ist, dass Apo E auch in Neuronen einem isoformspezifischen Recycling unterliegt und analog der Ergebnisse der Untersuchungen in nicht-neuronalen Zellen, ein vermindertes Recycling von Apo E4 mit einem reduzierten Cholesterol-Efflux assoziiert ist. Der daraus resultierende erhöhte intrazelluläre Cholesterolspiegel könnte in beschriebener Weise die Bildung des Alzheimer-Peptids A β befördern.

Die Untersuchung des Apo E-Recyclings in neuronalen Zellen könnte daher einen wichtigen Beitrag zur Identifizierung eines möglichen Bindegliedes zwischen epidemiologischen Erkenntnissen auf der einen und den Beobachtungen auf der molekularen Ebene der APP-Prozessierung auf der anderen Seite leisten.

1.6. Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP)

Das Amyloid-Vorläuferprotein (Amyloid precursor protein, APP) ist ein glykosyliertes ~130 kDa großes Klasse I Transmembranprotein. Seine biologische Funktion ist noch weitgehend unbekannt. Es ist zunächst als Rezeptor beschrieben worden. Der einzige bisher gut beschriebene Ligand ist das F-Spondin, ein Signalmolekül, das eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung und Regeneration spielt (Ho and Sudhof, 2004).

Größere Bekanntheit erlangte das APP durch seine pathogene Wirkung im Zusammenhang mit der Alzheimer Erkrankung. Die in den Gehirnen von Alzheimer Patienten gefundenen charakteristischen extrazellulären Ablagerungen, die amyloiden Plaques, resultieren initial aus der Aggregation eines 4 kDa großen A β -Peptides, welches durch eine sequentielle Proteolyse aus dem APP freigesetzt werden kann. Neben dieser amyloidogenen Prozessierung des APP ist auch eine nicht-amyloidogene Prozessierung möglich (Nunan and Small, 2000; Eehalt et al., 2003)(vergl. Abb. 9).

Die amyloidogene Prozessierung wird durch eine Spaltung in der Außendomäne des Proteins eingeleitet. Diese wird durch die β -Sekretase vermittelt und resultiert in einem membranständigen C-terminalen Fragment (β -CTF) mit einem apparenten Molekulargewicht von ~11 Da und in einem löslichen N-terminalen Fragment (s β APP). Das entstandene β -CTF ist Substrat für die γ -Sekretase, welche das A β -Peptid sowie die APP-Intrazellulärdomäne (AICD) freisetzt. Der γ -Sekretase-Schnitt erfolgt dabei aus bisher noch unbekanntem Gründen nicht exakt an einer bestimmten Konsensussequenz, sondern variiert um wenige Aminosäuren, so dass A β -Peptide unterschiedlicher Länge entstehen (A β 39 – A β 43

Aminosäuren). Untersuchungen haben gezeigt, dass der pathogene Effekt von A β prädominant von A β 42 und A β 43 vermittelt wird (Nunan *et al.*, 2000). Bisher ist jedoch noch strittig, ob die histologisch auffälligen amyloidogenen Plaques oder niedermolekulare A β -Aggregate die neurotoxische Wirkung vermitteln. Alternativ zu dieser amyloidogenen Prozessierung kann die nicht-amyloidogene Prozessierung des APP erfolgen. Hierbei wird die erste proteolytische Spaltung in der Außendomäne des Proteins durch eine α -Sekretase vermittelt, wobei ein im Vergleich zur amyloidogenen Prozessierung verkürztes C-terminales (α -CTF) Fragment von ~9kDa sowie ein größeres lösliches Fragment ($s\alpha$ APP) entsteht. Der α -CTF ist wiederum ein Substrat für die γ -Sekretase, welche p3-Peptid und die APP-Intrazellulärdomäne (AICD) freisetzt. Sowohl die löslichen Fragmente ($s\alpha$ APP und $s\beta$ APP) als auch das p3-Peptid und die APP-Intrazellulärdomäne (AICD) sind nicht amyloidogen, d.h. sie aggregieren nicht und werden rasch proteolytisch degradiert.

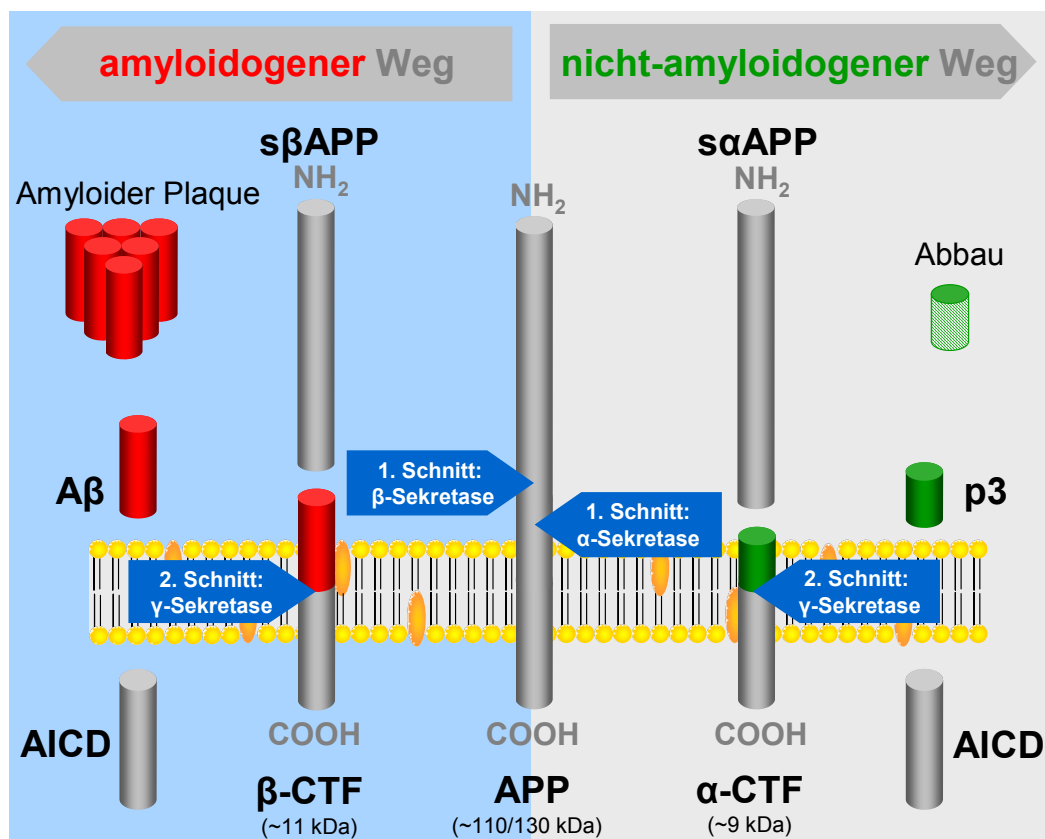


Abb. 9. Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP).

APP – Amyloid-Vorläuferprotein; **$s\alpha$ APP** und **$s\beta$ APP** – lösliche N-terminale APP-Fragmente nach α - bzw. β -Sekretase-Schnitt; **α -CTF** und **β -CTF** – C-terminale APP-Fragmente nach α - bzw. β -Sekretase-Schnitt; **AICD** – APP-Intrazellulärdomäne nach γ -Sekretase-Schnitt; **A β** – A β -Peptid nach β - und γ -Sekretase-Schnitt; **p3** – p3-Peptid nach α - und γ -Sekretase-Schnitt. Weitere Erläuterungen im Text.

Alternativ zu dieser amyloidogenen Prozessierung kann die nicht-amyloidogene Prozessierung des APP erfolgen. Hierbei wird die erste proteolytische Spaltung in der Außendomäne des Proteins durch eine α -Sekretase vermittelt, wobei ein im Vergleich zur amyloidogenen Prozessierung verkürztes C-terminales (α -CTF) Fragment von ~9kDa sowie ein größeres lösliches Fragment ($s\alpha$ APP) entsteht. Der α -CTF ist wiederum ein Substrat für die γ -Sekretase, welche p3-Peptid und die APP-Intrazellulärdomäne (AICD) freisetzt. Sowohl die löslichen Fragmente ($s\alpha$ APP und $s\beta$ APP) als auch das p3-Peptid und die APP-Intrazellulärdomäne (AICD) sind nicht amyloidogen, d.h. sie aggregieren nicht und werden rasch proteolytisch degradiert.

Neuere Untersuchungen haben, wie bereits erwähnt gezeigt, dass die APP-Prozessierung cholesterolsensitiv ist. Ein hoher intrazellulärer Cholesterolspiegel verstärkt die amyloidogene APP-Prozessierung durch Stimulation der β - und γ -Sekretase bei gleichzeitiger Inhibition der α -Sekretase (Bodovitz and Klein, 1996; Simons et al., 1998; Wahrle et al., 2002). Wie dieser Cholesteroleffekt auf die Sekretasen vermittelt wird, ist jedoch noch weitgehend unklar.

Ein weiterer Zusammenhang zwischen APP-Prozessierung und intrazellulärer Cholesterohomeostase konnte in neueren Untersuchungen gezeigt werden. Es wurde nachgewiesen, dass das A β -Peptid in der Lage ist, die endogene Cholesterolsynthese zu hemmen. A β soll dabei inhibierend auf die bereits erwähnte HMG-CoA-Reduktase wirken, einem Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese (Grimm et al., 2005).

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass die Prozessierung des murinen APP nahezu vollständig auf dem nicht-amyloidogenen Weg erfolgt. Ursache ist eine Abweichung in der Aminosäuresequenz im Vergleich zum humanen Homolog von 17 Aminosäuren. Drei der Aminosäuresubstitutionen sind in der A β -Sequenz in der Nähe der β -Sekretase-Schnittstelle lokalisiert. Diese scheinen eine Prozessierung durch die β -Sekretase zu erschweren, so dass die nicht-amyloidogene Prozessierung präferiert wird (De Strooper et al., 1995).

Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses der Apolipoprotein E-Isoformen auf den Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung soll zunächst ein neuronales Zellsystem ausgewählt und charakterisiert werden, welches das Studium der Apolipoprotein E-vermittelten Aufnahme von Lipoproteinpartikeln zulässt. Parallel dazu sollen Modell-Liganden präpariert und charakterisiert werden, die anstelle humaner Lipoproteine des Liquor cerebrospinalis eingesetzt werden können.

Im Fokus der Untersuchungen steht dabei die Frage, ob es in neuronalen Zellen zu einem isoformspezifischen Recycling des Apolipoprotein E kommt, wie es für nicht-neuronale Zellen beschrieben wurde. Insbesondere soll geprüft werden, ob die Apo E-Isoform E4 auch in den neuronalen Zellen einem reduzierten Recycling unterliegt und ob dies analog zu den nicht-neuronalen Zellen zu einer intrazellulären Cholesterolakkumulation führt.

Ein erhöhter intrazellulärer Cholesterolspiegel ist mit einer verstärkten amyloidogenen Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) assoziiert, wodurch die Pathogenese der Alzheimer Erkrankung gefördert wird. Da Apo E4 einen Risikofaktor für diese neurodegenerative Erkrankung darstellt, soll der potentielle Zusammenhang zwischen Apo E4-Recycling, Cholesterolakkumulation und APP-Prozessierung geprüft werden.

2. Material und Methoden

Vorbemerkungen

Alle nicht näher spezifizierten Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Fluka Chemika (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva Electrophoresis (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim) in analytischer Qualität bezogen.

Ebenso wurden alle Verbrauchsmaterialien (Reaktionsgefäße, Pipetten, Pipettenspitzen etc.) sofern nicht anders angegeben von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Kremsmünster, A) und BD Biosciences (Erembodegem, B) bezogen. Konzentrationsangaben erfolgen in Molariät oder aus Praktikabilitätsgründen in % (w/v) bei Feststoffen und % (v/v) bei Flüssigkeiten.

2.1. Zellbiologische Arbeiten

2.1.1. Zellkultur

Geräte

- sterile Werkbank Hera Safe (Heraeus, Hanau)
- CO₂-Brutschrank CB210 (Binder, Tuttlingen)
- CASY[®] Cell Counter + Analyser System Model TT (Schärfe System, Reutlingen)

Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur stammten von der Firma Nunc (Wiesbaden):

- Zellkulturflaschen mit 80 und 175 cm² Oberfläche (Art.-Nr. 178891 und 178883), Nuncolon[®] Oberfläche.
- Multischalen mit 6, 12 und 24 Vertiefungen (Art.-Nr. 140675, 150628 und 142475), Nuncolon[®] Oberfläche.
- Zellschaber 32 cm (Art.-Nr. 179707).
- Runde Deckgläschen (= Cover Slips), 13 mm Ø, Assistent (Sondheim).

Zellkulturmedien und Zusätze

Alle verwendeten Zellkulturmedien stammten von der Firma Gibco (Marke der Firma Invitrogen, Karlsruhe). Der Übersichtlichkeit halber werden die einzelnen Medien zusammen

mit den eingesetzten Zell-Linien genannt (s.u.). Allgemein kamen jedoch folgende Lösugen zum Einsatz:

- Natrium-Phosphat-Puffer (PBS), Gibco (Art.-Nr. 14190-094).
- Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (P/S) (10.000 units/ml), Gibco (Art.-Nr. 15140-122), Endkonzentration in der Zellkultur 100 units/ml.
- Ciprofloxacin, Bayer (Leverkusen), Endkonzentration in der Zellkultur 0,01 mg/ml.
- Trypsin-EDTA-Lösung (1x), Gibco (Art.-Nr. 25300-054).
- Fötales Rinderserum (FBS), Gibco (Art.-Nr. 10270-106).
- Lipoprotein-defizientes Rinderserum (LPDS), zur Verfügung gestellt von Herrn PD Dr. Jörg Heeren.

Zell-Linien

Folgende eukaryotische Zell-Linien wurden kultiviert.

Zell-Linie	Kulturmedium	Spezies/ Gewebe	Erstbeschreibung
HT-22	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), 4500 mg/l Glukose, GlutaMAX, Pyruvat, Gibco (Art.-Nr. 31966-021) ➤ 10 % FBS, Gibco ➤ 1 % P/S, Gibco 	Maus (<i>Mus musculus</i>), immortalisierte hippocampale Zell-Linie, monoklonal	(Morimoto and Koshland, Jr., 1990; Maher and Davis, 1996)
Neuro2a	<ul style="list-style-type: none"> ➤ DMEM, 4500 mg/l Glukose, Pyruvat Gibco (Art.-Nr. 31966-021) ➤ 10 % FBS, Gibco ➤ 1 % P/S, Gibco 	Maus (<i>Mus musculus</i>), monoklonale Neuroblastomzell-Linie	(Olmsted et al., 1970), ATCC-Nr. CCL 131
LA-N-5	<ul style="list-style-type: none"> ➤ RPMI 1640-Medium, Gibco (Art.-Nr. 61870-010) ➤ 10 % FBS, Gibco ➤ 1 % P/S, Gibco 	Mensch (<i>Homo sapiens</i>), monoklonale Neuroblastomzell-Linie	(Seeger et al., 1982)

Methode

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (Nunc, 80 cm²) bei 37°C und 5% CO₂ unter den o.g. Bedingungen. Die Zellen wurden in der Regel bis zum Erreichen einer 80%igen Konfluenz (etwa alle 2-3 Tage) propagiert. Für eine weitere Kultivierung bzw. die Verwendung in einem zellbiologischen Assay, wurden die Zellen mit PBS (Gibco) gewaschen und durch anschließende Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco) abgelöst.

Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde der enzymatische Prozess dann inhibiert und die Zellsuspension auf neue Zellkulturflaschen verteilt bzw. für zellbiologische Assays eingesetzt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte dabei stets mit dem automatischen Zell-Zähler der Firma Schärfe.

2.1.2. Gewinnung von Zell-Lysaten

Geräte

- Tischzentrifuge 1-15K (Sigma, Osterode)

Lösungen

- PBS, Gibco (Art.-Nr. 14190-094)
- Zell-Lysispuffer (2 mM CaCl₂, 20 mM NaCl, 1% Triton X100, Tris pH 8,0 in A. dest.)
- Protease-Inhibitor-Cocktail, Complete-Mini, Roche (Mannheim, Art.-Nr.11836153001)

Methode

Für die Präparation von Zell-Lysaten wurden die Zellen bis zu einer 80%igen Konfluenz in Zellkulturflaschen (Nunc, 80 cm²) kultiviert und dann auf Eis zweimal mit PBS (4 °C) gewaschen. Nach Zugabe von weiteren 2 ml PBS erfolgte die mechanische Ablösung der adhärennten Zellen mittels eines Zellschabers. Die gewonnene Zellsuspension wurde für 5 Min. bei 13.000 U/min (4°C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Resuspendierung des Zellpellets erfolgte in 300 µl Zell-Lysispuffer durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren (40mal). Der anschließenden 10minütige Inkubation auf Eis folgte eine erneute Zentrifugation bei 13.000 U/min (4°C) für 20 Min. Der Überstand (Zell-Lysat) wurde abgenommen, mit Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt und bis zu seiner weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

2.1.3. Immunhistochemie

Geräte

- Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 mit Objektiven Plan-NEOFLUAR 10x/0,30 440330; Plan-NEOFLUAR 20x/0,50 ∞/0,17; Ph3 Plan-NEOFLUAR 40x/1,30 Oil ∞/0,17; Ph3 Plan-APOCHROMAT 63x/1,4 Oil ∞/0,17; Ph3 Plan-APOCHROMAT 100x/1,4 Oil ∞/0,17; Kamera AxioCam color und Software Axio Vision Viewer (Carl Zeiss)
- Konfokales Mikroskop LSM 510 Meta (Carl Zeiss) mit Objektivausstattung s.o. und Steuersoftware LSM 5 Image Browser.

Lösungen

- Fixierlösung (4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS)
- Permeabilisierungslösung (0,5% Glycin, 0,1% Saponin in PBS, pH 7,4)
- Blockierungslösung (0,5% Glycin, 0,1% Saponin, 1% bovines Serum-Albumin (BSA))
- DAPI-Färbelösung (10 µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenyl-indol (DAPI) in PBS)
- Enbettmedium, Fluoromount-G™ (Southern Biotech, Birmingham, USA)
- Heparinlösung, Liquemin® (Roche) (200 Internationale Einheiten/ml in PBS)

Antikörper

Aus Praktikabilitätsgründen erfolgt an dieser Stelle die gemeinsame Auflistung der für die Immunhistochemie und die Western Blot Untersuchungen (s.u.) eingesetzten primären und sekundären Antikörper. Einige der genannten Antikörper fanden für beide Methoden Verwendung.

Primäre Antikörper					
Antikörper	Typ/ Wirt	Hersteller/Quelle	IHC/Verd.	WB/Verd.	Bemerkung
Lipoproteinrezeptoren					
αLRP1	mono/ Maus	Progen (Art.-Nr. 61067), Klon 8B8	1:50	1:100	erkennt 85 kDa β- Kette (damit auch 600 kDa Holorezeptor)
αLDL-R	poly/ Huhn	Progen (Art.-Nr. 61049)	1:50	1:50	erkennt 160 kDa Holorezeptor
αVLDL-R	mono/ Maus	PD Dr. Heeren, Klon 6A6 (ATCC-Nr. CRL-2197)	-----	1:100	110 kDa Bande
αgp330	poly/ Kan.	Dr. Willnow (MDC Berlin), D6 11	-----	1:1000	600 kDa Bande
αSR-BI	poly/ Kan.	Dr. Fuchart (Paris)	-----	1:2000	82 kDa Bande
αSorLA	poly/ Kan.	PD Dr. Hampe	-----	1:3000	erkennt intrazelluläre Domäne von SorLA, 300 kDa Bande
Apolipoprotein					
αApo E	poly/ Kan.	Dako (Art.-Nr. A 0077)	1:500	1:5000	erkennt humanes Apo E (34 kDa)
Neuronale Markerproteine					
αtau	poly/ Kan.	Dako (Art.-Nr. A 0024) KJ9A	1:100	1:3000	erkennt div. tau- Isoformen (auch phosphorylierte, 42- 69 kDa im Maushirn)
αGFAP	mono/ Maus	Sigma (Art.-Nr. G-3893)	-----	1:500	50 kDa Bande (Gliazell-Marker)
αMAP2	mono/ Maus	Sigma (Art.-Nr. M-4403)	-----	1:500	erkennt MAP2a+b (200 kDa) sowie MAP2c (70 kDa)
αAPP (C-Term.)	poly/ Kan.	Calbiochem (Art.-Nr. 171610)	-----	1:5000	erkennt APP-α-CTF (9 kDa), β-CTF (11 kDa), γ-CTF (6 kDa) sowie Holo-APP (110 + 130 kDa)

αAPP (N-Term.)	mono/ Maus	Chemicon (Art.-Nr. MAB348)	-----	1:200	erkennt Holo-APP (110 + 130 kDa) und lösliche APP- Fragmente (α + β APP 120 kDa)
Sonstige					
$\alpha$$\beta$-Aktin	mono/ Maus	Sigma (Art.-Nr. A5441)	-----	1:10000	42 kDa Bande

Sekundäre Antikörper					
Antikörper	Typ/ Wirt	Hersteller/Quelle	IHC/Verd.	WB/Verd.	Bemerkung
Fluoreszenzmarkierte Antikörper					
dαrCy2	poly/ Esel	Jackson (Art.-Nr. 711-226- 152)	1:250	-----	erkennt Fc-Teil von Kaninchen IgG
dαmCy3	poly/ Esel	Jackson (Art.-Nr. 715-166- 151)	1:250 / 1:500	-----	erkennt Fc-Teil von Maus IgG
dαchCy3	poly/ Esel	Jackson (Art.-Nr. 703-166- 155)	1:500	-----	erkennt Fc-Teil von Huhn IgY (IgG)
Peroxidase gekoppelte Antikörper					
gαrPO	poly/ Ziege	Jackson (Art.-Nr. 111-035- 144)	-----	1:5000	erkennt Fc-Teil von Kaninchen IgG
gαmPO	poly/ Ziege	Jackson (Art.-Nr. 115-035- 146)	-----	1:5000	erkennt Fc-Teil von Maus IgG
dαchPO	poly/ Esel	Jackson (Art.-Nr. 703-035- 155)	-----	1:2500	erkennt Fc-Teil von Huhn IgY (IgG)
<p>IHC = Immunhistochemie, WB = Western Blot, poly = polyklonal, mono = monoklonal, r,Kan. = rabbit ,Kaninchen, m = mouse (Maus), ch = chicken (Huhn), d = donkey (Esel), g = goat (Ziege), PO = Peroxidase gekoppelt, α = anti</p>					

Methoden

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Zellen nach dem Trypsinieren in Multischalen auf Deckgläschen ausgesetzt. Nachdem die Zellen über Nacht angewachsen waren, erfolgte nach einer einstündigen Hungerphase (Medium ohne weitere Zusätze) die Inkubationen mit verschiedenen Liganden (Details sind der Beschreibung der einzelnen Experimente zu entnehmen). Nach Beendigung der Ligandeninkubation wurden die Zellen mindestens zweimal gewaschen (zunächst mit Heparinlösung oder Heparin-Medium, dann mit PBS). Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen durch 10minütige Inkubation mit Fixierlösung. Nach dem Entfernen der Fixierlösung und dem zweimaligen Waschen mit PBS konnten die Zellen für die Immundetektion vorbereitet werden. Einer 15minütigen Inkubation mit Permeabilisierungslösung folgte eine 30minütige Inkubation mit Blockierungslösung. Im Anschluss erfolgte die einstündige Inkubation mit den primären Antikörpern, welche mit Blockierungslösung auf die entsprechende Konzentration verdünnt wurden. Nach dem Waschen der Zellen (zweimal 10 Min. mit Blockierungslösung und einmal 5 Min. mit PBS) erfolgte die ebenfalls einstündige Inkubation mit den sekundären Antikörpern, wobei in den letzten 20 Min. der Inkubation die DAPI-Färbelösung zugesetzt wurde. Abschließend wurde wiederum dreimal für je 5 Min. gewaschen (zunächst mit Blockierungslösung, anschließend zweimal mit PBS). Die Deckgläschen mit den „gefärbten“ Zellen wurden dann mittels Einbettmedium (Fluoromount-G™) auf Standard-Objektträgern fixiert.

2.2. Isolierung und Präparation der Liganden

2.2.1. Isolierung von Gesamt-HDL aus humanem Spenderblut

Geräte

- Ultrazentrifugen L-7 und Optima™ L-90K (Beckman-Coulter, Krefeld)
- Rotoren: Ausschwingrotor SW-41 (Beckman) mit den Zentrifugenröhrchen 14x89 mm (Beckman, Art.-Nr. 331372) sowie Festwinkelrotor T647.5 (Sorvall Instruments) mit den Zentrifugenröhrchen 90 ml (Sorvall, Art.-Nr. 03990)
- Kühlzentrifuge 6K15 (Sigma, Osterode) mit Rotor 177/01 und Einsatz 18016
- Abbe-Refraktometer AR10 (Schmidt+Haensch, Berlin)
- Ärometer (nach spez. Gewicht), 1,0 – 1,5 g/ml
- Spektralphotometer SmartSpec™3000 (BioRad, USA); Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma, Müllheim)

Material

- Blutentnahme Set Multifyl® (Sarstedt, Art.-Nr. 85.1638.035)

- EDTA-Blutentnahmeröhrchen (Plasma) S-Monovette® (Sarstedt, Art.-Nr. 02.1066.001)
- Einmalspritzen (Becton Dickinson, Heidelberg) mit 5, 10 und 20 ml Volumen
- Stumpfe Kanüle mit Olive
- Dialyseschlauch Visking® (Serva, Heidelberg, Art.-Nr. 44104), 6 mm Ø, Ausschlussmolekulargewicht 12-14 kDa. Vor der Verwendung durch kochen in A. dest. vom Glycerin befreit

Lösungen

- Dichtelösungen 1,006, 1,063, 1,019, 1,21, 1,25 g/ml (10 mM EDTA, 0,9 % NaCl, 10 mM Tris pH 8,6 sowie KBr für die Einstellung der entsprechenden Dichte)
- Natrium-Posphat-Puffer (PBS) (13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,81 mM KH₂PO₄, 0,15 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, pH 7,4)

Methode

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von humanen Plasma-Lipoproteinen diente Vollblut eines gesunden Spenders, welches als Nüchternblut gewonnen wurde. Der Spender war homozygot für das ε3-Allel des Apo E-Gens. Zu Beginn der Arbeit wurden auch Plasmaspenden aus der Blutbank des UKE (Abt. für Transfusionsmedizin) für die Gewinnung von Lipoproteinen herangezogen. Die daraus gewonnenen Lipoproteine wurden jedoch nur für die ersten Vorversuche und nicht für die späteren quantitativen Experimente eingesetzt.

Das Nüchternblut des Spenders wurde in EDTA-(Plasma)-Blutentnahmeröhrchen abgenommen (Gerinnungshemmung) und anschließend bei 4°C und 2000 g für 10 Min. in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wurde abgenommen und mit KBr auf eine Dichte von 1,23 g/ml eingestellt. Die hierfür einzuwiegende Menge KBr wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Menge KBr [g]} = \text{Volumen Plasma [ml]} \times (\text{gewünschte Dichte} - \text{vorhandene Dichte [g/ml]})$$

$$\text{-----}$$

$$1 - (0,312 \text{ ml/g} \times \text{gewünschte Dichte [g/ml]})$$

Unter der Annahme, dass humanes Plasma eine Dichte von 1,006 g/ml hat und die gewünschte Dichte 1,23 g/ml beträgt, ergibt sich folgende Formel:

$$\text{Menge KBr [g]} = \text{Volumen Plasma [ml]} \times (1,23 - 1,006 \text{ g/ml})$$

$$\text{-----}$$

$$1 - (0,312 \text{ ml/g} \times 1,23 \text{ g/ml})$$

Menge KBr [g] = Volumen Plasma [ml] x 0,22 g/ml

0,62

Menge KBr [g] = Volumen Plasma [ml] x 0,355 g/ml

Die berechnete Menge KBr wurde bei 4°C im Plasma gelöst und die erhaltene Dichte durch Vermessung im Abbe-Refraktometer überprüft. Als Referenzlösungen dienten dabei die verschiedenen Dichtelösungen (1,006 – 1,25 g/ml). Das eingestellte Plasma wurde nun in ein 90 ml Zentrifugenröhrchen (Sorvall) überführt. Hierbei wurden 50 ml Plasma vorgelegt, die dann vorsichtig mit 40 ml Dichtelösung (1,21 g/ml) überschichtet wurden. Im Anschluss erfolgte eine 20stündige Ultrazentrifugation (Zentrifuge Beckman, L-7) im Festwinkelrotor (Sorvall, T 647.5) bei 4°C und 38.000 U/min. Während dieses ersten Zentrifugationsschrittes flotieren alle Plasma-Lipoproteine, da die Dichte der dichtesten Lipoproteine (HDL) bei maximal 1,21 g/ml liegt. Gleichzeitig verbleiben jedoch andere Plasmabestandteile wie Fibrinogen, Serumalbumin etc. in Lösung oder sedimentieren. Nachdem die flotierten Lipoproteine abgenommen und resuspendiert worden waren, erfolgte eine erneute Dichtebestimmung mittels Abbe-Refraktometer. Für einen zweiten Zentrifugationsschritt (Gradienten-Zentrifugation) wurde die Lipoprotein-Emulsion erneut auf eine Dichte von 1,23 g/ml eingestellt und ein Gradient im Zentrifugenröhrchen 14x89 mm (Beckmann) geschichtet: 2 ml Dichtelösung (1,019 g/ml) wurde vorgelegt. Danach folgte eine Unterschichtung mit zunächst 4 ml Dichtelösung (1,063 g/ml), die wiederum mit 5 ml der eingestellten Lipoproteine unterschichtet wurde. Die anschließende Ultrazentrifugation (Zentrifuge Beckman, L-90K) erfolgte im Ausschwingrotor (SW-41) für 20 h bei 38.000 U/min und 4°C. Nach der Zentrifugation ergab sich im Zentrifugenröhrchen folgendes Bild (siehe auch Ergebnisteil): Die LDL- und HDL-Fraktion der Plasma-Lipoproteine wurden als deutliche Banden im Zentrifugenröhrchen sichtbar, wobei die obere Bande der LDL-Fraktion entsprach und die untere die Gesamt-HDL Fraktion darstellte. Die Banden wurden nun in verschiedene Röhrchen abgenommen und anschließend umgepuffert. Hierfür wurden die Lipoproteine in Dialyseschläuche gefüllt und für 24 h in 5l PBS dialysiert (zweimaliger Pufferwechsel). Im Anschluss erfolgte eine Kontrolle der Lipoprotein-Fraktionen in der SDS-PAGE mit anschließender Proteinfärbung (siehe 2.4.1. und 2.4.2.). Gleichzeitig wurde die Lipidzusammensetzung der Partikel bestimmt (siehe 2.3.). Die so gewonnene Gesamt-HDL diente als Ligand für einen Großteil der Experimente. Für einige der Versuche wurde jedoch die gewonnene Gesamt-HDL noch mittels Affinitätschromatographie (siehe 2.2.2.) in eine Apo E-freie und eine Apo E-haltige Subfraktion aufgetrennt.

2.2.2. Isolierung von Apo E-freier HDL

Geräte

- Kühlzentrifuge 6K15 (Sigma, Osterode) mit Rotor 177/01 und Einsatz 18016
- Spektralphotometer SmartSpec™3000 (BioRad, USA); Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma, Müllheim)
- Peristaltikpumpe (LKB, Multiperpep Pump 2115)

Material

- Heparin-Säule, 5 ml (GE Healthcare, Art.-Nr. 17-0407-01), immobilisiertes porcines Heparin an Agarosematrix
- Zentrifugal-Filtereinheiten, Amicon® Ultra-4 (Millipore, Irland, Art.-Nr. UFC801096), Ausschlussmolekulargewicht 10 kDa und Membran mit extrem geringer Bindungsaffinität
- Einmalspritze (Becton Dickinson, Heidelberg) mit 10 ml Volumen

Lösungen

- Waschpuffer (50 mM NaCl, 5 mM MnCl₂, 5 mM Tris, pH 7,4)
- Elutionspuffer (1 M NaCl, 5 mM Tris, pH 7,4)
- PBS (Gibco)

Methode

Die Auftrennung von Apo E-haltiger und Apo E-freier HDL erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine Heparinsäule. Da Apo E eine Heparinbindungsstelle aufweist, konnten über die separate Sammlung von Durchlauf- und Bindungsfraction die einzelnen HDL Subklassen gewonnen werden. Die in PBS befindlichen Gesamt-HDL wurden zunächst mittels Zentrifugal-Filtereinheiten in Waschpuffer umgepuffert. Hierfür wurden die Lipoproteine in die Filtereinheiten gefüllt und bei max. 3000 x g in der Kühlzentrifuge (4°C) zentrifugiert bis das Volumen auf max. 500 µl eingeeengt war (wegen der Integrität der Partikel durfte nicht bei höheren Geschwindigkeiten zentrifugiert oder weiter eingeeengt werden). Im Anschluss wurde mit Waschpuffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert.. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Vorganges wurde die umgepufferten Lipoproteine auf eine Proteinkonzentration von max. 3 mg/ml in einem Gesamtvolumen von 5 ml eingestellt. Die Heparin-Säule wurde mit Waschpuffer äquilibriert (4faches Säulenvolumen). Dies geschah mittels einer Peristaltikpumpe (Durchflussrate 5 ml/min). Anschließend wurde die Probe mit einer Einmalspritze, an der ein kleines Stück Silikonschlauch befestigt war, aufgetragen. Die Applikation des Probenvolumens von 5 ml erfolgte in zwei Schritten: Nachdem zunächst 3 ml

Probe aufgetragen worden war, erfolgte parallel mit dem Auftragen der restlichen 2 ml die Sammlung des Durchlaufs in Fraktionen zu 1,5 ml. Unmittelbar nach dem Auftragen der Probe wurde wieder Waschpuffer mittels Peristaltikpumpe auf die Säule aufgebracht. Die Sammlung der Durchlauf fraktionen wurde beendet, nachdem 4 ml Waschpuffer durch die Säule geflossen waren. Auf diese Weise wurde insgesamt 6 ml Durchlauf in vier Fraktionen zu 1,5 ml gesammelt. Diese 6 ml Durchlauf enthielten nun die Apo E-freie HDL. Die Säule wurde mit insgesamt 20 ml Waschpuffer gespült, um anschließend die gebundene Apo E-haltige HDL mit Elutionspuffer zu eluieren. Insgesamt erfolgte die Sammlung von 10 Fraktionen (Bindungsfraktion) zu je 1,5 ml. Durch Vermessung der Fraktionen im Spektralphotometer bei 280 nm wurden die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an Apo E-haltiger HDL bestimmt und diese dann vereinigt. Im Anschluss erfolgte sowohl für die Apo E-freie als auch für die Apo E-haltige HDL ein Umpuffern in PBS und gleichzeitiges Einengen mittels Filtereinheiten (s.o.). Abschließend wurde die Proteinkonzentration und Lipidzusammensetzung der präparierten HDL Subklassen bestimmt (siehe 2.3.).

2.2.3. Anreicherung von HDL mit den Apo E-Isoformen

Geräte

- Thermoblock (Eppendorf)
- Tischzentrifuge 1-15 K (Sigma)

Lösungen

- Rekombinantes humanes Apolipoprotein E3 aus eukaryotischem Expressionssystem (Panvera, Art.-Nr. P2003), (0,43 mg/ml in 0,7 M NH_4HCO_3)
- Rekombinantes humanes Apolipoprotein E4 aus eukaryotischem Expressionssystem (Panvera, Art.-Nr. PV2004), (0,44 mg/ml in 0,7 M NH_4HCO_3)
- Rekombinantes humanes Apolipoprotein E3 und E4 aus bakteriellem Expressionssystem (BL21 Escherichia coli) in TBS (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,0) zur Verfügung gestellt von Kerry-Ann Rye (Heart Research Institute, Camperdown, Sydney)
- HDL-Präparation (Gesamt-HDL oder Apo E-freie HDL s.o.) in PBS

Methode

Die Assoziation des Apolipoprotein E3 und E4 an die Lipoproteine erfolgte durch 30minütige Inkubation bei 37°C im Thermoblock. Hierfür wurden äquivalente Mengen (bezogen auf das eingesetzte Protein) HDL und Apolipoprotein E eingesetzt. In der Regel lagen die eingesetzten Konzentrationen bei 10-20 µg/ml Apo E bzw. HDL-Protein. Die Assoziation

erfolgte in Zellkulturmedium (ohne weitere Zusätze). Zu Beginn der Inkubation wurde durch vorsichtiges Invertieren gemischt und zum Abschluss für 5 Min. bei 13.000 U/min zentrifugiert. Die abschließende Zentrifugation diente der Entfernung freien Apo E.

2.2.4. Anreicherung von HDL mit radioaktiv markiertem Apo E3 und E4

Geräte

- Gamma-Counter, CliniGamma Modell 1272 (LKB Wallac)

Material

- Entsalzungs-Säulen, PD-10 Säule (GE Healthcare, Art.-Nr. 170851-01)

Lösungen

- Rekombinantes humanes Apolipoprotein E3 aus eukaryotischem Expressionssystem (Panvera, Art.-Nr. P2003), in 0,7 M NH_4HCO_3
- Rekombinantes humanes Apolipoprotein E4 aus eukaryotischem Expressionssystem (Panvera, Art.-Nr. PV2004), in 0,7 M NH_4HCO_3
- HDL-Präparation (Gesamt-HDL) in PBS
- Iodo-Beads[®] Iodierungsreagenz (Pierce, Art.-Nr. 28665)
- ^{125}I -Lösung: NaI in NaOH-Lösung (GE Healthcare, Art.-Nr. IMS30), spez. Akt. > 0,6 TBq/mg

Methode

Für die Untersuchung der isoform-spezifischen Apo E-Aufnahme und des Recyclings wurden radioaktiv markierte Liganden präpariert. Hierfür erfolgte zunächst die Iodierung des rekombinanten Apo E3 und E4, bei welcher das Radioisotop ^{125}I kovalent an Tyrosinreste des Proteins gekoppelt wurde. Zu 100 μg Apo E in 800 μl PBS wurden 4 μl ^{125}I -Lösung pipettiert (14,8 MBq) und die Iodierungsreaktion durch Zugabe eines aktivierten Iodo-Beads[®] gestartet. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die 804 μl Iodierungsansatz in ein Glasgefäß mit 200 μg HDL (Gesamt-HDL) in 200 μl PBS überführt. Durch Entfernung des Iodo-Beads[®] wurde so die Iodierungsreaktion gestoppt, und das markierte Apo E konnte an die vorgelegte HDL assoziieren. Nun folgte der sofortige Transfer des gesamten Volumens von 1 ml auf eine äquilibrierte PD-10 Säule. Nachdem die Probe eingelaufen gewesen war, erfolgte die Zugabe von 1,8 ml PBS, wobei der Durchlauf verworfen wurde. Parallel zur Zugabe von weiteren 2 ml PBS erfolgte die Sammlung des Durchlaufes. Dieser enthielt nun HDL mit assoziiertem ^{125}I -Apo E3 und E4 (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ^{125}I -Apo E und 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ HDL-Protein). Freie Aktivität oder nicht-assoziiertes Apo E wurden

durch die Säulenreinigung abgetrennt. Abschließend erfolgte die Bestimmung der spezifischen Aktivität im Gamma-Counter. Diese lag bei etwa 600-900 cpm (counts per minute)/ng Apo E.

2.2.5. Herstellung von Apo E-haltigen „HDL-ähnlichen“ Liposomen

Geräte

- Ultraschallgerät, Sonifier 450 mit doppelstufiger 1/8 Mikrohornspitze (Branson, USA)

Lösungen

- Phospholipid: L- α -Phosphatidylcholin (Sigma, Art.-Nr. P-6263), 100 mg/ml in Chloroform
- Freies Cholesterin (Sigma, Art.-Nr. C8667), 10 mg/ml in Chloroform
- Cholesterylester: Cholesteryloleat (Fluka, Art.-Nr. 26850), 40 mg/ml in Chloroform
- Liposomenpuffer (200 mM Tris, pH 8,0)

Methode

Für die Herstellung von Apo E-haltigen „HDL-ähnlichen“ Liposomen wurden zunächst die Lipide (8 μ l Phospholipid, 24 μ l freies Cholesterin und 12 μ l Cholesterylester add 400 μ l Chloroform) in ein Glasgefäß vorgelegt, und das Lösungsmittel mit Stickstoff abgedampft. Zu dem verbliebenen Lipidfilm wurde 4 ml Liposomenpuffer gegeben und auf Eis sonifiziert (in drei Intervallen von je 60 Sekunden mit je 60 Sekunden Pause, Amplitude 10% bei 2 Watt Leistung). Während der Ultraschallbehandlung ordnen sich die Lipide im wässrigen Milieu zu Liposomen. Im Anschluss erfolgte die Assoziierung der Apo E-Isoformen (s.o., jedoch 2 h Inkubation). Hierfür wurden zu 500 μ l Liposomensuspension (190 μ g Lipid) 100 μ g Apo E3 bzw. E4 in 500 μ l TBS gegeben. Die resultierenden Partikel wiesen bezüglich ihrer Gesamtmasse folgende Zusammensetzung auf: 34,5 % Protein, 10,3 % Cholesterin, 20,7 % Cholesterylester und 34,5 % Phospholipide. Sie entsprechen damit in etwa der Zusammensetzung von HDL_E

2.2.6. Gelfiltrationschromatographie von Lipoproteinen (FPLC)

Geräte

- Gelfiltrationschromatographie-Apparatur (FPLC-Apparatur)(Pharmacia LKB) bestehend aus Steuerungsmodul (LKB LCC- Plus), Pumpen (LKB Pump 500) und Fraktionssammler (LKB Frac 100)

- Gelchromatographie-Säule mit Dextran-Agarose-Matrix (Pharmacia, HiLoad Superdex 200, Art.-Nr. 17-1069-01)

Lösungen

- Gelfiltrationschromatographiepuffer (FPLC-Puffer)(150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8,0)

Methode

Ein schonendes Verfahren zur Auftrennung von globulären Proteinen in wässrigen Lösungen ist die Gelfiltrationschromatographie, eine spezielle Applikation der FPLC (Fast Liquid Protein Chromatography). Das zu trennende Proteingemisch wird dabei unter Druck und in einem physiologischen Puffer durch eine Säule mit einer Gel-Matrix aus Dextran und Agarose gepumpt. Kleine Moleküle können in die Gel-Matrix interkalieren und verlassen die Säule wegen der Retardierung später als große Moleküle, welche die Matrix passieren ohne zu interkalieren. Es kommt also unter physiologischen Bedingungen zur Separation der Moleküle nach ihrer relativen Größe. Diese Methode eignet sich auch besonders gut für die Auftrennung von Lipoproteingemischen, da diese während der Größentrennung in der Säule in ihrer nativen Lipid- und Proteinzusammensetzung erhalten bleiben. Auf diese Weise wurden daher die präparierten Lipoproteine bezüglich ihrer Reinheit und Integrität untersucht. Dabei wurde eine Säule (Superdex 200) verwendet, die über eine Matrix-Partikelgröße von 34 μM Durchmesser verfügte und in der Lage war, Partikel im Molekulargewichtsbereich von 10-600 kDa zu trennen. HDL haben beispielsweise ein mittleres Molekulargewicht von ca. 375 kDa und einen Durchmesser von 5-12 nm. Die Lipoprotein-Probe wurde ggf. vorverdünnt und in einem Volumen von 200 μl auf die Säule geladen. Die Flussrate des Puffers betrug 1 ml/Minute, wobei die Fraktionssammlung nach 36 ml Durchlauf begann und 40 Fraktionen zu je 500 μl gesammelt wurden. In den Fraktionen folgte dann die Bestimmung der Lipidparameter (Cholesterol, Triglyzeride), um ein FPLC-Profil der Lipoproteinprobe zu erstellen.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1. Proteinbestimmung

Geräte

- Mikrotiterplatten-Spektralphotometer, Biotrak II Plate Reader mit Software Biochrom Data Capture (GE Healthcare)

Lösungen

- Bradford-Proteinbestimmungsreagenz (BioRad, Art.-Nr. 500-0006)
- Proteinstandard: angesetzt mit bovinem Serumalbumin (BSA) (Pierce, Art.-Nr. 500-006) in 0,1 M NaOH
- Lowry-Proteinbestimmung: Lösung A (2 % Na_2CO_3 , 0,02 % NaK-Tartrat in 0,1 M NaOH), Lösung B (0,5 % CuSO_4 (Pentahydrat), 5 % SDS in A. dest), Lösung C (Lösung A zu B im Verhältnis 49:1)
- Folinreagenz (Merck)

Methoden

Je nach Probenmaterial erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) oder Lowry (1951).

Bradford Proteinbestimmung

Der im Bradfordreagenz enthaltene Farbstoff (Coomassie Brilliant Blue G-250) bildet mit den kationischen und hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm verschiebt. Die Bradford Proteinbestimmung wurde in der Regel für die Bestimmung des Proteingehaltes von Zell-Lysaten aus radiochemischen Experimenten eingesetzt. 20 μl Zell-Lysat (in 0,1 M NaOH) oder Standard wurden in eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) vorgelegt und je 200 μl Bradford-Proteinbestimmungsreagenz (1:5 mit A. dest. vorverdünnt) hinzupipettiert. Nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Bestimmung der Absorption bei 595 nm im Mikrotiterplatten-Spektralphotometer. Vermessen wurde gegen eine Standardreihe von BSA (0,03 – 2 mg/ml) in 0,1 M NaOH.

Lowry Proteinbestimmung (SDS-Lowry)

Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf zwei Reaktionen. Zunächst kommt es zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung zur Bildung eines Komplexes (Biuret-Reaktion). In einem zweiten Schritt reduziert dieser Komplex das

Folinreagenz, welches hierbei einen Farbumschlag von gelb nach blau erfährt. An dieser Reaktion sind auch direkt die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Tryptophan beteiligt. Die Intensität der Blaufärbung wird dann zur Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt. Die vorliegende nach Lowry modifizierte Proteinbestimmung erlaubt die Gegenwart von Detergenzien (SDS (Natriumdodecylsulfat)) in der zu vermessenden Probe, so dass Präparationen von Gesamtzellprotein und Lipoproteinen auf diese Weise vermessen werden konnten. 20 µl Probe oder Standard wurden in ein Plastikröhrchen vorgelegt und 80 µl NaOH (0,1 M) hinzupipettiert. Nach Zugabe von 1 ml Lösung C und gründlichem Mischen erfolgte eine 10minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden 100 µl Folinreagenz (1:1 mit A. dest. vorverdünnt) hinzupipettiert und nach gründlichem Mischen für 30 Minuten bei Raumtemperatur (im Dunkeln) inkubiert. 200 µl jeder Probe bzw. des Standards wurden in eine Mikrotiterplatte umpipettiert und die Absorption bei 760 nm im Mikrotiterplatten-Spektralphotometer bestimmt.

2.3.2. Cholesterolbestimmung

Geräte

- Fluoreszenzmessgerät, Fluorocount mit Steuerungssoftware Plate Reader 3.0 (Packard)

Lösungen

- Cholesterolbestimmungs-Reagenziensatz, Amplex® Red Kit (Molecular Probes, Art.-Nr. A12216)
- Cholesterolbestimmungsreagenz (Roche, Art.-Nr. 11488872)
- Cholesterolstandardreihe, angesetzt aus Precipath L (Roche, Art.-Nr. 11285874)

Die Cholesterolbestimmung erfolgte je nach Probenmaterial mittels zweier Methoden, wobei jeweils das Gesamtcholesterol (Cholesterylester und freies Cholesterol) in der Probe bestimmt wurde.

Amplex® Red-Cholesterol-Bestimmung

Diese Bestimmungsmethode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, so dass sie für die Bestimmung des Cholesterolgehaltes von Zell-Lysaten zum Einsatz kam. Für die Bestimmung des Gesamtcholesterols wurden zunächst die in der Probe befindlichen Cholesterylester mittels der Cholesterolesterase in freies Cholesterol umgesetzt. Nach dieser ersten Reaktion lag das gesamte Cholesterol in der Probe als freies Cholesterol vor und wurde nun mittels Cholesteroxidase oxidiert. Dabei entsteht H₂O₂, welches in Gegenwart

einer Peroxidase (HRP) mit dem Farbstoff (Amplex[®] Red) reagierte und fluoreszierendes Resorufin entstehen ließ. Die Intensität der Fluoreszenz wurde dann im Fluoreszenzmessgerät gegen eine Cholesterolstandardreihe (Precipath L) vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug dabei 530 nm und die Emission wurde bei 590 nm gemessen. Für die Messung wurden 50 µl Standard bzw. Probe (ggf. mit Reaktionspuffer vorverdünnt) mit 50 µl Reagenz versetzt, so dass sich im Reaktionsansatz folgende Konzentrationen ergaben: 150 µM Amplex[®] Red, 1 U/ml Peroxidase (HRP), 1 U/ml Cholesteroloxidase und 0,1 U/ml Cholesterolesterase. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Vermessung im Fluoreszenzmessgerät.

Cholesterol-Bestimmung (Roche)

Auch mit dieser Methode wird das Gesamtcholesterol bestimmt. Sie ist jedoch weniger sensitiv, liefert bei höheren Konzentrationen aber zuverlässigere Werte. Sie wurde daher für die Bestimmung von Plasmacholesterol sowie Lipoprotein-assoziierten Cholesterols eingesetzt. Auch bei dieser Bestimmung wird zunächst das gesamte Cholesterol in der Probe in freies Cholesterol umgesetzt und anschließend oxidiert. Das anfallende H₂O₂ wird unter Mitwirkung einer Peroxidase auch hier mit einem Farbstoff umgesetzt (4-Aminophenazon), der sich dabei rot färbt. Dieser ist jedoch nicht fluoreszierend und macht die Bestimmung weniger sensitiv. Die Absorption wurde gegen eine Cholesterolstandardreihe (Precipath L) bei 550 nm im Mikrotiterplatten-Spektralphotometer vermessen. Zu 100 µl Probe oder Standard wurden 200 µl Cholesterol-Reagenz gegeben und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgte dann, wie oben beschrieben, photometrisch.

2.3.3. Triglyzeridbestimmung

Lösungen

- Triglyzeridbestimmungsreagenz (Roche, Art.-Nr. 11488872)

Methode

Dieser enzymatische Test zur Bestimmung des Triglyzeridgehaltes einer Probe beruht auf folgendem Prinzip. Die Triglyzeride werden zunächst unter Einwirkung einer Lipoproteinlipase vollständig hydrolysiert. Das dabei freigesetzte Glycerin wird anschließend oxidiert, wobei H₂O₂ entsteht. In Anwesenheit einer Peroxidase (HRP) kommt es dann zur Bildung eines roten Farbstoffes aus den Komponenten 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol. Es handelt sich um eine Endpunktbestimmung, wobei die Quantifizierung über die Messung der Absorption bei 550 nm vorgenommen wird. 100 µl Probe oder Standard

(Precipath L) wurden in einer Mikrotiterplatte mit 200 µl Reagenz versetzt und für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte im Mikrotiterplatten-Spektralphotometer die Bestimmung der Absorption. Da die Kontamination der Probe (z.B. einer Lipoproteinfraktion) mit Glycerin die Bestimmung des Triglyzeridgehaltes verfälschen kann, musste sehr darauf geachtet werden, dass alle Materialien für die Dialyse durch vorheriges Abkochen vollständig von der Glycerinkonservierung befreit wurden.

2.3.4. Phospholipidbestimmung

Lösungen

- Phospholipidbestimmungsreagenz inkl. Standardlösung, (Wako, Art.-Nr. 540664)

Dieser Test basiert auf der enzymatischen Hydrolyse (katalysiert durch die Phospholipase D) von Phospholipiden (Lecithin, Lysolecithin und Sphingomyelin). Das frei werdende Cholin wird durch eine Cholinoxidase oxidiert, wobei H_2O_2 entsteht. In Anwesenheit einer Peroxidase erfolgt die Umsetzung von 4-Aminoantipyrine und Phenol zu einem Farbstoff, dessen Absorption bei 550 nm bestimmt wird. Die Quantifizierung erfolgt durch Vermessung gegen einen mitgelieferten Standard. 100 µl Probe oder Standard wurden in einer Mikrotiterplatte mit 200 µl Reagenz versetzt, 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 550 nm bestimmt.

2.3.5. Apo E-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Die Bestimmung der Apo E-Konzentration in Zellkultüberständen erfolgte mittels eines im Labor von Prof. Beisiegel entwickelten und etablierten Sandwich-ELISA. Als immobilisierter Köder-Antikörper diente ein monoklonaler anti-Apo E Antikörper aus der Maus (EE7). Detektions-Antikörper ist ein polyklonaler anti-Apo E Antikörper aus dem Kaninchen (Fa. Dako). Der gebundene polyklonale anti-Apo E Antikörper wird durch einen Peroxidasegekoppelten anti-IgG Antikörper erkannt. Die gekoppelte Peroxidase setzt H_2O_2 in Anwesenheit eines Farbstoffes um und die Absorption des Reaktionsproduktes wird bei 490 nm gemessen.

2.4. Proteinchemische Methoden

2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Protein- und Lipoproteinproben erfolgte in der SDS-PAGE. Zum Einsatz kamen dabei Gradientengele (4-12 % Acrylamid), die als Fertiggele erworben wurden sowie selbst gegossene Gele mit 6 oder 12,5 % Acrylamid.

SDS-PAGE mit Gradienten-Fertiggelen

Geräte

- Fertiggel-Elektrophoreseapparatur Xcell Sure Lock™ (Invitrogen, Art.-Nr. EI0001)

Material

- Gradienten-Fertiggele (NuPAGE™, 4-12 % Bis-Tris, 1 mm, 10 well, Art.-Nr. NP0321BOX)

Lösungen

- Fertiggel-Laufpuffer, NuPAGE™ MES Puffer (Invitrogen, Art.-Nr.)
- SDS-Probenpuffer (4x), NuPAGE™ LDS Sample-Puffer (Invitrogen, Art.-Nr. NP0008)
- Reduzierendes Agens, Dithiothreitol (DTT)(0,5M in A. dest.)

Proteinmarker (vorgefärbt)

- Roti-Mark 17 – 245 kDa (Roth, Art.-Nr. T852.1)
- Rainbowmarker 10 – 250 kDa (Amersham, Art.-Nr. RPN 800)

Die elektrophoretische Auftrennung von Protein- und Lipoproteinproben in Gradienten-Fertiggelen erfolgte nach Herstellerangaben. Die Proben wurden hierfür in SDS-Probenpuffer aufgenommen (2,6 Teile Probe in 1 Teil Puffer und 0,4 Teilen reduzierendem Agens) und anschließend für 10 Minuten auf 75°C erhitzt. Auf diese Weise denaturieren die Proteine und das SDS kann sich an die Moleküloberfläche anlagern. Die Proteine tragen sodann proportional zu ihrer Größe eine negative Ladung und können im elektrischen Feld getrennt werden. Es wurden je Spur maximal 50 µg Protein geladen. Nach der Auftragung der Proben und des Proteinstandards wurde zunächst eine Spannung von konstant 100 V angelegt, die nach dem Einlaufen der Proben auf 200 V erhöht wurde. Nach etwa 35 Min. erreichte die Lauffront das untere Gelende und die elektrophoretische Trennung wurde

beendet. Das Gel wurde aus der Plastikhülle entnommen, und die Proteine einem Elektrobplot-Transfer oder einer Proteinfärbung unterzogen.

SDS-PAGE mit selbst gegossenen Mini-Gelen (Neville System)

Geräte

- Mini-Gel Elektrophoresekammer, Mini Protean3 (Biorad, Art. 165-3302)

Lösungen

- Obergelpuffer (40 mM Borsäure, 41 mM Tris, 0,001 % SDS in A. dest., pH 8,64)
- Untergelpuffer (427 mM Tris in A. dest., pH 9,5 mit HCl eingestellt)
- Probenpuffer (4x) (80 mM Tris, 3 % SDS, 16 % Glycerol, 3,75 % Mercaptoethanol , 0,2 % Bromphenolblau in A. dest, pH 6,8)

Pipettierschema Mini-Gele (Neville)

	Sammelgel (3%)	Trenngel (6 %)	Trenngel (12,5 %)
40% Acrylamid/ Bis (37,5:1), BioRad	385 µl	1,2 ml	2,5 ml
Obergelpuffer	1,25 ml	2 ml	2 ml
A. dest.	3,4 ml	4,8 ml	3,5 ml
10 % APS (Ammoniumpersulfat)	25 µl	40 µl	40 µl
TEMED	5 µl	10 µl	10 µl

Methode

Die Gele für die Mini-Gel Elektrophorese bestanden immer aus einem 3 %igen Sammel- und einem 6 oder 12,5 %igen Trenngel. Analog der Vorgehensweise bei der Gradienten-Fertiggelelektrophorese wurden auch hier die Proben zunächst mit Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Die Elektrophoresekammer wurde zwischenzeitlich mit Obergel- und Untergelpuffer befüllt, und die Proben heiß geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA, die nach dem Passieren des Sammelgeles auf 80 mA erhöht wurde. Nach 30 – 60 Minuten erreichte die Lauffront das untere Gellende, und die Trennung wurde beendet. Das Gel stand nun ebenfalls für einen Elektrobplot-Transfer der Proteine oder eine Proteinfärbung zur Verfügung.

2.4.2. Proteinfärbung im Polyacrylamidgel (Coomassie Färbung)

Lösungen

- Coomassie-Färbelösung (0,1 % Coomassie-Brilliantblau R250, 45 % Ethanol, 10 % Eisessig in A. dest.)
- Coomassie-Entfärbelösung (45 % Ethanol, 10% Eisessig in A. dest.)

Methode

Die Gele wurden bei Raumtemperatur in der Färbelösung geschüttelt (unter dem Abzug). Die Färbung erfolgte überwiegend für mehrere Stunden oder über Nacht, wobei sich der blaue Farbstoff an die denaturierten Proteine anlagert. Im Anschluss wurde mit Entfärbelösung bis zum Auftreten eines Bandenmusters entfärbt. Die Färbungen wurden elektronisch dokumentiert, und die Gele ggf. zwecks Konservierung getrocknet. Die gebrauchten Färbe- und Entfärbelösungen wurde filtriert (Entfärbelösung über Aktivkohle) und wiederverwendet.

2.4.3. Elektrobplot-Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen und anschliessende Immundetektion (Western Blot)

Geräte

- Elektrobplot-Apparatur, Mini Trans Blot (Protean3) (Biorad, Art.-Nr. 170-3930)

Material

- Nitrocellulosemembran, Protran® 0,45 µm Porengröße (Schleicher&Schüll, Art.-Nr. 10401196)
- Röntgenfilme (Kodak, Biomax MR)

Lösungen

- Blotting-Puffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % Methanol)
- Ponceau-Färbelösung (0,2% Ponceau in 3% TCA (Trichloressigsäure), Serva Art.-Nr. 33427)
- Waschpuffer A (10 mM Tris, pH 7,4, 154 mM NaCl, 0,1 % Tween)
- Waschpuffer B (10 mM Tris pH 7,4, 154 mM NaCl, 0,1 % Tween, 1% SDS, 0,25 Natriumdesoycholat)
- Blocking Puffer (10 % Milchpulver, 5% BSA in Waschpuffer A)
- Primärer Antikörper (in 5% BSA in Waschpuffer A)
- Sekundärer Antikörper (in 10 % Milchpulver, 5% BSA in Waschpuffer A)

- ECL-Detektionsreagenz (Amersham, Art.-Nr. RPN2132)

Methode

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Elektroblob im Nassblotverfahren auf Nitrocellulose (0,45 µm Porengröße) übertragen. Dies geschah in der o.g. Blotting-Apparatur unter Verwendung des angegebenen Blotting-Puffers. Der Transfer erfolgte bei konst. 400 mA für 1 h. Dabei wurde kontinuierlich gekühlt. Zur Kontrolle des Transfers erfolgte im Anschluss eine Proteinfärbung (Ponceaufärbung) auf der Membran durch 10minütige Inkubation mit der Ponceau-Färbelösung. Das Ergebnis der Färbung wurde elektronisch dokumentiert, und die anschließend mit PBS vollständig entfärbte Membran für die Inkubation mit den Antikörpern vorbereitet. Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran erfolgte über Nacht bei 4°C eine Inkubation in Blockingpuffer. Anschließend wurde mit Waschpuffer A gewaschen und für 1 h mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert (die Einzelheiten zu den verwendeten primären und sekundären Antikörpern ist der Tabelle im Abschnitt 2.1.3. zu entnehmen). Es folgten 4 Waschschrte: Einmal 1 Min. Waschpuffer A, zweimal 10 Min. Waschpuffer B und abschließend erneut 1 Min. Waschpuffer A, gefolgt von der einstündigen Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Nach Wiederholung der vorgenannten 4 Waschschrte wurde die Membran mit einem Filterpapier trockengetupft und einer Chemolumineszenz-Detektion unterzogen. Hierfür wurde die Membran für 5 Minuten mit dem ECL-Detektionsreagenz inkubiert, und die Chemolumineszenz durch Auflegen eines Röntgenfilmes detektiert.

2.4.4. Densitometrische Auswertung von Western-Blots

Methode

Die densitometrische Auswertung von Western-Blots erfolgte mittels der Imagequant-Software (Version 5.2, Molecular Dynamics). Hierfür wurden die entwickelten Röntgenfilme zunächst mit einer Auflösung von 600 dpi digitalisiert (gescannt) und mit dem Bildbearbeitungsprogramm Photopaint 9 (Corel) in das TIF-Format konvertiert (invertiert, 16 Bit Graustufen). Unter Imagequant erfolgte dann die Quantifizierung der Banden mittels der Funktion Analyze, wobei als Hintergrundkorrektur (Background Correction) die Funktion "Local Median" gewählt wurde. Bei dieser Vorgehensweise wird die Intensität der zu vergleichenden Banden addiert und die Summe gleich 100% gesetzt. Der Anteil der einzelnen Bande an der Gesamtintensität wird dann in % ausgegeben. Gleichzeitig erfolgt für jede Bande eine lokale Hintergrundkorrektur (dies ist die vom Hersteller empfohlene Vorgehensweise).

2.5. Untersuchungen zum intrazellulären Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen

2.5.1. Aufnahme von HDL-assoziiertem Apo E3 und E4 in neuronale Zellen

Die Aufnahme HDL-assoziierten Apo E3 und E4 erfolgte mittels zweier Methoden: Zum einen wurde die Apo E-Aufnahme mittels indirekter Immunfluoreszenz in immunhistochemischen Experimenten untersucht, zum anderen erfolgte die quantitative Bestimmung der Apo E-Aufnahme mittels radiochemischer Methoden.

Untersuchung mittels Immunfluoreszenz

Die HT-22 Zellen wurden in einem Volumen von 500 µl auf Deckgläschen in Multischalen mit 24 Vertiefungen ausgesetzt. Nachdem die Zellen zu 80-90 % konfluent waren, erfolgte die Inkubation mit Hungermedium (DMEM mit 2 % BSA) für 1 h bei 37°C. Während dieser Zeit wurden die Liganden präpariert. Ausgangsmaterial war eine humane Gesamt-HDL Präparation, an welche rekombinantes humanes Apo E3 und E4 (bakteriell erzeugt) assoziiert wurde. Die resultierenden Ligandenpräparationen hatten bezüglich ihres Proteingehaltes eine Zusammensetzung von 20 µg/ml HDL-Protein und 20 µg/ml Apo E3 bzw. Apo E4. Nach Beendigung der Hungerphase erfolgte die Inkubation mit den Liganden (250 µl Inkubationslösung pro Deckgläschen), wobei als Kontrollen zusätzlich einmal mit Medium ohne weitere Zusätze sowie mit einer HDL-Lösung (20 µg/ml) ohne Apo E-Anreicherung inkubiert wurde. Dies geschah für ebenfalls 1 h bei 37°C. Anschließend wurden die Inkubationslösungen abpipettiert und zur Entfernung von oberflächengebundenem Apo E mit je 500 µl Heparin-Medium (DMEM mit 500 I.E. Heparin /ml) gewaschen. Nach einem abschließenden Waschschrift mit je 500 µl PBS erfolgte die immunhistochemische Auswertung des Versuches wobei intrazelluläres Apo E3 und E4 mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde. Diese Versuche wurden stets mit Doppelwerten ausgeführt und mehrfach wiederholt.

Untersuchung im radiochemischen Experiment

Für diese Experimente wurden die HT-22 Zellen in Multischalen mit 12 Vertiefungen ausgesetzt. Die Aussaatdichte betrug dabei 62.000 Zellen/Vertiefung (in 1 ml). Nachdem 80-90 %ige Konfluenz erreicht worden war (nach 2 Tagen), erfolgte die 1stündige Inkubation mit Hungermedium (DMEM mit 2 % BSA) bei 37°C. Im Anschluss wurde mit den radioaktiven Liganden inkubiert (Pulse). Als Ausgangsmaterial diente hierfür ebenfalls eine Präparation humaner Gesamt-HDL, an welche radioaktiv markiertes Apo E3 und E4 (Panvera) assoziiert worden war (¹²⁵I-Apo E). Die resultierenden Präparationen hatten bezogen auf das HDL-

Protein eine Konz. von 100 µg/ml sowie eine Apo E-Konz. von 50 µg/ml. Für die Experimente wurden diese Stammlösungen auf eine Apo E-Konz. von 0,25 , 1 und 5 µg/ml mit Medium (DMEM mit 2% BSA) verdünnt. Die Zellen wurden dann mit den drei verschiedenen Konzentrationen von Apo E3 und E4 für 1 h bei 37°C inkubiert (400 µl pro Vertiefung). Nachdem die Inkubationslösungen abpipettiert worden waren, wurde zunächst für 5 Min. mit je 1 ml PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Waschschrift mit je 1 ml Heparinlösung (100 I.E.Heparin/ml in PBS). Da durch das Waschen mit Heparin zelloberflächengebundenes Apo E in Lösung gebracht worden war, erfolgte die Bestimmung der Radioaktivität in den Überständen. Auf diese Weise wurde die Bindung des Apo E3 und E4 bestimmt. Nach Entfernung der Heparinlösung erfolgte ein finaler Waschschrift mit je 1 ml PBS bevor die Zellen durch 30minütige Inkubation mit je 500 µl 0,1 M NaOH bei 37°C lysiert wurden. Die Radioaktivität im Zell-Lysat wurden gemessen und der Proteingehalt bestimmt. Die Menge des aufgenommenen Apo E3 und E4 wurden mittels der spezifischen Radioaktivität der ¹²⁵I-Apo E3 und E4-Stammlösungen errechnet und auf das Zellprotein bezogen (ng aufgenommenes Apo E pro mg Zellprotein). Bei den Versuchen wurden Dreifachwerte ermittelt, und die Experimente viermal zeitnah wiederholt.

2.5.2. Recycling von HDL-assoziierten Apo E3 und E4 in neuronalen Zellen

Das Recycling HDL-assoziierten Apo E3 und E4 wurde ebenfalls mittels zweier Methoden untersucht: Zum einen wurde in einem immunchemischen Ansatz das recycelte Apo E direkt im Western Blot nachgewiesen bzw. mittels des Apo E-ELISA quantifiziert. Zu anderen wurde das Apo E-Recycling in einem radiochemischen Ansatz untersucht.

Untersuchung mittels Western Blot und Apo E-ELISA

HT-22 Zellen wurden einen Tag vor dem Experiment in Multischalen mit 24 Vertiefungen auf Deckgläschen ausgesetzt und über Nacht bis zu einer 80-90 %igen Konfluenz propagiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Während der folgenden einstündigen Inkubation mit Hungermedium (DMEM mit 2% BSA) wurde die Liganden vorbereitet. Ausgangsmaterial war hier eine Präparation humaner Apo E-freier HDL, an welche rekombinantes humanes Apo E3 und E4 (Panvera) assoziiert wurde. Die resultierenden Liganden hatten bezüglich des HDL-Proteins eine Konz. von 10 µg/ml sowie einen Apo E-Gehalt von ebenfalls 10 µg/ml. Nach Beendigung der Hungerphase und Entfernen des Hungermediums erfolgte eine einstündige Inkubation mit den präparierten Liganden (100 µl/ Deckgläschen) bei 37°C. In dieser Pulse-Phase kam es zur Aufnahme des HDL-assoziierten Apo E3 und E4. Anschließend wurde das Pulsemmedium entfernt, und die Zellen zur Entfernung oberflächengebundenen Apo E dreimal für je 5

Minuten gewaschen (zunächst mit PBS, dann PBS mit 200 I.E./ml Heparin und schließlich wieder mit PBS). Nun wurden die Zellen für eine weitere Stunde mit Medium ohne Zusätze bzw. mit Medium mit Akzeptor (10 µg/ml Apo E-freie HDL) bei 37°C inkubiert (100 µl/Deckgläschen). In dieser Chase-Phase gelangt das recycelte Apo E in den Überstand und kann immunchemisch detektiert werden. Für diese Detektion wurden daher je Deckgläschen 80 µl Chase-Medium abgenommen. Mit einem Aliquot erfolgte dann eine Immundetektion gegen Apo E im Western Blot und mit einem weiteren Aliquot die Bestimmung der Apo E-Konzentration im Apo E-ELISA. Bei dem Experiment wurden pro Apo E-Isoform je 3 Deckgläschen mit und ohne Akzeptor inkubiert, und das Experiment dreimal zeitnah wiederholt.

Untersuchung im radiochemischen Experiment

Für diese Experimente wurden die HT-22 Zellen in Multischalen mit 12 Vertiefungen ausgesetzt (62.000 Zellen pro Vertiefung in 1 ml Medium). Nach 2 Tagen erreichten die Zellen eine 80-90%ige Konfluenz und wurden nach einmaligem Waschen (PBS) für eine Stunde bei 37°C in Hungermedium inkubiert (DMEM mit 2% BSA). Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit den radioaktiven Liganden. Als Ausgangsmaterial diente hier eine Präparation humaner Gesamt-HDL, an welche ¹²⁵I-markiertes humanes Apo E3 und E4 (Panvera) assoziiert worden war. Die Liganden wurden mit DMEM (2% BSA) auf eine Apo E-Konz. von 5 µg/ml eingestellt. Dies entsprach einer HDL-Protein Konz. von 10 µg/ml. Die Liganden-Inkubation (Pulse) erfolgte für eine Stunde bei 37°C (400 µl Inkubationslösung pro Vertiefung). Der Pulse wurde durch Entfernen der Liganden und dreimaliges Waschen (je 5 Min. PBS, PBS mit 200 I.E./ml Heparin und erneut PBS) beendet. Im Anschluss folgte die einstündige Chase-Inkubation bei 37°C in Medium (DMEM, 0,01% BSA) mit bzw. ohne Akzeptor (25 µg/ml Gesamt-HDL). Das Chasemedium wurde abgenommen (1 ml), kurz zentrifugiert (800 x g, 5 Min.) und zu je 150 µl einer eiskalten Detergenzlösung (10 % TritonX-100 in A. dest.) gegeben. Während das Chasemedium nun auf Eis abkühlte, wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit je 500 µl NaOH (0,1 M) lysiert (30 Min. bei Raumtemperatur), um den Proteingehalt und die verbliebene intrazelluläre Aktivität zu bestimmen. Zu dem nun eiskalten mit Detergenz versetzten Chasemedium wurden 350 µl einer eiskalten Trichloressigsäure-Lösung (50 % TCA in A. dest.) gegeben und nach guter Durchmischung für 5 Min. auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe der Trichloressigsäure werden intakte Proteine quantitativ ausgefällt, wohingegen Proteinfragmente aufgrund der Anwesenheit des Detergenz in Lösung verbleiben. Der Fällungsansatz wurde anschließend für 5 Min. bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen, und die in ihm enthaltene Aktivität bestimmt. Dieser enthielt abgebaute radioaktive Proteinfragmente (Abbau). Das Pellet hingegen stellt

intaktes radioaktives Protein (Apo E) dar und wurde in 1 ml NaOH (0,1 M) resuspendiert. Die hierin gemessene Aktivität ist auf recyceltes intaktes Apo E zurückzuführen und wird daher als Recycling bezeichnet. Das Recycling wurde dann auf den ermittelten Zellproteingehalt bezogen und in ng recyceltes Apo E pro mg Zellprotein angegeben. Pro Experiment wurden je Inkubationsansatz Sechsfachwerte ermittelt, und das Experiment zeitnah dreimal wiederholt.

2.5.3. Cholesterol-Efflux aus neuronalen Zellen

Geräte

- Szintilations-Zähler, Wallac 1409 (Perkin Elmer)

Lösungen

- Szintillator-Lösung, Aquasafe 500 Plus (Zinser Analytic, Art.-Nr. 1008500)
- Radioaktive Cholesterol-Stammlösung, [1 α ,2 α (n)- 3 H]Cholesterol in Toluol (GE Healthcare, Art.-Nr. TRK 330), spez. Akt. 1,3-1,85 TBq/mmol mit 37 MBq/ml

Die Messung des Cholesterol-Efflux aus neuronalen Zellen erfolgte in radiochemischen Experimenten. Aus experimentellen Gründen wurden die eingesetzten Liganden variiert. Zum einen wurde Apo E-angereicherte HDL eingesetzt, zum anderen erfolgte der Einsatz von Apo E-angereicherten Liposomen.

Untersuchung im radiochemischen Experiment mit Apo E-angereicherter HDL

Zwei Tage vor dem Experiment wurden die HT-22 Zellen in Multischalen mit 12 Vertiefungen ausgesetzt. Die Aussaatdichte betrug dabei 60.000 Zellen/Vertiefung (in 1 ml). Einen Tag vor dem Experiment erfolgte die Beladung der Zellen mit dem radioaktiven Cholesterol (3 H-Cholesterol). Hierfür wurden 15 μ l (0,555 MBq) der Cholesterol-Stammlösung in ein Reaktionsgefäß überführt, und das Lösungsmittel (Toluol) mit Stickstoff abgedampft. Das verbliebene Cholesterol wurde durch kräftiges Mischen in 20 μ l Ethanol aufgenommen, mit 1 ml Medium (DMEM ohne Zusätze) versetzt und erneut gemischt. Danach erfolgte die Überführung in 25 ml Vollmedium (DMEM mit 10 % FBS) sowie erneute Durchmischung. Die Aktivität des resultierenden 3 H-Cholesterol-Mediums wurde bestimmt (10 μ l Medium im Doppelwert vermessen). Im Anschluss erfolgte dann die Beladung der Zellen mit 3 H-Cholesterol durch 20stündige Inkubation mit 1 ml 3 H-Cholesterol-Medium pro Vertiefung. Am folgenden Tag hatten die Zellen 80-90%ige Konfluenz erreicht, und das radioaktive Medium wurde abgenommen. Nach dem Waschen der Zellen mit warmem Medium (DMEM, 2ml pro Vertiefung) erfolgte eine einstündige Inkubation mit Hungermedium (DMEM ohne Zusätze).

Während der Hungerphase wurden die Liganden präpariert. Ausgangsmaterial war Apo E-freie humane HDL, an welche rekombinantes humanes Apo E3 bzw. E4 (Panvera) assoziiert wurde. Die resultierenden Ligandenlösungen hatten eine Apo E-Konz. von 10 µg/ml sowie einen HDL-Proteingehalt von ebenfalls 10 µg/ml. Während der folgenden einstündigen Inkubation (37°C) mit den präparierten Liganden (10 µg/ml HDL-assoziiertes Apo E3 bzw. Apo E4 in einem Volumen von 350 µl pro Vertiefung) wurde zur Kontrolle auch mit Apo E-freier HDL (10 µg/ml) sowie nur mit Medium (DMEM ohne Zusätze) inkubiert. Da es während der Ligandeninkubation bereits zu einem Efflux von Cholesterol gekommen war, wurden nach ihrer Beendigung ein Aliquot der entfernten Inkubationslösungen (200 µl) mit Szintillator (4 ml) versetzt und nach Durchmischung die Szintilation gemessen (³H-Cholesterol-Efflux während der Ligandeninkubation). Die Zellen wurden dreimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen (zweimal je 1 ml PBS mit 100 I.E./ml Heparin und einmal 1 ml reines PBS). Im Anschluss erfolgte die einstündige Chase-Inkubation (37°C) mit 800 µl Medium mit und ohne Akzeptor (Apo E-freie HDL, 10 µg/ml in DMEM). Anschließend wurde das Chasemedium abgenommen, an zentrifugiert und ein Aliquot (500 µl) mit Szintillator (4 ml) versetzt und nach Durchmischung die Szintilation bestimmt (³H-Cholesterol-Efflux während der Chase-Phase). Die Zellen wurden 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit 500 µl 0,1 M NaOH lysiert. 350 µl des Zell-Lysates wurden mit Szintillator (4 ml) versetzt und die Szintilation gemessen (intrazelluläres ³H-Cholesterol). Gleichzeitig wurde der Proteingehalt der Zell-Lysate bestimmt. Pro Experiment wurden je Inkubationsansatz Dreifachwerte ermittelt, und das Experiment zeitnah zweimal wiederholt.

Untersuchung im radiochemischen Experiment mit Apo E-angereicherten Liposomen

Die Experimente mit den Apo E-angereicherten Liposomen erfolgten analog zu den Experimente mit den Apo E-angereicherten HDL. Folgende Abweichungen sind jedoch anzumerken: Als Ausgangsmaterial für die Liganden dienten bei diesen Experimenten HDL-ähnliche Liposomen, an welche rekombinantes humanes Apo E3 und E4 (bakteriell erzeugt) assoziiert worden war. Die eingesetzten Ligandenlösungen hatten eine Apo E-Konzentration von 10 µg/ml sowie einen Lipidgehalt von 19 µg/ml. Zur Kontrolle wurde mit Apo E-freien Liposomen und mit reinem Medium inkubiert. Pro Vertiefung wurden 300 µl Ligandenlösung pipettiert, welche nach Beendigung der Inkubation nach kurzem Anzentrifugieren zu 4 ml Szintillator gegeben wurde. Die Chase-Inkubation erfolgte wiederum mit je 800 µl Medium pro Vertiefung mit und ohne Akzeptor (Apo E-freie HDL, 10 µg/ml). Nach Beendigung der Inkubation wurde das Chase-Medium abgenommen, kurz an zentrifugiert und je 700 µl mit 4 ml Szintillator versetzt und die Szintilation gemessen. Die gewaschenen Zellen wurde mit 500 µl 0,1 M NaOH lysiert. 300 µl Zell-Lysat wurden mit 4 ml Szintillator versetzt und die Szintilation bestimmt. Gleichzeitig wurde auch hier der Proteingehalt der Zell-Lysate

bestimmt. Pro Experiment wurden je Inkubationsansatz Dreifachwerte ermittelt, und das Experiment zeitnah dreimal wiederholt.

2.6. Untersuchungen des Einflusses des Apo E-Recyclings auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) in neuronalen Zellen

Bevor der Einfluss des Apo E-Isoform auf die APP-Prozessierung untersucht werden konnte, erfolgten generelle Voruntersuchungen zur APP-Expression und Prozessierung in HT-22 Zellen.

2.6.1. APP-Expression und -Prozessierung in HT-22 Zellen.

Lösungen

- Gamma-Sekretase-Inhibitor Stammlösung, 1 mM DAPT (N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) in Dimethylsulfoxid (DMSO)

Für die Untersuchung der APP-Expression und Prozessierung, wurden die HT-22 Zellen in Zellkulturflaschen (80 cm²) ausgesetzt und über zwei Tage bis zu einer 80%igen Konfluenz propagiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit Medium (ohne Zusätze) gewaschen. Danach erfolgte die zwanzigstündige Inkubation (37°C) mit und ohne dem γ -Sekretase-spezifischen Inhibitor DAPT (0,5 μ M). Nach beendeter Inkubation wurden die Inkubationslösungen entfernt und die Zellen auf Eis zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Präparation des Zell-Lysates. In diesem wurde der Proteingehalt bestimmt und eine Western Blot Untersuchung durchgeführt. Gleiche Proteinmengen (100 μ g) aus den verschiedenen Inkubation wurden mittels SDS-PAGE (Gradientengel) aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und einer Immundetektion unterzogen. Unprozessiertes APP und sein C-terminales Fragment wurden mit einem anti-C-terminalen APP Antikörper detektiert.

2.6.2. Cholesterolsensitivität der APP-Prozessierung

Lösungen

- Simvastatin Stammlösung, 10 mM Simvastatin (Natrium-Salz) in Dimethylsulfoxid (DMSO), (Calbiochem, Art.-Nr. 567021).

Die Experimente zur Cholesterolsensitivität der APP-Prozessierung erfolgten analog zu den in 2.6.1. beschriebenen Versuchen. Es wurde jedoch in einem zusätzlichen Inkubationsansatz mit Simvastatin (10 μM) zur Cholesterolverarmung der Zellen inkubiert. Die Inkubationsmedien bei diesen Versuchen enthielten kein normales Rinderserum, sondern wurden mit 10 % Lipoprotein-defizientem Rinderserum versetzt. Auf diese Weise sollte der Cholesterolgehalt des Mediums möglichst niedrig gehalten werden. Abweichend von 2.6.1. erfolgte die DAPT-Inkubation mit 1 μM statt 0,5 μM Inhibitor. Die Auswertung der Versuche erfolgte analog zu 2.6.1. mittels Western Blot. Es wurden jedoch lediglich 30 μg Zellprotein pro Ansatz eingesetzt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des Cholesterolgehaltes der Zell-Lysate mittels Amplex[®] Red Assay. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchsansätzen wiederholt.

2.6.3. APP-Prozessierung in Gegenwart von Apo E3 und E4-angereicherter HDL

Für die Untersuchung eines möglichen Apo E-Einflusses auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) erfolgte die Inkubation von HT-22 Zellen mit Apo E3 und Apo E4-angereicherter HDL. Nach beendeter Inkubation wurde prozessiertes und unprozessiertes APP im Zell-Lysat mittels Western Blot detektiert werden. Die Zellen wurden für diese Experimente in Zellkulturflaschen (80 cm^2) ausgesetzt und über zwei Tage bis zu einer 80%igen Konfluenz propagiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit Medium (ohne Zusätze) gewaschen. Danach erfolgte die zwanzigstündige Inkubation (37°C) mit den Liganden. Als Ausgangsmaterial diente hierfür eine Präparation humaner Apo E-freier HDL, an welche rekombinantes humanes Apo E3 bzw. E4 (bakteriell erzeugt) assoziiert wurde. Die resultierenden Inkubationslösungen hatten eine Apo E-Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sowie einen HDL-Proteingehalt von ebenfalls 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Ligandenlösungen wurden mit Medium (DMEM) hergestellt, welchem anstelle von normalem Rinderserum 10 % Lipoprotein-defizientes Rinderserum (LPDS) zugesetzt war. Auf diese Weise sollte die Zufuhr exogenen Cholesterols während der Inkubation minimiert werden. Zur Kontrolle wurde auch mit Apo E-freier HDL (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sowie nur mit Medium (DMEM mit 10 % LPDS) inkubiert. Um den Einfluss der Apo E3 und E4-Inkubation auf die APP-Prozessierung besser beurteilen zu können, wurde bei einer weiteren Kontrolle mit einem Gamma-Sekretase spezifischen Inhibitor (DAPT, 1 μM in DMEM mit 10% LPDS) inkubiert. In diesem Ansatz sollte es durch die spezifische Inhibition der Gamma-Sekretase zu einer Anreicherung von C-terminalen APP-Fragmenten in den Zell-Lysaten kommen, weil diese nicht abgebaut werden können. Nach beendeter Inkubation wurden die Inkubationslösungen entfernt und die Zellen auf Eis zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Präparation des Zell-Lysates. In diesen wurde der Proteingehalt sowie die Cholesterolkonzentration (Amplex-Red Methode)

bestimmt und eine Western Blot Untersuchung durchgeführt. Gleiche Proteinmengen aus den verschiedenen Inkubationen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und einer Immundetektion unterzogen. Unprozessiertes APP bzw. N-terminales lösliches APP-Fragment wurden mit einem gegen den N-Terminus des Proteins gerichteten Antikörper detektiert (unprozessiertes APP zusätzlich auch mit dem anti-C-terminalen Antikörper nachgewiesen). Die C-terminalen Fragmente dagegen mit einem anti-C-terminalen Antikörper detektiert. Zur Kontrolle eines gleichmäßigen Probenauftrages erfolgte auch die Immundetektion von Aktin (Aktinkontrolle). Das Experiment wurde in drei unabhängigen Versuchsansätzen wiederholt.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des intrazellulären Lipidstoffwechsels neuronaler Zellen. Insbesondere soll die Aufnahme und die intrazelluläre Distribution von Apolipoprotein E-haltigen Lipoproteinen untersucht werden. Eine notwendige Voraussetzung für die experimentelle Klärung dieser Fragestellung war daher die Auswahl eines geeigneten neuronalen Zellsystems sowie die Präparation geeigneter Modell-Liganden (Lipoproteine).

3.1. Auswahl und Charakterisierung des Zellsystems

Grundsätzlich gibt es zwei Arten von *in vitro* Zell-Systemen. Zum einen die Primärkultur, die eine kurzzeitige Kultivierung von Zellen darstellt, die direkt aus dem Ursprungsgewebe gewonnen werden. Alternativ kann die Kultivierung stabiler Zell-Linien monoklonalen Ursprungs erfolgen, die in der Regel durch Subkultivierung und klonale Selektion aus der Primärkultur von immortalen oder immortalisierten Tumorzellen gewonnen werden.

Zu Beginn dieser Arbeit galt es daher, die grundsätzliche Entscheidung zwischen Primärkultur von murinen Neuronen oder der Kultivierung einer neuronalen Zell-Linie klonalen Ursprungs zu fällen. Nach eingehender Literaturrecherche und einigen Vorversuchen fiel die Entscheidung zu Gunsten der neuronalen Zell-Linien aus, da die Primärkultur von murinen Neuronen einige entscheidende Nachteile für die zu bearbeitende Fragestellung aufweist. Zunächst sind Primärkulturen von murinen Neuronen relativ schwer anzulegen und lassen sich nur kurzzeitig kultivieren. Selbst unter günstigsten Bedingungen divergieren die einzelnen Präparationen in ihrer Qualität und zellulären Zusammensetzung, weshalb die Reproduzierbarkeit von Experimenten stark limitiert ist. Gleichzeitig stellen sie lediglich neuroneneiche Präparationen dar, die durch andere Zelltypen (z.B. Gliazellen) kontaminiert sind, so dass potentiell zu beobachtende Effekte nicht eindeutig einer Zellart zugeordnet werden können. Die Primärkultur muriner Neuronen erfolgt zudem mit embryonalen Nervenzellen, die somit auch über einen pränatalen Cholesterolverstoffwechslung verfügen und auch funktionell nicht mit adulten Neuronen übereinstimmen (vergl. Abschnitt 1.1.). Der große Vorteil einer Primärkultur, die vermeintlich größere Nähe zum physiologischen Vorbild, gilt für die Primärkultur muriner Neuronen nur in bedingtem Maße, so dass ihre experimentellen Nachteile überwiegen.

Die Homogenität und zuverlässigere Kultivierbarkeit von neuronalen Zell-Linien waren für die angestrebten Untersuchungen zum intrazellulären Lipidstoffwechsel von großer Bedeutung, erlaubten sie doch die Durchführung einer größeren Anzahl von Experimenten unter standardisierten Bedingungen. Die Kultur neuronaler Zell-Linien stellt zwar kein

physiologisches Modell von Neuronen dar, war aber unter den gegebenen Umständen das beste zur Verfügung stehenden *in vitro* Zell-System.

3.1.1. Die untersuchten Zell-Linien

Zu Beginn dieser Arbeit standen verschiedene Zell-Linien neuronalen Ursprungs zur Auswahl. Es handelte sich dabei um die humane monoklonale Neuroblastomzell-Linie LA-N-5 (Seeger et al., 1982), die murine monoklonale Neuroblastomzell-Linie Neuro2a (Olmsted et al., 1970) sowie die monoklonale, immortalisierte hippocampale Zell-Linie HT-22 (Morimoto and Koshland, Jr., 1990; Maher and Davis, 1996). All diesen Zell-Linien ist gemein, dass sie adhärent wachsen und keiner zusätzlichen Beschichtung des Zellkulturmaterials bedürfen. Die Abstammung und die Kultureigenschaften machten die genannten Zell-Linien zu potentiellen Kandidaten für die angestrebten *in vitro* Experimente. Die verschiedenen Zell-Linien wurden daher in Kultur genommen (vergl. dazu 2.1.1.) und lichtmikroskopisch sowie immunhistochemisch untersucht (2.1.3.). Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt.

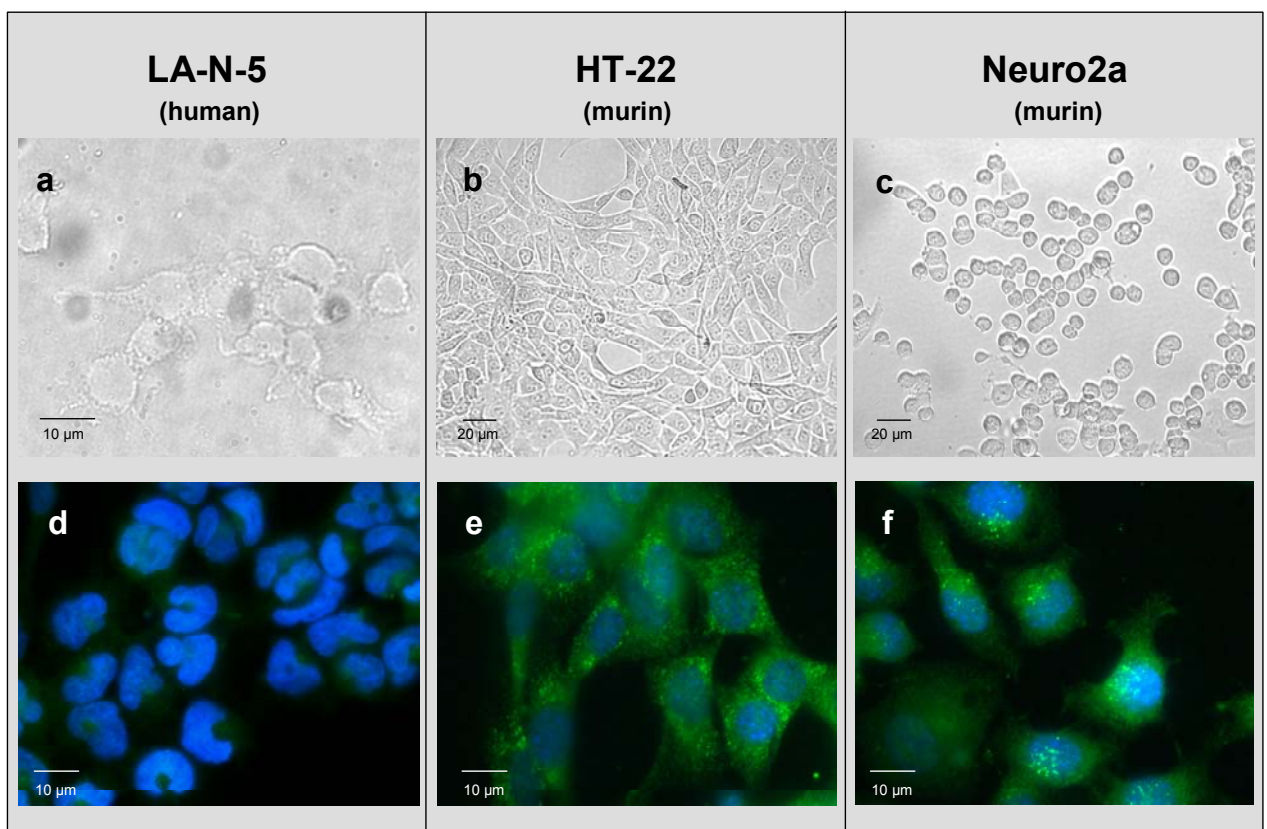


Abb. 10. Lichtmikroskopische und immunhistochemische Untersuchung der verschiedenen neuronalen Zell-Linien.

(a-c) Lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Zell-Linien; (d-f) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zell-Linien nach Inkubation mit Apo E-haltigen Lipoproteinen (HDL_E) und anschließender immunhistochemischer Untersuchung (grün = Apo E; blau = DNA). Größenmaßstab im jeweiligen Bild.

Bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen (a-c) wurde deutlich, dass lediglich die HT-22 Zellen (b) während des Wachstums kurze Ausläufer bildeten. LA-N-5 (a) und Neuro2a (c) zeigten dagegen eine eher sphärische Morphologie. Mit der immunhistochemischen Untersuchung (d-f) sollte geprüft werden, ob die verschiedenen Zell-Linien in der Lage sind, lipoproteinassoziertes Apo E aufzunehmen. Hierfür wurden die Zellen 1 h bei 37°C mit Apo E-haltigen Lipoproteinen aus humanem Plasma inkubiert (HDL_E, 10 µg/ml) und anschließend immunhistochemisch untersucht. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde dabei Apo E detektiert (grün) sowie zur besseren Orientierung die Zellkerne (genauer die in ihnen enthaltene DNA) mit DAPI gefärbt (blau). Alle Zell-Linien zeigten eine zytoplasmatische Färbung für Apo E, wobei die Intensität von den HT22 (e) über die Neuro2a (f) zu den LA-N-5 (d) abnahm. Außerdem schien lediglich bei den HT-22 und den Neuro2a-Zellen die Morphologie nach der Fixierung erhalten zu bleiben. Die LA-N-5 verloren dagegen einen Teil ihrer Adhärenz, wodurch die Zellkerne eigentümlich deformiert erschienen. Quintessenz dieser ersten Untersuchungen war, dass die HT22 aufgrund ihrer Morphologie und der potenten Apo E-Aufnahme als geeignetes Zellmodell für die angestrebten Experimente erschienen. Für eine abschließende Auswahlentscheidung war jedoch noch zu prüfen, ob die Zellen auch über geeignete Lipoproteinrezeptoren verfügten.

3.1.2. Lipoproteinrezeptoren

Wie in Abschnitt 1.4. bereits dargestellt vermitteln die Lipoproteinrezeptoren die Aufnahme von Lipoproteinen und die selektive Aufnahme von Lipiden in die Zielzellen. Im Säugetier-Gehirn sind daher zahlreiche Lipoproteinrezeptoren nachweisbar. Primär sind dies die Mitglieder der erweiterten LDL-Rezeptorfamilie, darunter der LDL-Rezeptor, LRP1, LRP2 (gp 330, Megalin), der VLDL-Rezeptor sowie SorLA (LR11). Daneben findet sich aber auch noch der Scavenger Rezeptor der Klasse B Typ I, welcher den selektiven und bidirektionalen Austausch von Cholesterol und Cholesterylestern zwischen Zellen und Lipoproteinen vermitteln kann. Der Lipoproteinrezeptorbesatz der einzelnen neuronalen Zell-Linien wurde mittels Western Blot untersucht. Hierbei erfolgte der spezifische Nachweis der jeweiligen Proteine in den Zell-Lysaten der einzelnen Zell-Linien mittels Immundetektion durch spezifische Antikörper (vergl. Abschnitt 2.4.3.). Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. 11 dargestellt.

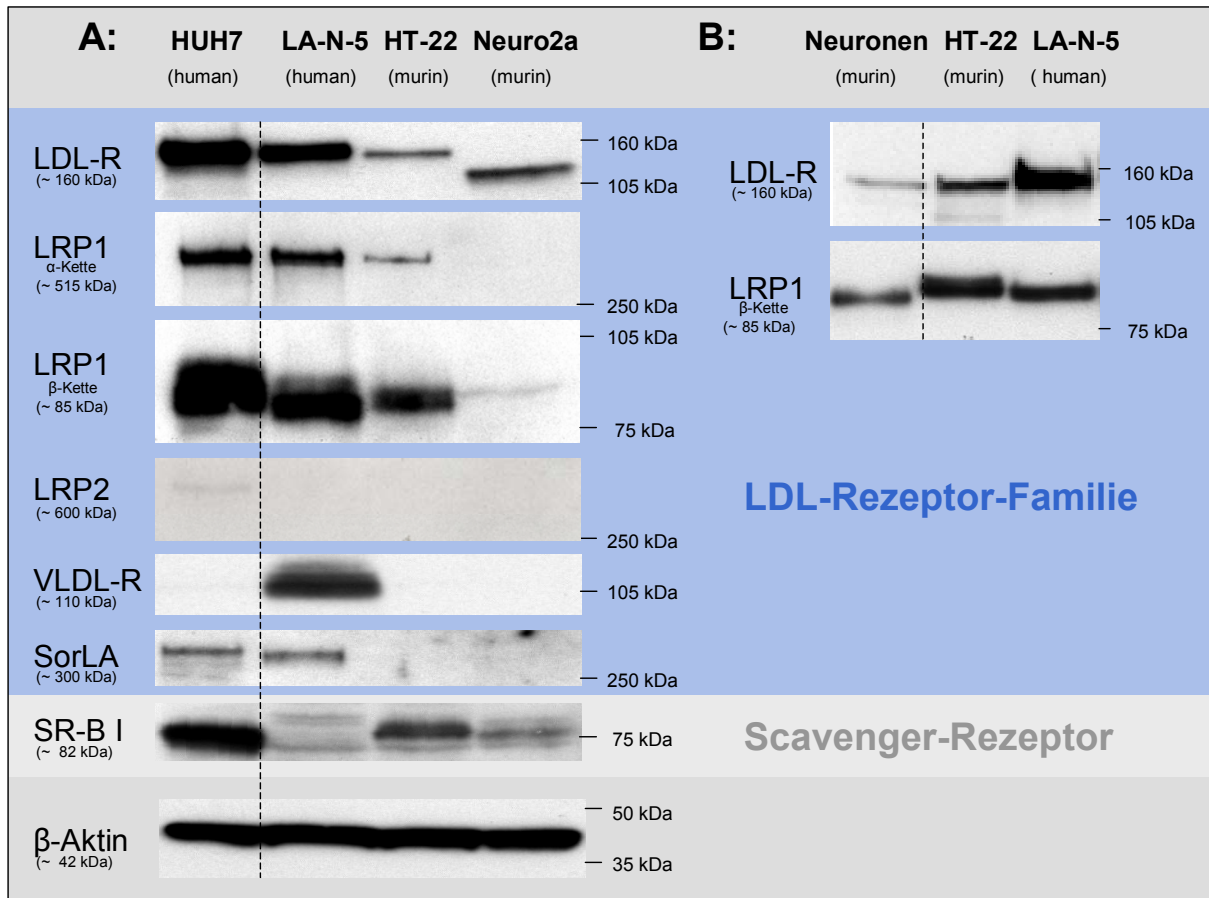


Abb. 11. Analyse des Lipoprotein-Rezeptorbesatzes der neuronalen Zell-Linien.

A: Western Blot Untersuchung von Gesamtzellproteinpräparationen der neuronalen Zell-Linien sowie einer humanen Hepatoma-Zell-Linie (HUH7) als Kontrolle (je 100 µg Gesamtzellproteinpräparation eingesetzt; Detektion von β-Aktin als Ladekontrolle). B: Western Blot Untersuchung zum Expressionsverhältnis von LRP1 und LDL-R in Gesamtzellproteinpräparationen von ausgewählten neuronalen Zell-Linien mit einer Membranproteinpräparation von murinen Neuronen als Kontrolle (je 100 µg Gesamtzellproteinpräparation für die Zell-Linien und 20 µg Membranproteinpräparation für die Neuronen eingesetzt). Die nachgewiesenen Rezeptoren sowie der Molekulargewichtsmarker sind indiziert. Blau unterlegte Blots zeigen den Nachweis von Rezeptoren der LDL-R-Familie. Der Hellgrau unterlegte Blot zeigt den Nachweis des Scavenger Rezeptors. Alle verwendeten Antikörper erkennen sowohl das humane als auch das murine Protein.

Die Western Blot Untersuchung der Zell-Lysate ergab, dass die neuronalen Zell-Linien in verschiedenem Umfang Lipoproteinrezeptoren exprimieren (Abb. 11A). Die humane Neuroblastom Zell-Linie LA-N-5 exprimierte bis auf LRP2 alle der getesteten Rezeptoren der LDL-R Familie. Im Einzelnen waren dies der LDL-R, LRP1, der VLDL-R sowie SorLA. Die Expression des Scavenger Rezeptors (SR-BI) konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Besonders auffällig war das relativ starke Signal für LDL-R, LRP1 und VLDL-R. Die murine immortalisierte hippocampale Zell-Linie HT-22 hingegen schien prädominant LRP1, LDL-R und SR-BI zu exprimieren. Nicht nachweisbar waren LRP2, VLDL-R und SorLA. Auffällig war das im Verhältnis zum LDL-R recht starke Signal für LRP1. Die murine Neuroblastomzell-Linie Neuro2a zeigte lediglich die Expression von LDL-R und in geringem Umfang von LRP1 sowie SR-BI. Die anderen Rezeptoren waren hingegen nicht nachweisbar. Besonders

auffällig war das divergierende Migrationsverhalten der LDL-R Bande. Der LDL-R schien in den Neuro2a-Zellen ein geringeres apparentes Molekulargewicht aufzuweisen. Mögliche Ursache ist eine abweichende Glykosylierung des Proteins in diesen Zellen, so hat der nicht glykosylierte LDL-R ein errechnetes Molekulargewicht von ca. 95 kDa. Diese aberrierende Glykosylierung muss jedoch nicht zwangsläufig Einfluss auf die Funktionalität des Rezeptors haben.

Zusammenfassend war festzustellen, dass lediglich die Zell-Linien LA-N-5 und HT-22 den für die angestrebten Untersuchungen notwendigen Rezeptorbesatz aufwiesen. Beide exprimierten den wichtigsten Lipoproteinrezeptor auf Neuronen, LRP1 (vergl. Abschnitte 1.1. und 1.4.). Die Neuro2a hingegen zeigten nur ein schwaches Signal für LRP1, weshalb sie für die angestrebten Untersuchungen nicht in Frage kamen.

Zur Evaluation des Expressionsverhältnisses von LRP1 zu LDL-R in den beiden verbliebenen Zell-Linien erfolgte eine neuerliche Western Blot Untersuchung der beiden Zell-Linien, wobei nochmals LRP1 und LDL-R detektiert und als Kontrolle die Membranproteinpräparation muriner Neuronen mitgeführt wurde (Abb. 11B).

Wie bei den Neuronen zu erkennen gewesen war, war LRP1 der prädominante Rezeptor im Vergleich zum LDL-R. Die HT-22 zeigten ein vergleichbares Verhältnis dieser beiden Signale, wobei die LRP1-Bande ein leicht erhöhtes apparentes Molekulargewicht aufwies. Ursache ist auch hier vermutlich eine divergierende Glykosylierung. Wie in Abschnitt 1.4. bereits beschrieben, ist die β -Kette des LRP1 gewebsspezifisch glykosyliert. In der Leber ist sie stärker glykosyliert als im Gehirn. Dies wurde auch an der Kontrolle in Abb. 11A deutlich; hier wiesen die Hepatomazellen (HUH7) analog zu den HT-22 ebenfalls eine Retardierung der LRP1-Bande auf. Die unterschiedliche Glykosylierung des LRP1 hat jedoch keine funktionellen Auswirkungen auf den Rezeptor, sondern wirkt sich allenfalls auf seine proteolytische Stabilität aus. Die LA-N-5 hingegen schienen prädominant LDL-R zu exprimieren.

Die abschließende Bewertung der Western Blots aus 11A und B ergab, dass die HT-22 über den für die angestrebten Untersuchungen geeignetsten Lipoproteinrezeptorbesatz verfügten. Sie exprimierten prädominant LRP1 und neben LDL-R und SR-BI keine weiteren Lipoproteinrezeptoren. Die LA-N-5 hingegen exprimierten zwar auch LRP1, zeigten jedoch eine stärkere Expression von LDL-R sowie die Expression anderer Lipoproteinrezeptoren. Die Neuro2a zeigten hingegen nur eine extrem schwache Expression von LRP1. Generell ist jedoch anzumerken, dass aus den Western Blot Untersuchungen keine absoluten quantitativen Aussagen getroffen werden können, jedoch im Vergleich zu den Kontrollen semiquantitative Abschätzungen möglich sind.

Berücksichtigt man zusätzlich die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen aus Abschnitt 3.1.1., so schienen die HT22-Zellen das geeignete Zell-System für die

Untersuchung der LRP1 vermittelten Aufnahme von Apo E-haltigen Lipoproteinen in neuronale Zellen zu sein.

Um den Lipoproteinrezeptorbesatz der HT-22 Zellen noch weiter zu charakterisieren und insbesondere die Funktionalität des Schlüsselrezeptors LRP1 zu überprüfen, erfolgten noch eingehendere Untersuchungen.

3.1.3. Funktionalität der Lipoproteinrezeptoren

Die intrazellulären Distribution von LDL-R und LRP1 in HT-22 Zellen wurde durch den spezifischen Nachweis der beiden Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz in fixierten und permeabilisierten Zellen (vergl. Abschnitt 2.1.3.) untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 12A dargestellt.

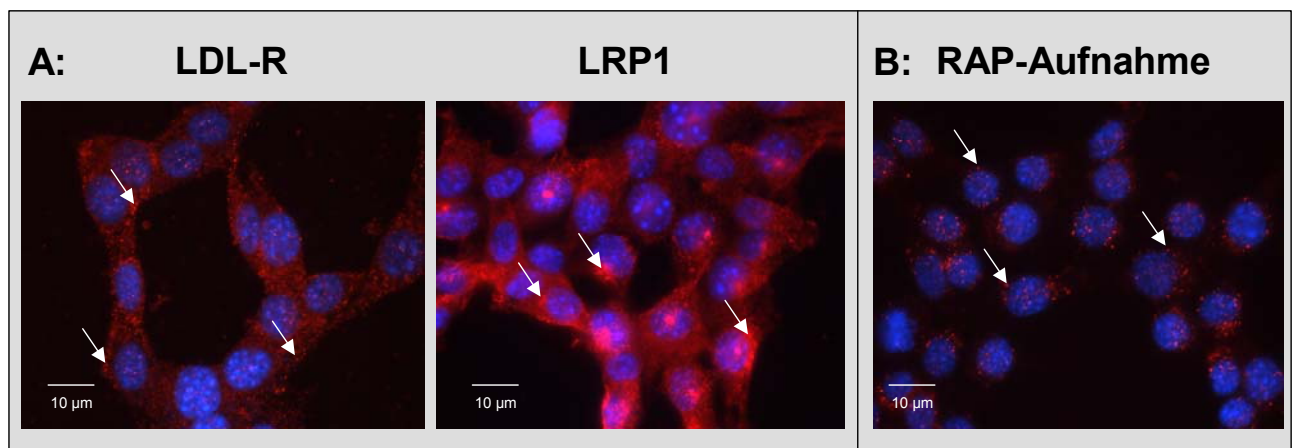


Abb. 12. Immunhistochemische Untersuchung der HT-22 Zellen bezüglich der intrazellulären Distribution und Funktionalität der Lipoproteinrezeptoren.

A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HT-22 nach immunhistochemischer Detektion von LDL-R und LRP1 mittels indirekter Immunfluoreszenz (rot = LDL-R bzw. LRP1; blau = DNA). B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HT-22 Zellen nach einstündiger Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten LRP1-Liganden RAP (20 µg/ml) (rot = RAP, blau = DNA). Größenmaßstab im jeweiligen Bild. Die detektierten Proteine sind in der oberen Zeile angegeben, und repräsentative Signale mit Pfeilen indiziert. Die Spezifität der Färbung in der indirekten Immunfluoreszenz wurde durch eine Zweit-Antikörperkontrolle überprüft (nicht gezeigt).

Die immunhistochemischen Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse der Western Blot Untersuchung (siehe Abb. 11B). Sowohl LDL-R als auch LRP1 ließen sich mittels indirekter Immunfluoreszenz in den HT-22 Zellen nachweisen. Obwohl auch die Immunhistochemie keine absolut quantitativen Aussagen zulässt, war doch zu erkennen, dass eine starke LRP1-Färbung einer relativ moderaten LDL-R Färbung gegenüberstand.

Die intrazelluläre Distribution der Rezeptoren war ebenfalls erwartungsgemäß. LDL-R war eher cytoplasmatisch und an der Plasmamembran detektierbar, wohingegen LRP1 überwiegend perinukleär lokalisierte (Heeren et al., nicht veröffentlichte Daten) (repräsentative Signale sind mit Pfeilen hervorgehoben).

Um die Funktionalität von LRP1 zu überprüfen, erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Liganden RAP (receptor associated protein), einem Chaperon, welches insbesondere von LRP1 gebunden und endozytiert wird. Das für die Inkubation eingesetzte RAP war direkt fluoreszenzmarkiert (zur Verfügung gestellt von Herrn PD Dr. Heeren), so dass seine Internalisierung über die intrazelluläre Detektion der Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Das Ergebnis der Inkubation ist in Abb. 12B dargestellt.

Fluoreszenzmarkiertes RAP war intrazellulär nachweisbar und somit ein Indiz dafür, dass das von den Zellen exprimierte LRP1 funktionell aktiv ist und die Endozytose von Liganden vermitteln kann.

Nachdem die Eignung der HT-22 Zellen für die Untersuchung der LRP1 vermittelten Aufnahme von Apo E-haltigen Lipoproteinen festgestellt wurde, sollte abschließend noch die neuronale Abstammung der Zellen überprüft werden.

3.1.4. Neuronale Marker

HT-22 Zellen gehen auf immortalisierte Zellen hippokampalen Ursprungs zurück. Sie stellen somit ein *in vitro* Zell-Modell für Neuronen dar. Zur Überprüfung dieser Abstammung wurde die Expression der neuronalen Markerproteine MAP2c (microtubule associated protein 2c) und tau (Mikrotubuli stabilisierendes Protein in Neuronen) sowie des Gliazell-Markerproteins GFAP (glial acidic fibrillary protein) im Western Blot bzw. in der Immunhistochemie untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 13 dargestellt.

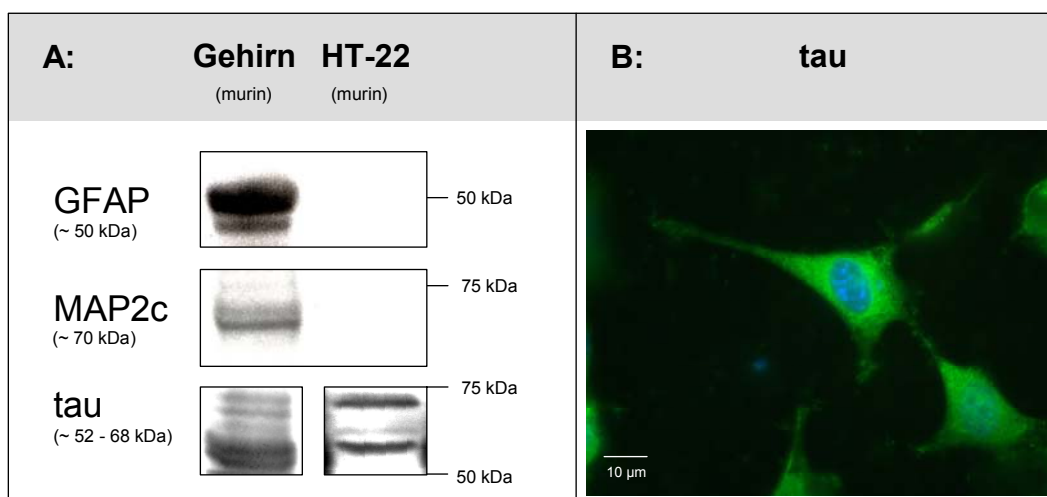


Abb. 13. Expression neuronaler Markerproteine in HT-22 Zellen.

A: Western Blot Untersuchung von HT-22 Gesamtzellproteinpräparation mit murinem Hirnextrakt als Positivkontrolle (je 30 µg eingesetzt). Die nachgewiesenen Markerproteine und der Molekulargewichtsmarker sind indiziert. B: Immunhistochemischer Nachweis des tau-Proteins mittels indirekter Immunfluoreszenz (grün = tau, blau = DNA). Größenbalken im Bild. Die Zellen wurden für diese immunhistochemische Untersuchung in einer sehr geringen Zelldichte ausgesetzt, um durch das daraus resultierende gespreizte Wachstum eine bessere cytoplasmatische Färbung zu erzielen.

In der Western Blot Untersuchung der HT-22 Gesamtzellproteinpräparation war kein gliazellspezifisches Protein (GFAP) nachweisbar. Der Neuronen-Marker MAP2c war ebenfalls nicht nachweisbar. MAP2c wird jedoch überwiegend von pränatalen Neuronen gebildet, seine Expression verringert sich in adulten Neuronen um den Faktor 10. Das zweite neuronale Markerprotein tau war jedoch eindeutig nachweisbar. Tau liegt in adulten Neuronen in verschiedenen Phosphorylierungsgraden vor. Die Postivkontrolle, der murine Hirnextrakt, enthielt sowohl Neuronen als auch Gliazellen, so dass sie für alle drei Markerproteine positiv war.

Die immunhistochemische Untersuchung auf die Expression des tau-Proteins in HT-22 Zellen (Abb. 13B) bestätigte das Ergebnis des Western Blots. Tau-Protein war erwartungsgemäß als mikrotubuli-assoziiertes Protein cytoplasmatisch nachweisbar.

Die HT-22 Zellen entsprachen somit hinsichtlich der Expression der untersuchten Markerproteine Zellen neuronalen Ursprungs und nicht den Gliazellen.

Die in Abschnitt 3.1. dargestellten Ergebnisse ließen die HT-22 als geeignetes *in vitro* Zell-Modell für die angestrebten Untersuchungen zum neuronalen Lipoproteinstoffwechsel erscheinen. Sie stellen zwar strukturell keine Neuronen mit Dendriten dar, waren jedoch in Bezug auf die zugrundeliegende Fragestellung ein geeignetes Surrogat.

3.2. Präparation und Charakterisierung der Modell-Liganden

Idealerweise sollten die Untersuchungen zum neuronalen Lipoproteinstoffwechsel mit Liquor-Lipoproteinen erfolgen. Wie in Abschnitt 1.2. aber bereits dargestellt wurde, ist die Verfügbarkeit dieser Partikel stark limitiert. Das gesamte Liquorvolumen eines erwachsenen Menschen beträgt lediglich 140 ml. Gleichzeitig ist die Lipoproteinkonzentration um ein vielfaches geringer als im Plasma. Der Liquor cerebrospinalis ist zudem nur durch eine Lumbalpunktion zu gewinnen.

Auf der Suche nach geeigneten Modell-Liganden für Liquor-Lipoproteinpartikel gerieten daher die leichter zugänglichen Plasma-Lipoproteine in den Fokus. Die HDL des Plasmas sind in Dichte, Durchmesser sowie in Lipid- und Apolipoproteinzusammensetzung den Liquor-Lipoproteinen sehr ähnlich (vergl. Abschnitt 1.2.), so dass diese als potentielle Modell-Liganden ausgewählt wurden.

3.2.1. Präparation und Charakterisierung von Plasma-HDL

Die Präparation humaner HDL erfolgte wie in Abschnitt 2.2. beschrieben. Als Ausgangsmaterial diente Spenderblut eines gesunden Probanden mit dem Apo E-Genotyp $\epsilon 3/3$. Die Aufarbeitung des Spenderblutes ist schematisch in Abb. 14 dargestellt.

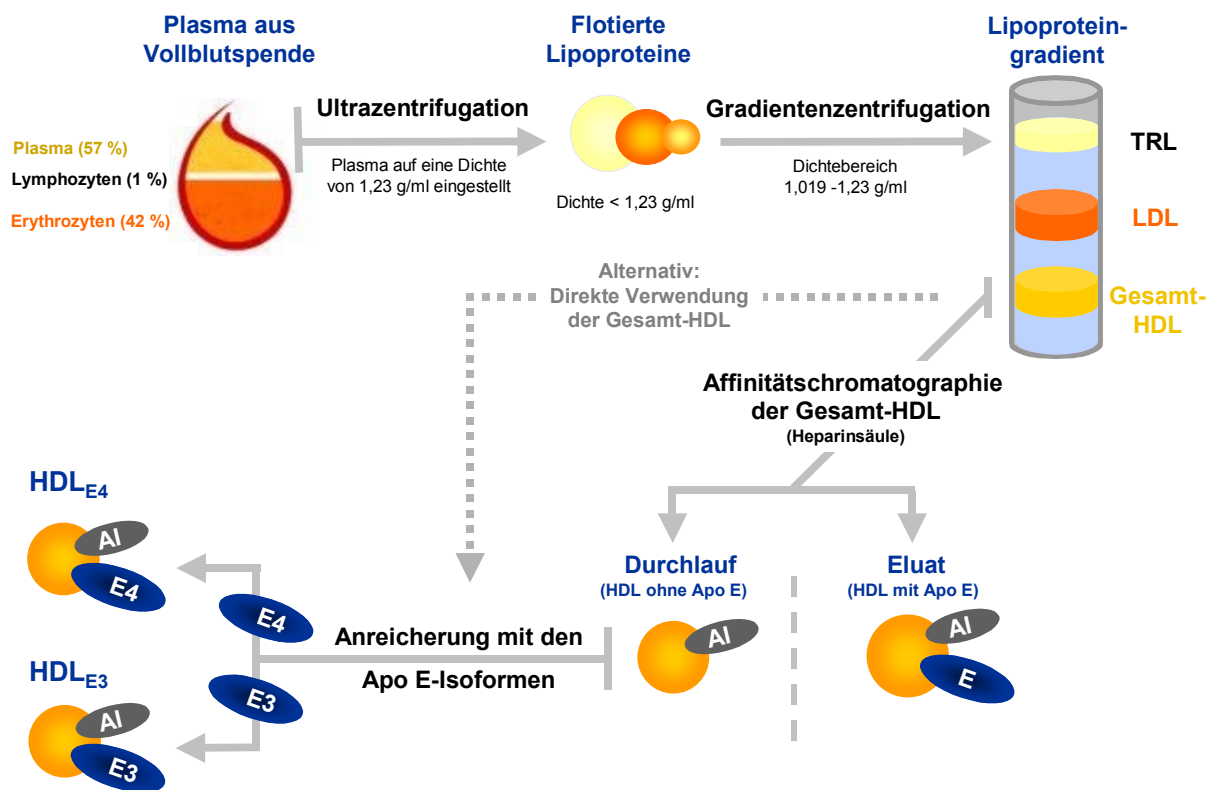


Abb. 14. Schematische Darstellung der Präparation der Modell-Liganden.

Das durch Zentrifugation aus Vollblut gewonnene Plasma wurde mit KBr auf eine Dichte von 1,23 g/ml eingestellt und einer ersten Ultrazentrifugation unterzogen. Hierbei flotierten alle Lipoproteine mit einer Dichte <1,23 g/ml. Die Auftrennung der einzelnen Lipoproteinklassen erfolgte dann mit einem zweiten Ultrazentrifugationsschritt. Hierfür wurde ein Dichtegradient geschichtet, der sich über den erweiterten Dichtebereich von LDL und HDL erstreckte (1,019 – 1,23 g/ml). Die HDL-Bande (Gesamt-HDL bestehend aus HDL₃, HDL₂ und HDL₁) wurde abgenommen und affinitätschromatographisch über eine Heparinsäule in Apo E-haltige und Apo E-freie HDL-Subklassen aufgetrennt. Die Apo E-freie HDL wurde anschließend mit definierten Mengen der einzelnen Apo E-Isoformen (Apo E3 und Apo E4) angereichert und als Modell-Ligand eingesetzt. Alternativ wurde auch direkt die präparierte Gesamt-HDL mit den Apo E-Isoformen angereichert.

Die Auftrennung der Lipoproteinklassen erfolgte durch eine zweistufige Ultrazentrifugation. Das Ergebnis einer solchen Lipoproteinpräparation mittels Ultrazentrifugation ist exemplarisch in Abb. 15 dargestellt.

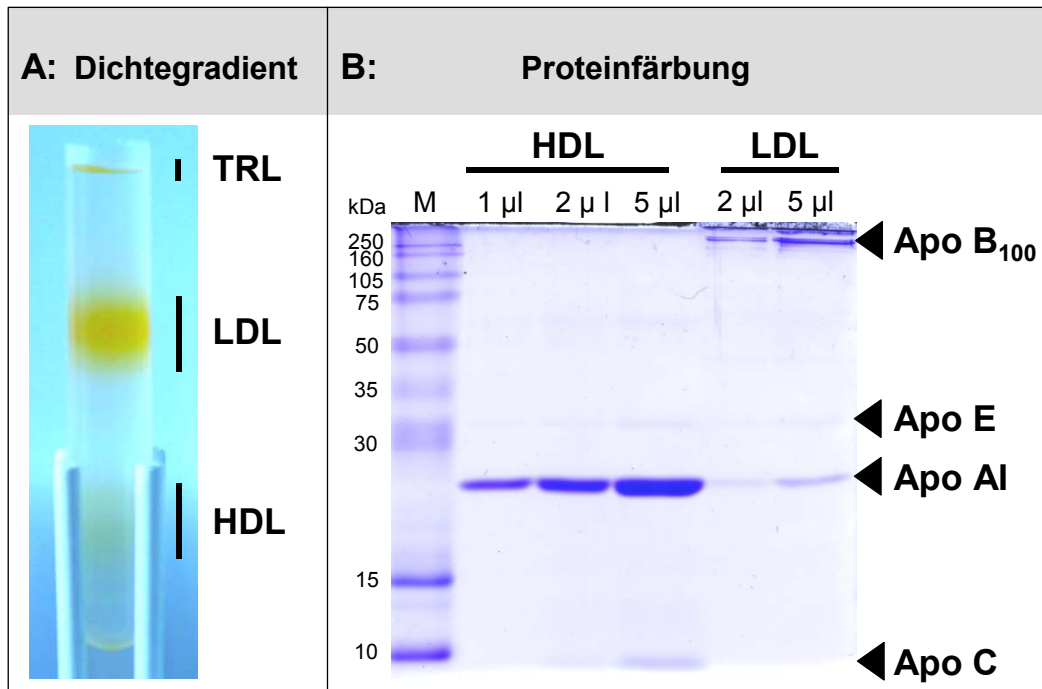


Abb. 15. Separation der Lipoproteinklassen aus humanem Plasma.

A: Lipoproteine nach Gradienten-Ultrazentrifugation (Dichtebereich 1,019-1,23 g/ml). Die einzelnen Lipoproteinklassen sind gekennzeichnet. B: Proteinfärbung (Coomassie-Färbung) der Apolipoproteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Lipoproteinproben. Es wurden unterschiedliche Volumina der präparierten Lipoproteinklassen eingesetzt (LDL zur Kontrolle mitgeführt). Die Apolipoproteine und der Molekulargewichtsmarker (M) sind gekennzeichnet.

Nach dem zweiten Ultrazentrifugationsschritt, der Gradienten-Ultrazentrifugation (Dichtebereich 1,019 – 1,23 g/ml) ergab sich folgendes Bild (Abb. 15A): Die Triglyzeridreichen Lipoproteine (TRL) mit einer Dichte von < 1,019 g/ml waren flotierrt. Im mittleren Teil des Zentrifugenröhrchens befanden sich die LDL und darunter die HDL. Bei genauerer Betrachtung der „HDL-Bande“ im Gradienten war eine Doppelbande erkennbar, welche durch die HDL-Subklassen HDL₂ und HDL₃ hervorgerufen worden war (leider lässt die Qualität der Fotografie keine bessere Darstellung zu).

Die Gesamt-HDL-Fraktion (HDL-Doppelbande) wurde dem Gradienten zur weiteren Aufarbeitung entnommen und parallel dazu einer genaueren Analyse unterzogen. Hierfür erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Lipoproteine mit anschließender Proteinfärbung des Geles (vergl. Abschnitte 2.4.1. und 2.4.2.). Das Ergebnis ist in Abb. 15B dargestellt.

Bei der durchgeführten Proteinfärbung wurden unspezifisch alle Apolipoproteine der aufgetrennten Lipoproteine angefärbt. Die Proteinmuster zeigten das erwartete Ergebnis.

Die Gesamt-HDL-Fraktion enthielt prädominant Apo AI (28 kDa), welches das Hauptapolipoprotein der HDL ist. Daneben waren auch Spuren von Apo E (34 kDa) und der C Apolipoproteine (6-9 kDa) nachweisbar, welche ebenfalls für HDL beschrieben sind (vergl.

Tab. 1 in Abschnitt 1.2.). In der als Kontrolle mitgeführten LDL-Fraktion fand sich hingegen überwiegend Apo B₁₀₀ (549 kDa), das Strukturprotein von LDL. In Spuren waren auch Apo AI und Apo E detektierbar.

Die präparierte HDL entsprach somit hinsichtlich ihres Apolipoproteinbesatzes den Literaturangaben (vergl. Abschnitt 1.2.).

Zur weiteren Charakterisierung der präparierten HDL erfolgte noch eine Analyse mittels Gelfiltrationschromatographie (FPLC) sowie die Bestimmung der Lipidzusammensetzung.

Das Ergebnis der Gelfiltrationschromatographie ist in Abb. 16 dargestellt.

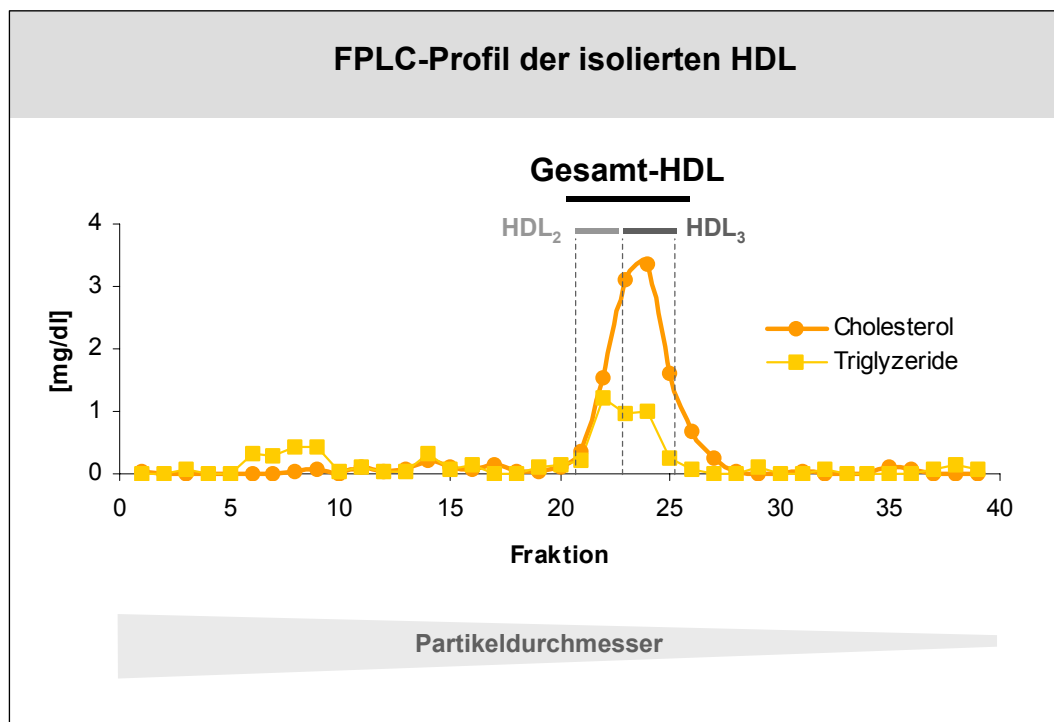


Abb. 16. Gelfiltrationschromatographie-Profil (FPLC-Profil) der präparierten Gesamt-HDL.

100 µl einer Gesamt-HDL-Präparation wurden mit Gelfiltrationspuffer versetzt und in einem Gesamtvolumen von 200 µl auf die Gelfiltrationschromatographiesäule (Superdex 200) geladen. Der Durchlauf wurde in Fraktionen zu je 500 µl gesammelt und der Cholesterin- und Triglyceridgehalt bestimmt. Die Kurven stellen den Konzentrationsverlauf über die einzelnen Fraktionen dar (gelb = Triglyceride, orange = Cholesterin). Die Gesamt-HDL sowie die HDL-Subklassen sind den jeweiligen Fraktionsbereichen zugeordnet. Die Partikelgröße nimmt mit steigender Fraktionszahl ab.

Mittels Gelfiltrationschromatographie (FPLC) sollte die Reinheit der HDL-Präparation sowie die Partikelgröße überprüft werden. Das Verfahren der Gelfiltrationschromatographie ist in Abschnitt 2.2.6. näher erläutert. Da HDL cholesterolreiche Lipoproteine darstellen, kann die Distribution der Partikel über die einzelnen Fraktionen mittels Cholesterinbestimmung verfolgt werden. Um eine Kontamination mit triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) auszuschließen und die HDL-Subklassen zu identifizieren, erfolgte gleichzeitig eine Bestimmung der Triglyzeridkonzentration.

Das Verteilungsmuster der Lipoproteine in der Probe entsprach dem von HDL. So fanden sich die Cholesterolspitzenwerte zwischen Fraktion 22 und 26. Eine Kontamination mit TRL, die im Fraktionsbereich von 5-10 zu erwarten gewesen wäre, war nur in sehr geringem Umfang festzustellen. Der Verlauf der Triglyzeridkonzentrationskurve zeigte jedoch im Fraktionsbereich 20-26 zwei Spitzenwerte (Fraktion 22 und 24). Dies ist auf die beiden HDL-Subklassen HDL₂ und HDL₃ zurückzuführen. Die größeren und triglyzeridreicheren HDL₂ verlassen die Säule schneller als die kleineren HDL₃. Unter den gewählten Bedingungen war die Trennleistung der Säule jedoch nicht ausreichend, um beide Subpopulationen sauber voneinander zu separieren. In der Cholesterolkurve war dieser Effekt nicht so deutlich zu beobachten, weil die beiden Subklassen hinsichtlich ihres Cholesterolgehaltes nicht divergieren. Zusammenfassend ist festzustellen, dass es sich bei der untersuchten Probe um eine sehr reine Präparation von Plasma-HDL handelt.

Um die Charakterisierung der präparierten Gesamt-HDL abzuschließen, erfolgte die Analyse der Lipidzusammensetzung. Das Ergebnis ist in Tab. 4 zusammengefasst und den Literaturwerten gegenübergestellt.

	HDL (Havel et al., 1995)	HDL (isolierte Gesamt-HDL)	CSF-LpE (Koch et al., 2001)	CSF-LpEA (Koch et al., 2001)
Gesamtcholesterol [%]	20	21	17	14
Triglyzeride [%]	5	7	---	---
Phospholipide [%]	25	14	27	20
Lipide (total) [%]:	50	42	44	34
Protein (total) [%]:	50	58	56	66
Apolipoproteine	AI, AII, CI-III, E	AI, C, E	E	E, AI

Tab. 4. Lipidzusammensetzung der präparierten Gesamt-HDL.

Der Triglyzerid-, Cholesterol-, Phospholipid- und Proteingehalt in den Gesamt-HDL Präparationen wurde bestimmt. Die Messergebnisse sind in Prozent der Gesamtmasse angegeben und stellen den Mittelwert aus 11 Präparationen dar (blau unterlegt). Zur besseren Einordnung sind den eigenen Messwerten die Literaturwerte für Plasma-HDL (Havel and Rapaport, 1995) und Liquor-Lipoproteine CSF-LpE und CSF-LpEA (Koch et al., 2001) gegenübergestellt.

Die präparierten Gesamt-HDL entsprachen in ihrer Lipid- und Apolipoproteinenzusammensetzung weitgehend den Literaturwerten für Gesamt-HDL. Abweichungen, wie z.B. im Phospholipidgehalt, sind darauf zurückzuführen, dass es sich bei den isolierten HDL um die Lipoproteine nur eines Spenders handelt, wohingegen die Literaturwerte auf der Untersuchung von HDL verschiedener Spender basieren und daher eine größere Bandbreite an individuellen Schwankungen widerspiegeln. Das Fehlen von bestimmten Apolipoproteinen in der Auflistung lässt nicht auf deren Abwesenheit in den präparierten HDL schließen. Ihre Anwesenheit ist lediglich nicht näher untersucht worden.

Der direkte Vergleich mit den Literaturwerten für die Liquor-Lipoproteine zeigte die große Ähnlichkeit in der Lipidzusammensetzung (vergl. auch Abschnitt 1.2., Tab. 1). Liquor-

Lipoproteine enthalten jedoch keine signifikanten Mengen an Triglyzeriden, weil Fettsäuren im Gehirn nicht verstoffwechselt werden (vergl. Abschnitt 1.1.).

Nachdem die präparierte Gesamt-HDL eingehend charakterisiert und die Eignung als Modell-Ligand nachgewiesen worden war, konnte die weitere Aufarbeitung erfolgen.

3.2.2. Affinitätschromatographische Präparation Apo E-freier HDL

Für die angestrebten Untersuchungen zum intrazellulären Metabolismus Apo E-haltiger Lipoproteinpartikel in neuronalen Zellen werden Partikel benötigt, die einen definierten Gehalt der verschiedenen Apo E-Isoformen aufweisen. Nur auf diese Weise lassen sich potentielle isoformspezifische Unterschiede in der intrazellulären Prozessierung des Apo E verfolgen. Um solche Partikel zu generieren, wurden die präparierten Gesamt-HDL direkt mit definierten Mengen rekombinanten humanen Apo E3 und E4 angereichert (siehe Abschnitt 2.2.3.). Diese Partikel stellen jedoch eine Mischpopulation der verschiedenen HDL-Subklassen dar und weisen zum Teil einen basalen Besatz mit dem Apo E des Spenders auf. Da der Spender jedoch vom Apo E-Genotyp $\epsilon 3/3$ war, handelte es sich um Partikel mit einem Wildtyp-Hintergrund.

Für einige Experimente, insbesondere jene mit immunologischer Auswertung, war die Anwesenheit des Spender Apo E störend, da die für die Auswertung eingesetzten Antikörper nicht zwischen Spender-Apo E und rekombinatem Apo E diskriminieren können.

Es war daher notwendig HDL-Partikel zu isolieren, die kein Apo E tragen, um diese dann mit dem rekombinatem Apo E anzureichern.

Die Isolierung Apo E-freier HDL erfolgte mittels affinitätschromatographischer Auftrennung der präparierten Gesamt-HDL (siehe Abschnitt 2.2.2.). Die Gesamt-HDL wurde hierfür über eine Heparinsäule gegeben. Da Apo E über eine Heparinbindungsstelle verfügt, werden Apo E-haltige HDL (vornehmlich HDL₂) auf der Säule zurückgehalten, wohingegen Apo E-freie HDL (vornehmlich HDL₃) die Säule passieren und sich im Durchlauf wiederfinden. Nach dem Waschen der Säule konnte die Apo E-haltige HDL eluiert werden.

Die affinitätschromatographische Auftrennung der Gesamt-HDL wurde mittels Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse überprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt.

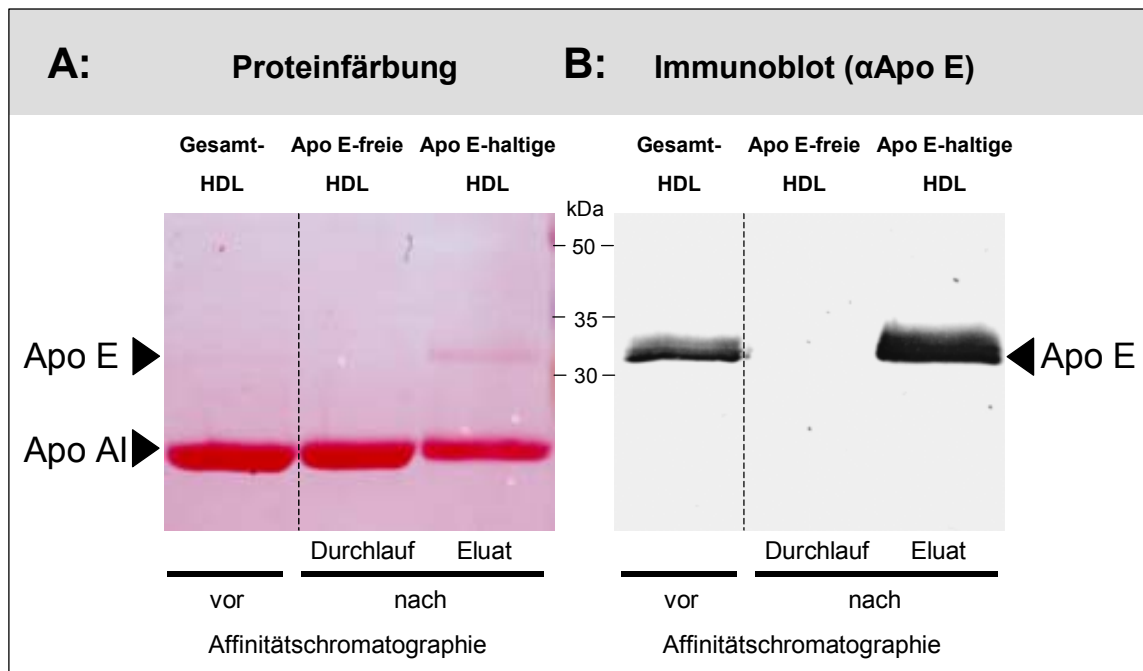


Abb. 17. Überprüfung der Affinitätschromatographische Auftrennung der präparierten Gesamt-HDL.

A: Proteinfärbung (Ponceau-Färbung) der Membran nach Elektrobloottransfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Lipoproteine. Für die Gelelektrophorese wurden die Gesamt-HDL vor Affinitätschromatographie sowie der Säulendurchlauf und das Säuleneluat nach Affinitätschromatographie eingesetzt (je 20 µg Protein in Form von Lipoproteinen aufgetrennt). B: Immunoblot derselben Membran. Detektiert wurde humanes Apo E. Die jeweiligen Apolipoproteine sowie der Molekulargewichtsmarker sind gekennzeichnet.

Die Proteinfärbung der Membran mit den gelelektrophoretisch aufgetrennten HDL-Proben (17A) zeigt eine prominente Apo AI-Bande (28 kDa) in jeder Spur. Dies ist auch zu erwarten, weil Apo AI das Hauptapolipoprotein der HDL ist. Bei den Gesamt-HDL und dem Säuleneluat wird zusätzlich eine schwache Apo E-Bande (34 kDa) sichtbar.

Der Immunoblot gegen humanes Apo E (Abb. 17B) bestätigte die Proteinfärbung und zeigte ein prominentes Apo E-Signal für das Säuleneluat sowie ein weniger starkes Signal für die Gesamt-HDL. In der Probe mit dem Säulendurchlauf war hingegen kein Apo E detektierbar.

Die affinitätschromatographische Auftrennung der Gesamt-HDL war erfolgreich und es wurden Apo E-freie HDL (Säulendurchlauf) gewonnen, die mit der jeweiligen Apo E-Isoform angereichert werden konnten.

3.2.3. Charakterisierung radioaktiver Liganden

Für die radiochemische Untersuchung der lipoproteinassoziierten Apo E-Aufnahme werden HDL-Partikel benötigt, die mit radioaktiv markiertem Apo E3 und Apo E4 angereichert sind.

Das rekombinante Apo E wurde daher mit dem Radioisotop ^{125}I (^{125}I) markiert und anschließend an die präparierte Gesamt-HDL assoziiert (vergl. Abschnitt 2.2.4.).

Bevor diese Liganden jedoch für die radiochemischen Untersuchungen eingesetzt werden konnten, musste sichergestellt sein, dass Apo E3 und Apo E4 gleichermaßen an die präparierten Gesamt-HDL assoziieren und sich keine freie Aktivität in den Ligandenlösungen befindet.

Die ^{125}I -Apo E3 und ^{125}I -Apo E4-angereicherten HDL (^{125}I -Apo E3/4 HDL) wurden daher gelelektrophoretisch aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Exemplarisch ist das Ergebnis einer repräsentativen Untersuchung in Abbildung 18. dargestellt.

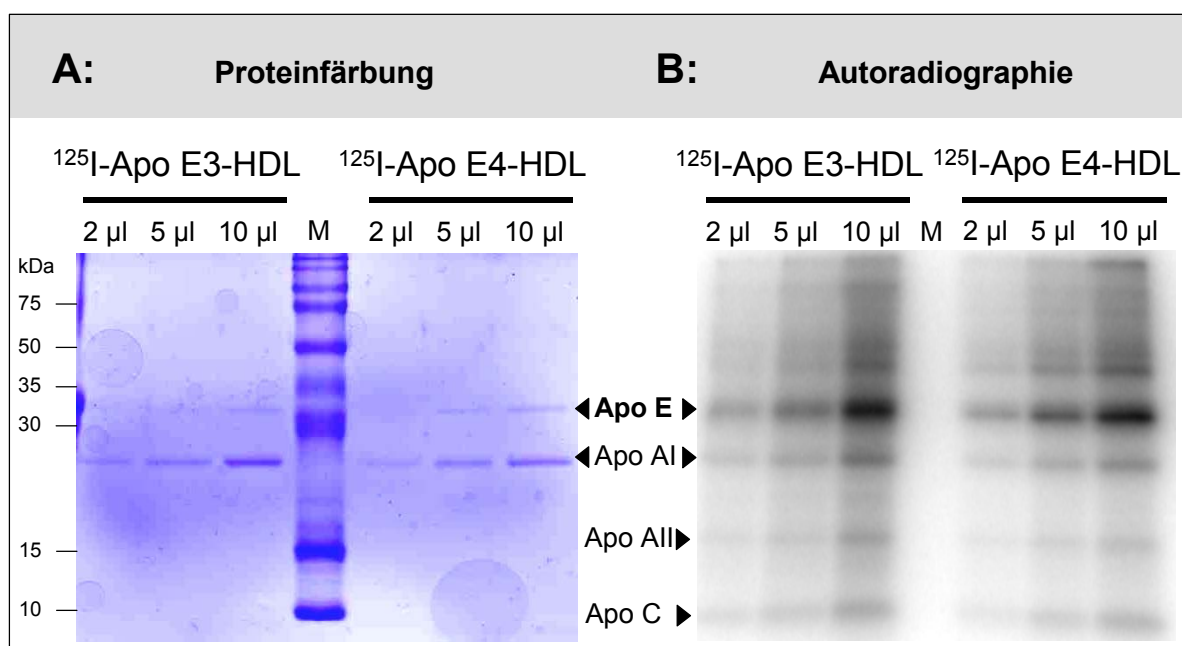


Abb. 18. Untersuchung der radioaktiven Liganden.

A: Proteinfärbung (Coomassie-Färbung) des Gels nach gelelektrophoretischer Auftrennung der radioaktiven Liganden. Es wurden unterschiedliche Volumina der präparierten Liganden eingesetzt. Beide Ligandenlösungen weisen dieselbe Konzentration bezüglich Apo E und HDL auf. Dabei entsprechen 10 μl Ligandenlösung einer eingesetzten Apo E-Menge von 0,5 μg sowie 1 μg HDL-Protein. B: Autoradiographie desselben Gels. Die Apolipoproteine und der Molekulargewichtsmarker sind gekennzeichnet.

Die Proteinfärbung des Gels (Abb. 18A) zeigte das erwartete Ergebnis. Die mit ^{125}I angereicherten HDL trugen prädominant Apo AI sowie das angereicherte Apo E. Gleichzeitig war erkennbar, dass äquivalente Proteinmengen (Apo E und HDL-Protein) in den Ligandenlösungen vorlagen (die Spuren für die Apo E4 haltigen Proben waren etwas breiter, wodurch die Banden eine leicht verringerte Intensität aufwiesen). Das Gesamtsignal war jedoch mit den Apo E3 Proben vergleichbar. Die Autoradiographie (Abb. 18B) bestätigte die spezifische Markierung des Apo E mit ^{125}I . Zwar waren auch in geringem Umfang andere Apolipoproteine der HDL markiert, die Hauptintensität entfiel jedoch auf das Apo E (> 80% in

der densitometrischen Analyse). Markiertes Apo E3 und Apo E4 lagen in den Ligandenlösungen in äquivalenten Mengen vor (auch hier gilt es die etwas größere Breite der Apo E4 Spuren zu berücksichtigen).

Nach der Überprüfung der Markierung musste validiert werden, ob das ^{125}I -Apo E3 und E4 auch gleichermaßen an die HDL assoziiert. Dies ist vor dem Hintergrund von Bedeutung, dass Apo E4 eine geringere Tendenz zur Bindung kleiner Lipoproteine aufweist als Apo E3. Um dies zu überprüfen, wurde daher eine Gelfiltrationschromatographie der Ligandenlösungen durchgeführt. Das Ergebnis einer repräsentativen Untersuchung ist Abb. 19 dargestellt.

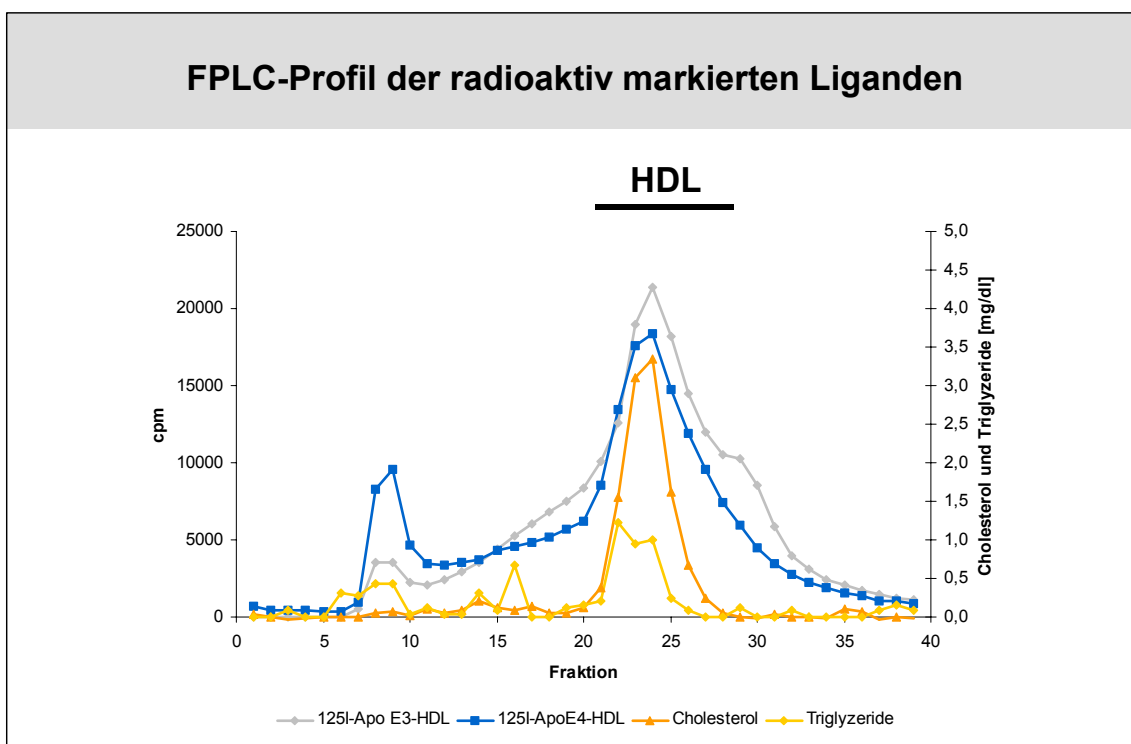


Abb. 19. Gelfiltrationschromatographie-Profil der markierten Liganden.

Je 40 μl der Ligandenlösungen (^{125}I -Apo E3 bzw. E4-HDL) wurden nacheinander auf die Säule aufgetragen und die Radioaktivität in den Fraktionen (je 500 μl) bestimmt (blau = ^{125}I -Apo E4-HDL, grau = ^{125}I -Apo E3-HDL). Die Säule wurde zwischen den Läufen gewaschen. Zur Identifizierung der HDL-Fraktionen erfolgte in einem vorher durchgeführten Lauf die Auftrennung von 100 μl unmarkierter HDL-Präparation, wobei der Cholesterol- und Triglyzeridgehalt in den Fraktionen bestimmt wurde (gelb = Triglyzeride, orange = Cholesterol). Die gemessene Radioaktivität ist in *counts per minute* (cpm) angegeben (linke Y-Achse), die Lipidwerte in mg/dl (rechte Y-Achse).

Die Auswertung der Gelfiltrationschromatographie zeigt, dass der Großteil der Aktivität (blaue und graue Kurve) partikelassoziiert vorliegt. Die Spitzenwerte für die Radioaktivität korrelieren mit den Cholesterol Spitzenwerten (Fraktionen 20-27), welche das Vorhandensein von HDL in den jeweiligen Fraktionen anzeigen. Die Radioaktivitätsprofile von ^{125}I -Apo E3-HDL und ^{125}I -Apo E4-HDL divergieren marginal, was auf eine nahezu

identische Partikelassoziation der beiden Apo E-Isoformen hinweist (besonders wenn man berücksichtigt, dass die analysierte ¹²⁵I-Apo E4-HDL eine im Vergleich zur ¹²⁵I-Apo E3-HDL leicht geringere spezifische Aktivität aufwies (539 cpm/ng Apo E4 zu 588 cpm/ng Apo E3)). Für die ¹²⁵I-Apo E4-HDL waren jedoch im Fraktionsbereich 5-10 höhere Radioaktivitätswerte messbar als für die ¹²⁵I-Apo E3-HDL. Dies könnte auf die Anwesenheit größerer triglyzeridreicher Lipoproteine hinweisen, an die Apo E4 bevorzugt assoziiert. Die sehr geringen Triglyzeridwerte in den fraglichen Fraktionen deuten auf eine geringe Kontamination mit diesen Partikeln hin. Ihr Vorhandensein ändert jedoch nichts an der Beobachtung, dass der Hauptteil der Radioaktivität HDL-assoziiert vorgelegen hat und dies in vergleichbaren Maße für Apo E3 und Apo E4 gegeben war.

Nach Auswahl des geeigneten Zell-Systems sowie der erfolgreichen Präparation und Charakterisierung der Modell-Liganden konnte mit den Untersuchungen zum intrazellulären Lipoproteinstoffwechsel neuronaler Zellen begonnen werden.

3.3. Aufnahme von Apo E3 und Apo E4 in HT-22 Zellen

Zunächst sollte die Frage geklärt werden in welchem Umfang lipoproteinassoziertes Apo E3 und Apo E4 von den neuronalen Zellen aufgenommen wird. Hierfür erfolgte die Inkubation der HT-22 Zellen mit Apo E3- bzw. Apo E4-angereicherter HDL. Die Apo E-Aufnahme wurde sowohl semiquantitativ mittels Immunhistochemie als auch quantitativ mittels radiochemischer Experimente untersucht. Das experimentelle Vorgehen ist explizit in Abschnitt 2.5.1 erläutert. Der Ablauf der Experimente ist schematisch in Abb. 20 dargestellt.

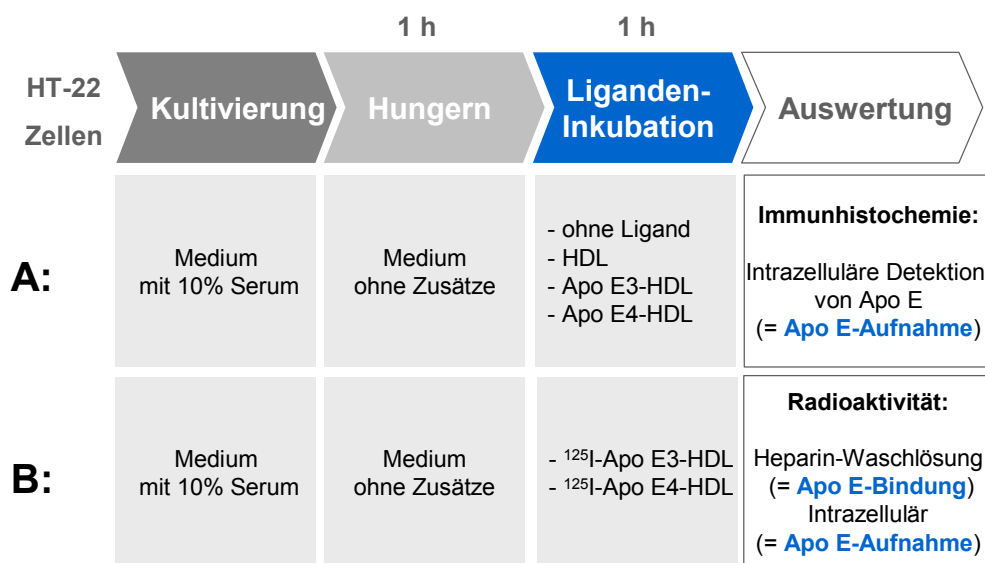


Abb. 20. Schematischer Ablauf der Versuche zur Untersuchung der Apo E-Aufnahme.

A: Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Zellen nach einstündiger Hungerphase mit vier verschiedenen Ligandenlösungen inkubiert (1 h): Zur Kontrolle wurde ohne Ligand sowie mit HDL ohne Apo E-Anreicherung inkubiert. Daneben erfolgte die Inkubation mit Apo E3 bzw. Apo E4-angereicherter HDL. Die Auswertung erfolgte mittels immunhistochemischen Nachweises des intrazellulären Apo E. B: Mit einem identischen Versuchsablauf erfolgte die Quantifizierung der Apo E-Aufnahme im radiochemischen Experiment. Als Liganden dienten hier jedoch mit ¹²⁵I-Apo E3- bzw. ¹²⁵I-Apo E4 angereicherte HDL. Die internalisierte Radioaktivität spiegelt die Apo E-Aufnahme wieder. Zusätzlich konnte durch die Bestimmung der Radioaktivität in der Heparin-Waschlösung die Menge des zelloberflächengebundenen Apo E ermittelt werden.

3.3.1. Immunhistochemische Untersuchung der Apo E3 und Apo E4-Aufnahme

Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchungen zur Apo E-Aufnahme ist in Abb. 21 dargestellt.

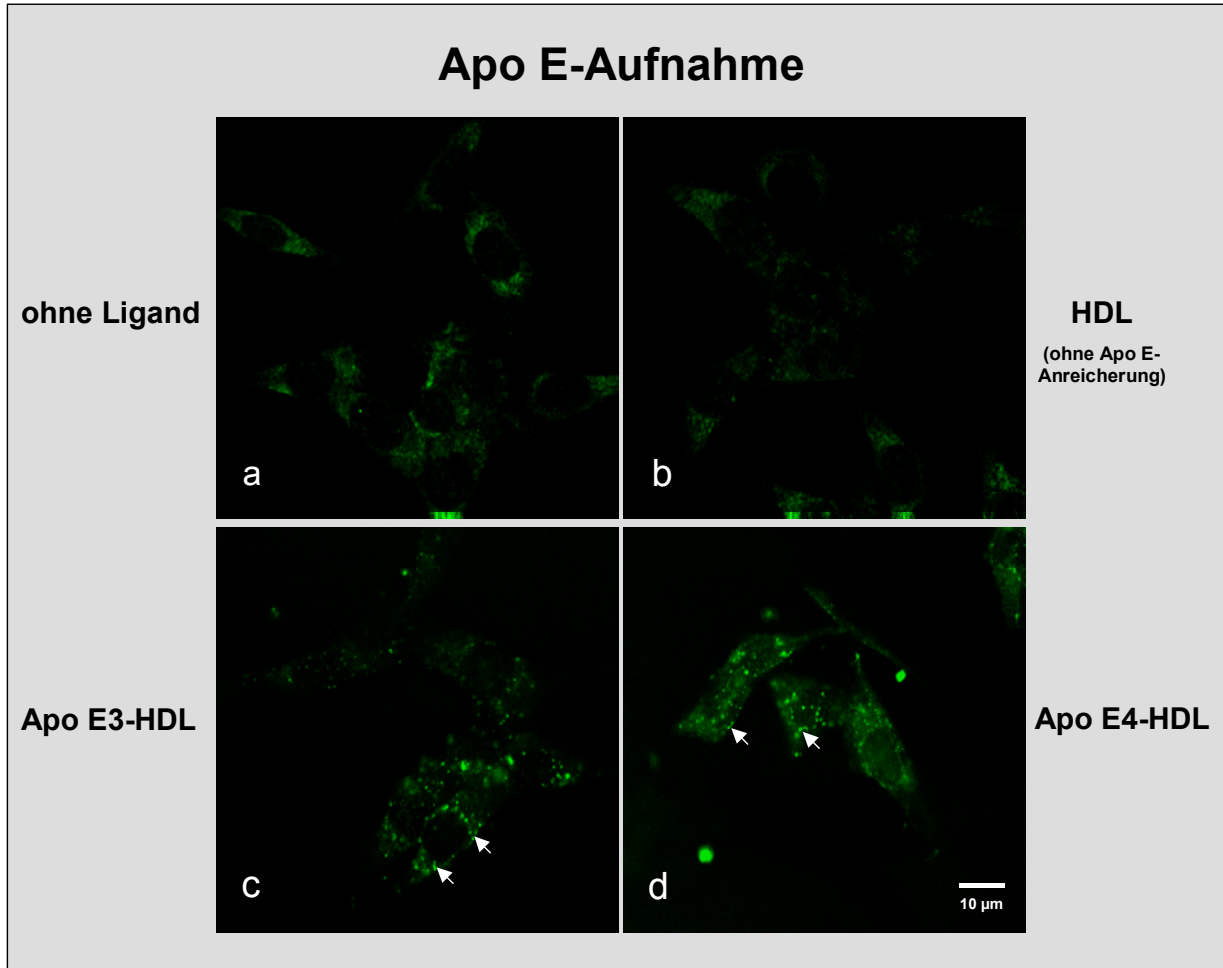


Abb 21. Immunhistochemische Untersuchung der Apo E-Aufnahme.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HT-22 Zellen nach einstündiger Ligandeninkubation: ohne Ligand (a), HDL ohne Apo E-Anreicherung (20 µg/ml HDL-Protein) (b), Apo E3-angereicherte HDL (c) sowie Apo E4-angereicherte HDL (20 µg/ml HDL-Protein sowie 20 µg/ml Apo E) (d). Intrazelluläres Apo E (siehe Pfeilmarkierung) wurde immunhistochemisch nachgewiesen (grün). Größenmaßstab unten rechts. Es ist ein repräsentatives Experiment dargestellt, wobei die einzelnen Bilder unter identischen Bedingungen aufgenommen worden sind.

Sowohl Apo E3 als auch Apo E4 wird von den von den HT-22 Zellen aufgenommen (c und d). Das internalisierte Apo E liegt bei beiden Isoformen vesikulär über das Zytoplasma verteilt vor (Pfeile). Eine semiquantitative Abschätzung zur isoformspezifischen Aufnahme ist nur bedingt möglich. Über die Vielzahl der durchgeführten Experimente war für beide Isoformen eine nahezu identische Aufnahme festzustellen. Für Apo E4 lässt sich allenfalls eine leicht verstärkte Aufnahme konstatieren.

Die schwachen und diffusen perinukleären Signale in a und b stellen wahrscheinlich überwiegend eine Autofluoreszenz der Zellen dar. Eine Detektion endogenen murinen Apo E ist jedoch auch nicht vollkommen ausgeschlossen. Der eingesetzte Primärantikörper erkennt jedoch prädominant humanes Apo E, mit welchem die HDL angereichert wurden.

Die Inkubation mit HDL ohne Apo E-Anreicherung (b) führt jedoch zu einer leichten Reduktion des diffusen perinukleären Signales. Dies könnte evtl. an der Mobilisierung endogenen Apo E durch den Apo E-Akzeptor HDL liegen.

Da mittels der durchgeführten immunhistochemischen Experimenten keine quantitativen Aussagen zur Apo E-Aufnahme möglich waren, erfolgte die Quantifizierung mittels radiochemischer Experimente.

3.3.2. Radiochemische Untersuchung der Apo E3 und Apo E4-Aufnahme und Bindung

Analog zu den immunhistochemischen Experimenten erfolgte die Inkubation der Zellen mit Apo E-angereicherter HDL. Das an die HDL assoziierte Apo E3 und E4 war jedoch direkt mit dem Radioisotop ¹²⁵I markiert, so dass durch Kenntnis der spezifischen Radioaktivität des Liganden und Bestimmung der Radioaktivität in den Zellen eine Quantifizierung der Aufnahme möglich war. Gleichzeitig konnte mit diesem Versuchansatz aber auch die Bindung von Apo E an die Zelloberfläche untersucht werden. Hierfür wurde die Radioaktivität in der Waschlösung nach der Inkubation mit Heparin bestimmt (vergl. Abschnitt 2.5.1.).

Das Ergebnis der radiochemischen Untersuchung zur Apo E-Bindung ist in Abb. 22 dargestellt.

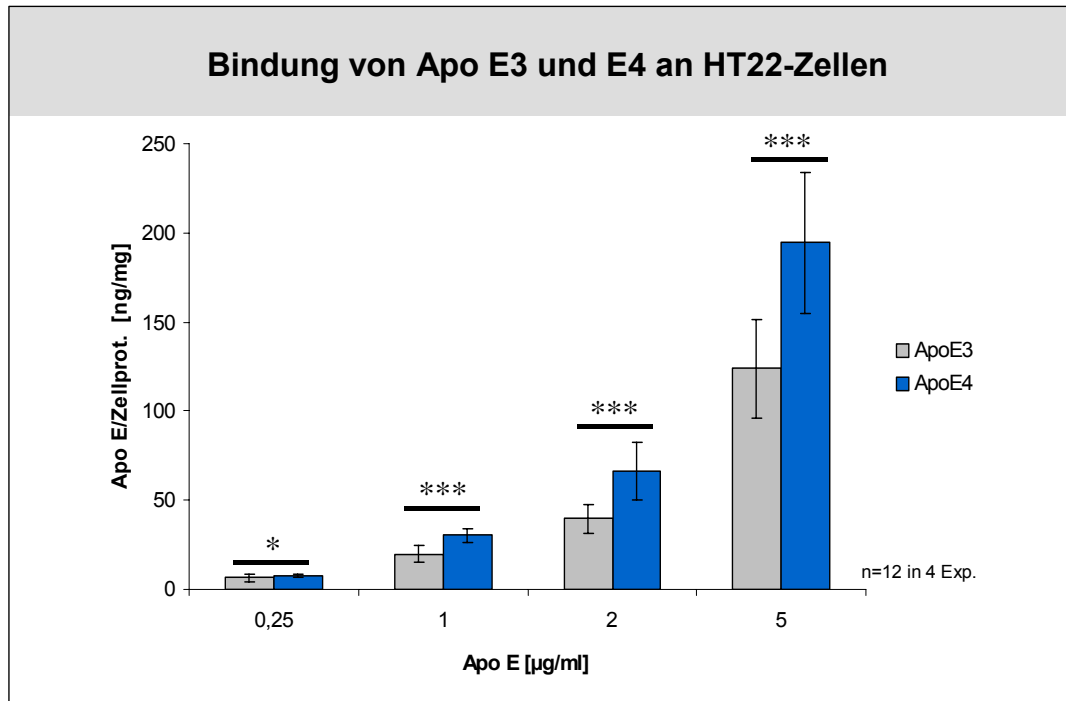


Abb. 22. Bindung von Apo E3 und E4 an HT22-Zellen.

Zelloberflächengebundenen Apo E nach einstündiger Inkubation der Zellen mit unterschiedlich konzentrierten Apo E-HDL-Lösungen (0,25 - 5 µg/ml Apo E). Die Menge des zelloberflächengebundenen Apo E ist ng Apo E pro mg Zellprotein angegeben (Apo E3 in grau, Apo E4 in blau). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung aus vier Experimenten mit Dreifachwerten. Die statistische Signifikanz (p-Wert) ist wie folgt angegeben: * = p< 0,05; ** = p< 0,01; *** = p< 0,001).

Abb. 22 zeigt eine isoformspezifische Bindung von Apo E an die Zelloberfläche der HT-22 Zellen. So ist die Menge von zelloberflächengebundenem Apo E4 signifikant größer als die von Apo E3 (p< 0,001). Dieser Effekt verstärkt sich mit steigender Apo E-Konzentration. Bei der niedrigsten untersuchten Konzentration (0,25 µg/ml) ist der Effekt weniger prominent. Apo E lag hier vermutlich in deutlichem Überschuss zu den vorhandenen Bindungsstellen auf der Zelloberfläche vor, so dass die geringe Apo E-Menge in der Inkubationslösung quantitativ gebunden worden war.

Die beobachteten isoformspezifischen Unterschiede können verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise bindet Apo E4 mit höherer Affinität an die HT22-Zellen als Apo E3. Alternativ ist eine reduzierte Aufnahme von Apo E4 bei identischer Bindungsaffinität möglich.

Die Frage der Apo E-Aufnahme wurde durch die Bestimmung der internalisierten Radioaktivität geklärt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 23 dargestellt.

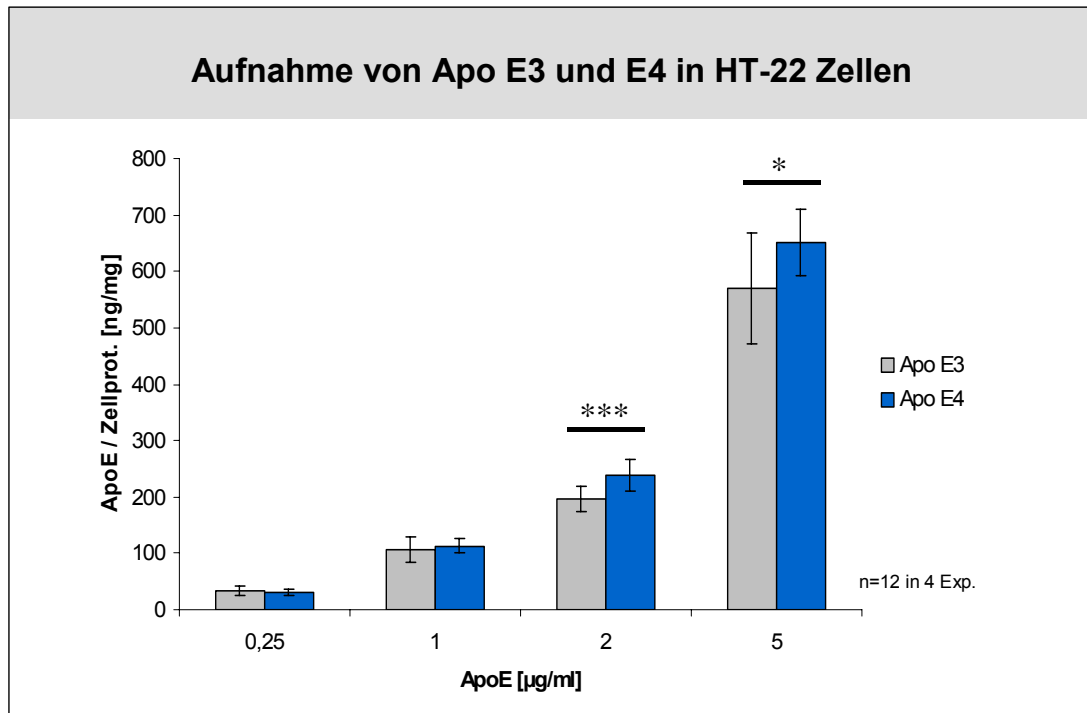


Abb. 23. Aufnahme von Apo E3 und E4 in HT-22-Zellen.

Intrazelluläres Apo E (Radioaktivität im Zell-Lysat) nach einstündiger Inkubation der Zellen mit unterschiedlich konzentrierten Apo E-HDL-Lösungen (0,25 - 5 µg/ml Apo E). Die Menge des internalisierten Apo E ist in ng Apo E pro mg Zellprotein angegeben (Apo E3 in grau, Apo E4 in blau). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung aus vier Experimenten mit Dreifachwerten. Die statistische Signifikanz (p-Wert) ist wie folgt angegeben: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

Im niedrigen Apo E-Konzentrationsbereich (0,25 und 1 µg/ml) sind keine signifikanten Unterschiede zwischen der Aufnahme von Apo E3 und Apo E4 zu beobachten. Im höheren Konzentrationsbereich (2 und 5 µg/ml) wird jedoch signifikant mehr Apo E4 als Apo E3 in die Zellen aufgenommen, wobei die Signifikanz bei einer Konzentration von 5 µg/ml leicht abnimmt. Vermutlich nähert sich die Apo E-Aufnahme hier bereits dem Sättigungsbereich.

Die aus Abb. 22 ersichtliche größere Menge zelloberflächengebundenen Apo E4 resultiert demnach nicht aus einer verringerten Aufnahme von Apo E4.

Die größere Menge intrazellulären Apo E4 kann verschiedene Ursachen haben. Neben einer verstärkten Aufnahme ist auch ein reduziertes Recycling von Apo E4 denkbar, welches zu seiner intrazellulären Akkumulation führen würde. Beide Effekte könnten jedoch auch kumuliert auftreten.

Die Untersuchung des Apo E-Recyclings war daher das nächste Ziel.

3.4. Apo E-Recycling in HT-22 Zellen

Zunächst erfolgte die Untersuchung des Apo E-Recyclings mittels radiochemischer Experimente, welche später durch proteinchemische Untersuchungen ergänzt wurden. Das experimentelle Vorgehen orientierte sich dabei an den Experimenten zur Apo E-Aufnahme und ist detailliert in Abschnitt 2.5.2. erläutert. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 24 dargestellt.

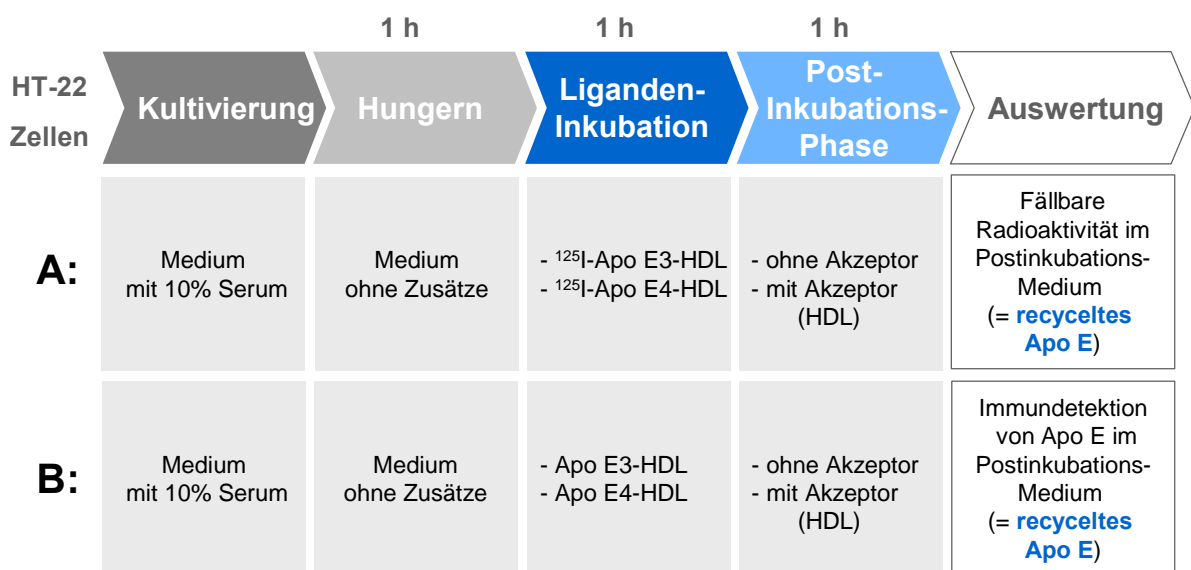


Abb. 24. Schematischer Ablauf der Versuche zur Untersuchung des Apo E-Recyclings.

A: Für die radiochemischen Untersuchungen wurden die Zellen nach einstündiger Hungerphase analog den Experimenten zur Apo E-Aufnahme mit ¹²⁵I-Apo E3 bzw. ¹²⁵I-Apo E4 angereicherter HDL inkubiert (1h). Dieser Ligandeninkubation folgte nach diversen Waschschrinen eine einstündige Postinkubationsphase. Die Menge des recyclten und retroendozytierten Apo E wurde durch die Messung der fällbaren Radioaktivität (intaktes Apo E) im Postinkubationsmedium bestimmt. Durch Zugabe eines Apo E-Akzeptors (HDL) zur einen Hälfte der Ansätze sollte das Apo E-Recycling in der Postinkubationsphase stimuliert werden. B: Mit einem identischen Versuchsablauf erfolgte die Untersuchung des Apo E-Recyclings mittels proteinchemischer Methoden. Die Zellen wurden hierfür jedoch mit nicht-radioaktiven Liganden inkubiert (Apo E3 und E4 angereicherte Apo E-freie HDL). Das recyclte Apo E im Postinkubationsmedium wurde mittels Immunoblot bzw. Apo E-ELISA detektiert.

3.4.1. Radiochemische Untersuchung des Apo E-Recyclings

Das Ergebnis der radiochemischen Experimente ist in Abb. 25 dargestellt.

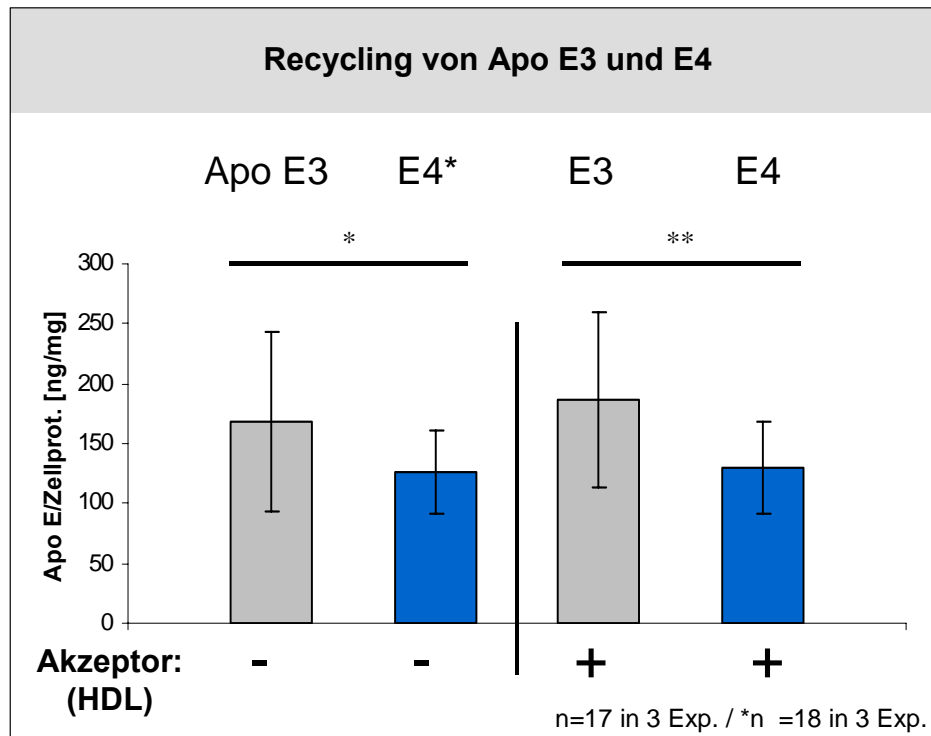


Abb. 25. Recycling von Apo E3 und E4 in HT-22-Zellen (radiochemische Untersuchung).

Recyceltes Apo E im Postinkubationsmedium nach vorheriger einstündiger Inkubation der Zellen mit ¹²⁵I-Apo E3- bzw. und Apo E4-HDL-Lösungen (5 µg/ml Apo E an 10 µg/ml HDL-Protein). Während der einstündigen Postinkubationsphase wurde mit und ohne Akzeptor (25 µg/ml Gesamt-HDL) inkubiert. Die Menge des recycelten Apo E ist in ng Apo E pro mg Zellprotein angegeben (Apo E3 in grau, Apo E4 in blau). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung aus drei Experimenten mit Sechsfachwerten (bei drei Messreihen wurde je ein Ausreißerwert (Messwert < Mittelwert - 2xStandardabweichung bzw. Messwert > 2x Standardabweichung + Mittelwert) eliminiert; daher ist hier n=17). Die statistische Signifikanz (p-Wert) ist wie folgt angegeben: * = p< 0,05; ** = p< 0,01; *** = p< 0,001).

Die Auswertung der Untersuchungen zeigt ein für Apo E4 im Vergleich zu Apo E3 reduziertes Recycling. Durch Zugabe eines Apo E-Akzeptors (HDL) während der Postinkubationsphase konnte zwar die statistische Signifikanz dieses Unterschiedes erhöht werden, die erwartete deutliche Stimulation des Apo E-Recyclings war jedoch nicht zu beobachten. Allenfalls für Apo E3 ließ sich eine geringfügige Induktion des Recyclings konstatieren. Für Apo E4 war dagegen kein Akzeptor-Effekt zu beobachten.

Die durchgeführten radiochemischen Untersuchungen unterliegen jedoch methodisch begründeten Limitierungen. Wie bereits erwähnt, wird zur Bestimmung des recycelten ¹²⁵I-markierten Apo E3 und E4 intaktes Protein im Postinkubationsmedium gefällt und dessen Radioaktivität bestimmt. Degradiertes Protein sowie das Abbauprodukt ¹²⁵I-Tyrosin bleiben dagegen in Lösung. Dabei ist es jedoch möglich, dass die Abbauprodukte nicht quantitativ von dem intakten Protein getrennt werden und/oder nicht das gesamte intakte Protein gefällt wird.

Um diese methodischen Unsicherheiten auszuschließen, wurde die radiochemische Untersuchung des Apo E-Recyclings durch proteinchemische Experimente ergänzt.

3.4.2. Proteinchemische Untersuchung des Apo E-Recyclings

Die Experimente erfolgten analog zu den radiochemischen Untersuchungen, wobei jedoch nicht-radioaktive Liganden eingesetzt wurden (siehe Abschnitt 2.5.2. sowie Abb. 24). Als Akzeptor diente Apo E-freie HDL, deren Gegenwart im Postinkubationsmedium nicht die spätere Immundetektion von Apo E störte. Großer Vorteil dieser Untersuchungen ist die Auswertung mittels immunologischer Verfahren, weil es auf diese Weise möglich ist, das recycelte intakte Apo E spezifisch nachzuweisen.

Die Immundetektion erfolgte mittels zweier Verfahren. Zunächst wurde recyceltes Apo E nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Postinkubationsmedien im Immunoblot nachgewiesen. Parallel dazu erfolgte die Quantifizierung des recycelten Apo E in den Postinkubationsmedien mittels Apo E-ELISA.

Das Ergebnis der Auswertung im Immunoblot ist in Abb. 26 dargestellt.

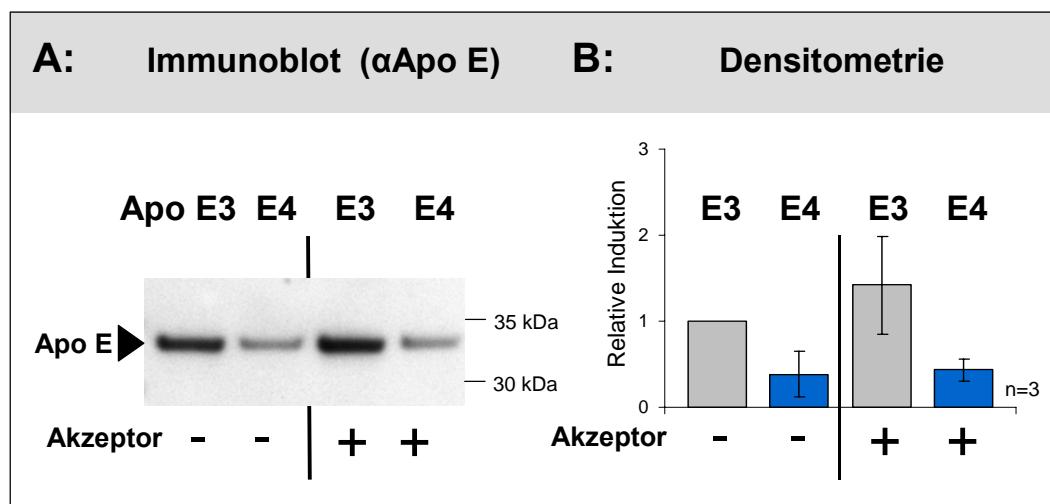


Abb. 26. Recycling von Apo E3 und E4 in HT-22-Zellen (Immunoblot).

A: Immunoblot gegen Apo E. Nach einer einstündigen Ligandeninkubation der Zellen mit Apo E3- bzw. Apo E4-HDL (10 µg/ml Apo E an 10 µg/ml HDL-Protein) erfolgte eine ebenfalls einstündige Postinkubationsphase, bei welcher mit und ohne Apo E-Akzeptor (10 µg/ml Apo E-freie HDL) inkubiert wurde. Die Postinkubationsmedien wurden abgenommen und gleiche Volumina der gelelektrophoretischen Auftrennung unterzogen. Nach anschließendem Elektrobplot-Transfer der aufgetrennten Proteine erfolgte die Immundetektion von Apo E. Es ist ein repräsentativer Blot gezeigt (insgesamt wurden drei unabhängige Experimente mit Dreifachwerten durchgeführt). Apo E sowie der Molekulargewichtsmarker sind gekennzeichnet. B: Densitometrische Auswertung (vergl. Abschnitt 2.4.3.) der durchgeführten Immunoblots. Dargestellt ist die relative Induktion des Apo E-Recyclings. Die Intensität des Signals für das recycelte Apo E3 ohne Akzeptor im Postinkubationsmedium ist dabei jeweils gleich 1 gesetzt. Es sind die Mittelwerte der Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung angegeben.

Die Auswertung des Immunoblots (Abb. 26A) bestätigte das Ergebnis der radiochemischen Experimente: Apo E4 wurde in deutlich geringerem Umfang recycelt als Apo E3. Gleichzeitig war der stimulatorische Effekt des Akzeptors auf das Apo E3-Recycling deutlicher zu beobachten. Für Apo E4 schien dieser Effekt hingegen marginal zu sein. Die densitometrische Auswertung der Immunoblots (Abb. 26B) verifiziert den visuellen Eindruck. Das Recycling von Apo E4 schien um den Faktor zwei geringer zu sein als für Apo E3. In Anwesenheit eines Akzeptors vergrößerte sich dieser Unterschied noch.

Da die densitometrische Auswertung der Immunoblots eine semiquantitative Methode darstellt, wurde der Apo E-Gehalt der Postinkubationsmedien noch mit einem Apo E-ELISA bestimmt (Abschnitt 2.3.5.). Das Ergebnis ist in Abb. 27 dargestellt.

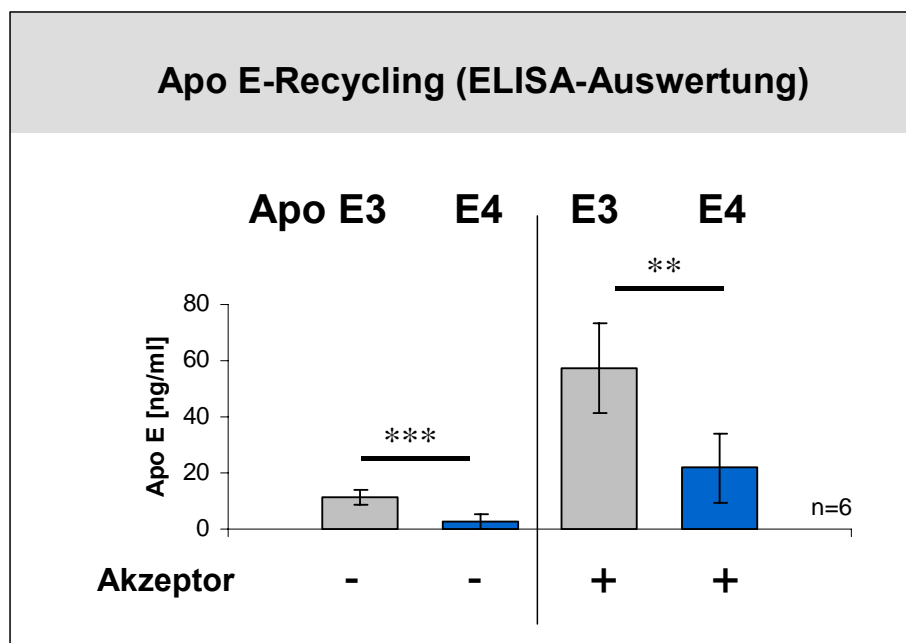


Abb. 27. Recycling von Apo E3 und E4 in HT-22-Zellen (Apo E-ELISA).

Apo E-Gehalt der Postinkubationsmedien in ng/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten mit je Dreifachwerten (n=6). Die statistische Signifikanz (p-Wert) ist wie folgt angegeben: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

Die Apo E-ELISA Auswertung stellt die sensitivste Methode zur spezifischen Bestimmung der Apo E-Konzentration in den Postinkubationsmedien dar. Sie bestätigt das Ergebnis der vorangegangenen Untersuchungen. Apo E4 wurde in den HT-22-Zellen signifikant schlechter recycelt als Apo E3. Das Recycling von Apo E3 erfuhr in Anwesenheit des Akzeptors eine deutliche Stimulation. Für Apo E4 war dieser Effekt ebenfalls zu beobachten.

Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen zum Apo E-Recycling divergierten zwar methodisch begründet in der Ausprägung der isoformspezifischen Unterschiede, unter

identischen Inkubationsbedingungen war jedoch stets das Recycling von Apo E4 im Vergleich zu Apo E3 reduziert.

Nachdem die Frage des isoformspezifischen Apo E-Recycling geklärt worden war, galt es zu eruieren, ob es bei den neuronalen Zellen ebenfalls zu einem recyclingassoziierten Cholesterol-Efflux kommen würde, wie es für nicht-neuronale Zellen bereits beschrieben wurde.

Es schlossen sich daher zellbiologische Untersuchungen zum Cholesterol-Efflux aus HT-22 Zellen an.

3.5. Cholesterol-Efflux aus HT-22 Zellen

Das experimentelle Vorgehen orientierte sich an den radiochemischen Untersuchungen zum Apo E-Recycling und ist detailliert in Abschnitt 2.5.3 beschrieben. Die Zellen wurden mit ³H-Cholesterol markiert und anschließend den verschiedenen Inkubationen unterzogen. Zunächst erfolgten Experimente mit HDL-assoziiertem Apo E, welche schließlich durch Experimente mit Liposomen-assoziiertem Apo E ergänzt wurden. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 28 dargestellt.

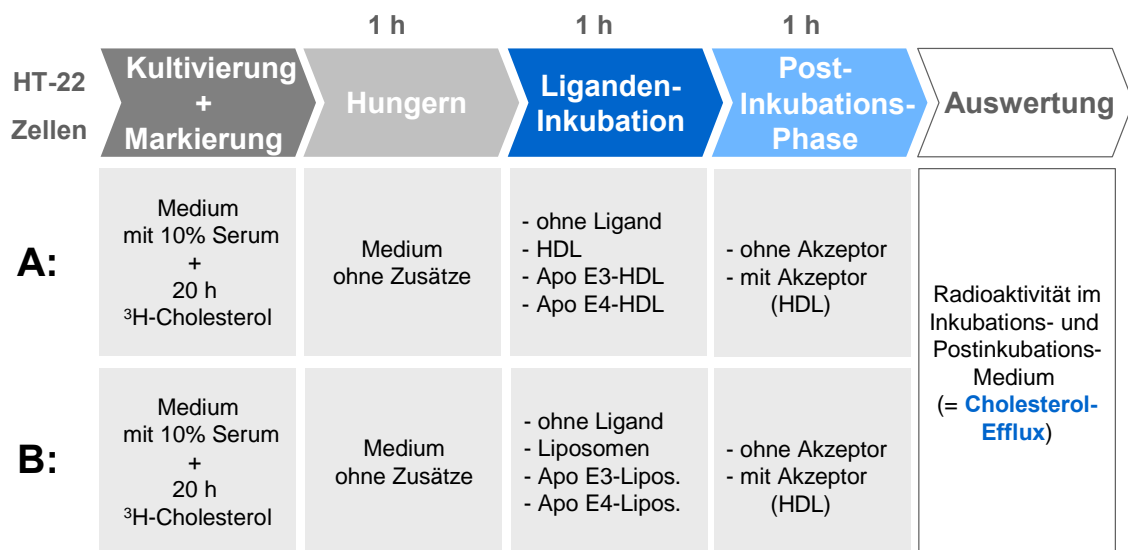


Abb. 28. Schematischer Ablauf der Experimente zum Cholesterol-Efflux.

A: Für die Experimente mit HDL-assoziiertem Apo E wurden die Zellen vor Versuchsbeginn mit ³H-Cholesterol (20 h) markiert. Nach anschließender einstündiger Hungerphase erfolgte die Inkubation mit den Liganden (Apo E3- und E4-HDL). Zur Kontrolle wurde ohne Ligand sowie mit Apo E-freier HDL inkubiert. Nach diversen Waschschritten schloss sich eine einstündige Postinkubationsphase mit und ohne Akzeptor (Apo E-freie HDL) an. Der Cholesterol-Efflux wurde über die Bestimmung der Radioaktivität im Ligandeninkubationsmedium und Postinkubationsmedium ermittelt. B: Die Versuche mit Liposomen-assoziiertem Apo E wurden analog durchgeführt.

3.5.1. Radiochemische Untersuchung zum Cholesterol-Efflux mit HDL-assoziiertem Apo E

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 29 dargestellt.

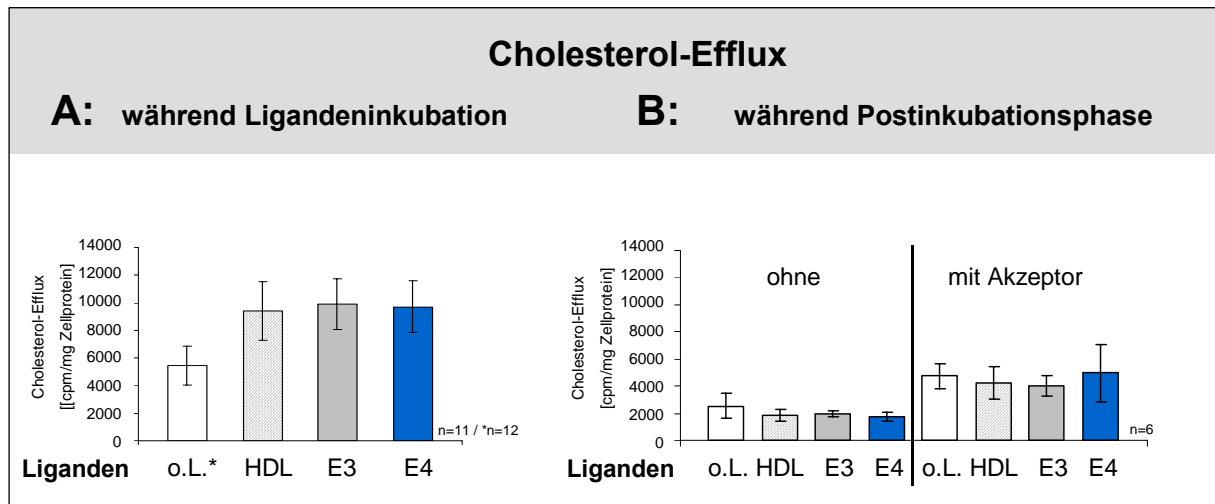


Abb. 29. Cholesterol-Efflux während und nach Inkubation mit HDL-assoziiertem Apo E.

A: Cholesterol-Efflux während der einstündigen Ligandeninkubationsphase. Während dieser Phase wurde mit Apo E3- und E4-HDL (10 µg/ml Apo E an 10 µg/ml Apo E-freie HDL) inkubiert (E3, E4). Zur Kontrolle erfolgte auch die Inkubation ohne Ligand (o.L.) sowie mit Apo E-freier HDL (10 µg/ml HDL-Protein) ohne Apo E-Anreicherung (HDL). B: Cholesterol Efflux während der einstündigen Postinkubationsphase. Während dieser Phase wurde mit und ohne Akzeptor inkubiert (10 µg/ml Apo E-freie HDL). Angegeben ist gemessene Radioaktivität im Medium pro mg Zellprotein. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten mit je Sechsfach- (28A) bzw. Dreifachwerten (28B). Ausreißerwerte wurden eliminiert.

Aus Abb. 29A wird deutlich, dass es bereits während der Inkubation mit den Liganden zu einem Cholesterol-Efflux gekommen war. So stand dem basalen Efflux bei der Kontrolle ohne Ligand (o.L.) ein nahezu doppelt so starker Efflux bei den Inkubationen mit den verschiedenen Liganden gegenüber. Dieser stimulierende Effekt schien dabei weitgehend unabhängig von der Apo E-Anreicherung der HDL zu sein. So war kein signifikanter Unterschied zwischen der Inkubation mit Apo E-freier HDL (HDL) und den mit Apo E angereicherten HDL (E3, E4) zu beobachten. Allenfalls die Apo E3-haltige HDL (E3) zeigte einen marginalen Anstieg des Cholesterol-Effluxes. Diese Apo E unabhängige Stimulation war jedoch nicht verwunderlich, war doch die eingesetzte HDL bekanntermaßen ein Cholesterol-Akzeptor. (vergleiche Abschnitt 1.2.).

Nach Entfernung der Liganden folgte die Postinkubationsphase, bei welcher der mögliche Apo E-Recycling assoziierte Cholesterol-Efflux untersucht werden sollte. Abb. 29B zeigt das Ergebnis der Messungen. Deutlich war auch hier der stimulatorische Effekt der Apo E-freien HDL zu beobachten, welche als Akzeptor eingesetzt worden war. Insgesamt war der

Cholesterol-Efflux aber gegenüber der Ligandeninkubationsphase stark vermindert. Dies liegt vor allem daran, dass der Großteil des möglichen Effluxes an intrazellulärem ³H-Cholesterol bereits während der Ligandeninkubation erfolgt ist. Ein Indiz hierfür ist auch die Tatsache, dass die Zellen mit einem geringen Efflux in der Ligandeninkubationsphase (z.B. o.L.) in der Postinkubationsphase einen vergleichsweise starken Efflux zeigen, weil sie noch über mehr intrazelluläres ³H-Cholesterol verfügen. Desweiteren kann es sowohl während der Liganden- als auch der Postinkubationsphase zur Wiederaufnahme des ausgeschleusten Cholesterols kommen, so dass auch auf diese Weise eine Beeinflussung des Messergebnisses möglich ist.

Während der Postinkubationsphase waren keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Cholesterol-Efflux aus Zellen, die in der Ligandeninkubationsphase mit Apo E-freier HDL oder mit Apo E3- bzw. Apo E4-angreicherter HDL präinkubiert wurden, zu beobachten.

Das nachgewiesenermaßen während der Postinkubationsphase stattfindende Apo E-Recycling war unter den gewählten Bedingungen also nicht mit einer messbaren Zunahme des Cholesterol-Efflux assoziiert. Eine Kaschierung durch HDL- und/oder Wiederaufnahme-Effekte ist jedoch nicht ausgeschlossen.

Um eine relative Abschätzung des beobachteten Cholesterol-Effluxes vornehmen zu können, wurden die Messwerte aus Abb. 29 in Relation zum intrazellulär verbliebenen Cholesterol gesetzt. Das Ergebnis ist in Abb. 30 dargestellt.

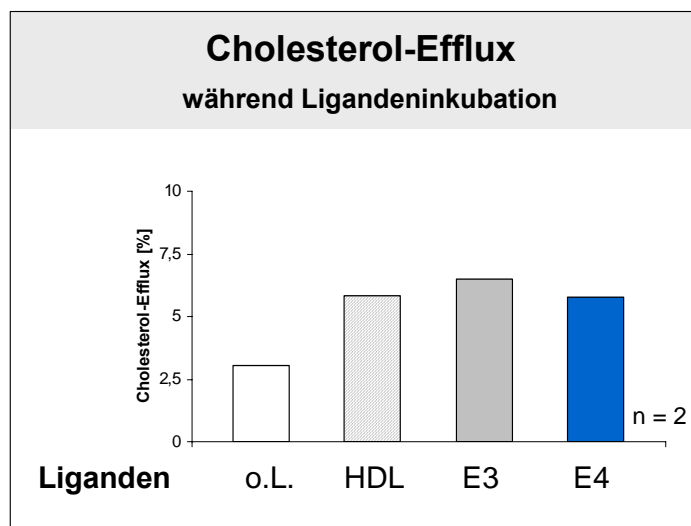


Abb. 30. Relativer Cholesterol-Efflux während der Ligandeninkubationsphase.

Dargestellt ist der Cholesterol-Efflux während der einstündigen Ligandeninkubationsphase in % des Gesamtcholesterols (Gesamtcholesterol = Efflux Ligandeninkubationsphase + Efflux-Postinkubationsphase (mit Akzeptor) + intrazellulär verbliebenes Cholesterol). Gezeigt sind die Mittelwerte aus den relativen Bezügen zweier unabhängiger Experimente (da in diesem Fall n = 2 ist, kann keine Standardabweichung angegeben werden).

Aus Abbildung 30 wird deutlich, dass die Zellen im Verlauf der Experimente nur einen sehr geringen Teil des markierten Cholesterols verloren. Der basale Cholesterol-Efflux während

der Ligandeninkubationsphase (o.L.) betrug lediglich 3% des Gesamtcholesterols. In Gegenwart der Liganden (Apo E-feie HDL, Apo E3-HDL und Apo E4-HDL) verdoppelte sich der Efflux auf Werte um 6%, wobei die Apo E3-HDL bei der Mobilisierung des Cholesterols am effektivsten waren. In Analogie zu Abb. 29A ist aber auch hier kein signifikanter Apo E-Effekt zu beobachten. Betrachtet man den Gesamtefflux (Efflux während der Liganden- + Efflux während der Postinkubationsphase (mit Akzeptor)), so liegt dieser basal (o.L.) bei 5,6 % und steigt bei der Inkubation mit den Liganden auf 8,3 – 9%, wobei auch hier der Gesamtefflux bei Apo E3-HDL Inkubation am größten ist (9%) (Daten nicht dargestellt). Wegen des geringen Gesamteffluxes und des dominanten HDL-Effektes konnte aus diesen Untersuchungen keine abschließende Aussage zum Apo E-Recycling assoziierten Cholesterol-Effluxes gemacht werden.

Um diese Frage dennoch klären zu können, war die HDL aus dem experimentellen System zu entfernen. Dies geschah durch den Einsatz von Liposomen, die in ihrer Lipidzusammensetzung weitgehend den HDL entsprachen und an die die Apo E-Isoformen assoziiert werden konnten.

3.5.2. Radiochemische Untersuchung zum Cholesterol-Efflux mit Liposomen-assoziiertem Apo E

Großer Vorteil der Liposomen ist die Abwesenheit anderer Apolipoproteine. Insbesondere das Fehlen des HDL-Hauptapolipoproteins Apo AI, welches solitär schon ein guter Cholesterol-Akzeptor ist, gab zu der Hoffnung Anlass, dass potentielle Apo E-Effekte besser zu beobachten sein würden. Nachteil der Liposomen ist ihr artifizieller Charakter. Sie stellen physikochemisch zwar Lipid-Micellen dar, sind aber keine Lipoproteine im engeren Sinne.

Das experimentelle Vorgehen erfolgte analog zu den in Abschnitt 3.5.1. beschriebenen Experimenten und ist in Abb. 28B schematisch dargestellt.

Das Ergebnis der Untersuchungen mit Liposomen-assoziiertem Apo E ist in Abb. 31 dokumentiert.

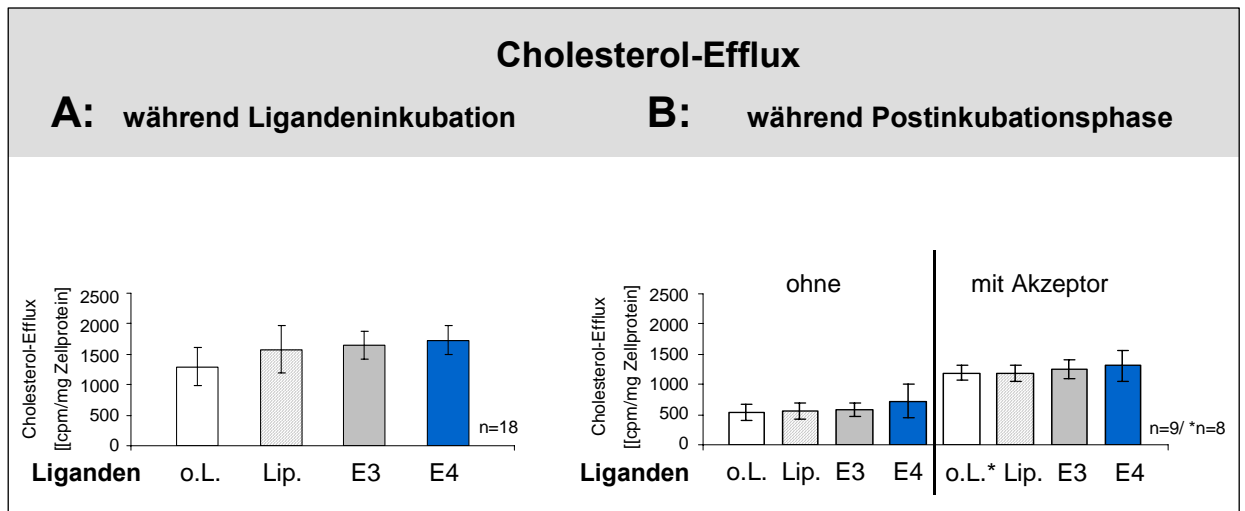


Abb. 31. Cholesterol-Efflux während und nach Inkubation mit Liposomen-assoziiertem Apo E.
 A: Cholesterol-Efflux während der einstündigen Ligandeninkubationsphase. Während dieser Phase wurde mit Apo E3- und E4-Liposomen (10 µg/ml Apo E an 19 µg/ml Lipid) inkubiert (E3, E4). Zur Kontrolle erfolgte auch die Inkubation ohne Ligand (o.L.) sowie mit Liposomen (19 µg/ml Lipid) ohne Apo E-Anreicherung (Lip.). B: Cholesterol Efflux während der einstündigen Postinkubationsphase. Während dieser Phase wurde mit und ohne Akzeptor inkubiert (10 µg/ml Apo E-freie HDL). Angegeben ist gemessene Radioaktivität im Medium pro mg Zellprotein. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit je Sechsfach- (30A) bzw. Dreifachwerten (30B). Ausreißerwerte wurden eliminiert.

Abb. 31A zeigt einen nahezu einheitlichen Cholesterol-Efflux für alle Ligandeninkubationslösungen (Lip., E3, E4). Im Gegensatz zu den Experimenten mit den HDL-Liganden (Abb. 29A) war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen dem basalen Efflux (o.L.) und der Kontrolle mit den Liposomen ohne Apo E-Anreicherung erkennbar (Lip.). Beim Einsatz der Liposomen blieb der „HDL-Effekt“ also aus, und sie stimulierten den Cholesterol-Efflux nicht solitär. Leider war gleichzeitig auch keine signifikante Stimulation des Cholesterol-Efflux in Gegenwart von Apo E3- und E4-Liposomen zu beobachten.

Dieser „Apo-E Effekt“ blieb auch während der anschließenden Postinkubationsphase (Abb. 31B) aus. Die Stimulation des Cholesterol-Efflux durch den Akzeptor (Apo E-freie HDL) erfolgte hingegen erwartungsgemäß; dies jedoch in keiner Weise signifikant differentiell.

Die relative Auswertung des Efflux während der Ligandeninkubationsphase (Daten nicht dargestellt) ergibt einen insgesamt geringeren Cholesterol Efflux im Vergleich zu den HDL-Experimenten (Abb. 30). So liegt der Efflux bei der Inkubation mit den Liposomen ohne Apo E-Anreicherung bei 2,1 % und erfährt durch die Anreicherung der Liposomen mit Apo E3 (2,4 %) und Apo E4 (2,5%) keine signifikante Steigerung. Der basale Efflux (o.L.) liegt bei 2% und ist damit etwas niedriger als beim HDL-Experiment (Abb. 30).

Mit den Liposomen-Experimenten konnte zwar erfolgreich der HDL-Effekt auf den Cholesterolefflux eliminiert werden, eine signifikante Stimulation des Cholesterolefflux durch die direkte Inkubation mit dem Liposomen-assoziierten Apo E3 und E4 konnte jedoch nicht gezeigt werden. Auch ein Apo E-Recycling assoziierter Cholesterolefflux war nicht zu beobachten.

Möglicherweise sind die präparierten Liposomen kein geeignetes Vehikel für das assoziierte Apo E. Eine falsche Orientierung des Proteins auf dem Partikel könnte beispielsweise die Apo E-Aufnahme inhibieren, wodurch auch kein Recycling möglich wäre.

Fasst man die Ergebnisse der Untersuchungen zum intrazellulären Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen zusammen, so lassen sich folgende Aussagen machen:

- Apo E4 bindet mit signifikant höherer Affinität an die Zelloberfläche der HT22-Zellen als Apo E3.
- Aufgenommenes Apo E4 wird signifikant schlechter recycelt als Apo E3, wobei seine Aufnahme möglicherweise verstärkt ist. Das Recycling von Apo E3 lässt sich gleichzeitig in Gegenwart von Apo E-freien HDL stimulieren.
- Ein Apo E-Recycling assoziierter Cholesterolefflux ist mit den gewählten experimentellen Systemen nicht nachweisbar. Gleichzeitig ist aber ein Efflux von Cholesterolefflux aus den neuronalen Zellen in Gegenwart von Apo AI sowie Apo AI und Apo E-haltigen Lipoproteinen zu beobachten.

3.6. Einfluss der Apo E-Isoform auf die APP-Prozessierung in HT-22 Zellen

Neben der Untersuchung des intrazellulären Lipidstoffwechsels (Abschnitte 3.4. - 3.5.) war im Rahmen dieser Arbeit auch die Frage zu untersuchen, ob die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) durch die Anwesenheit der verschiedenen Apo E-Isoformen, Apo E3 und E4, beeinflusst wird. In einem ersten Schritt wurde daher geprüft, ob die HT-22 Zellen über endogenes APP verfügen und dies in entsprechender Weise prozessiert wird. Im Anschluss erfolgte eine pharmazeutische Manipulation des intrazellulären Cholesterolspiegels, um die Cholesterolsensitivität der Prozessierung zu untersuchen. Abschließend wurde mit Apo E3- und Apo E4-HDL inkubiert, um den Einfluss der Apo E-Isoformen auf die Prozessierung zu untersuchen. Das experimentelle Vorgehen ist explizit in Abschnitt 2.6. dargestellt. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abb. 32 zusammengefasst.

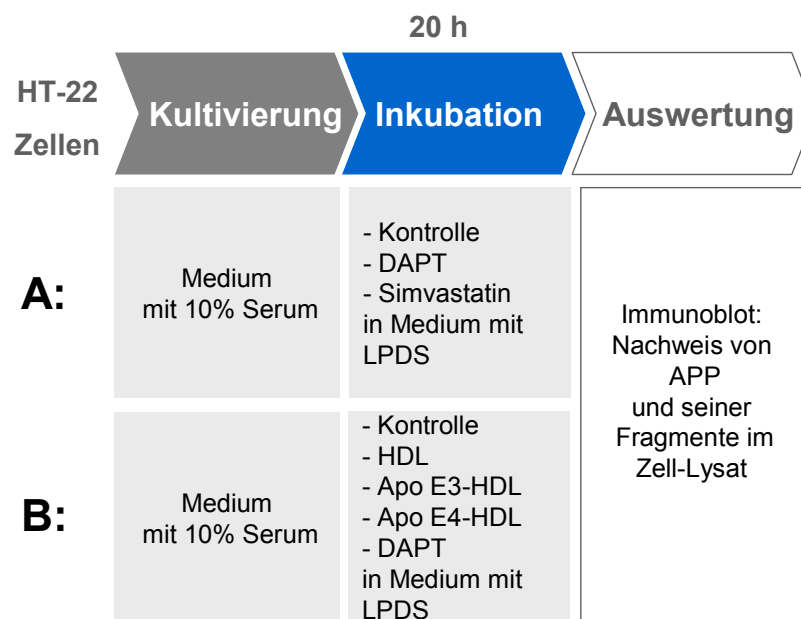


Abb. 32: Schematischer Ablauf der Versuche zur Untersuchung der APP-Prozessierung in HT-22-Zellen.

A: Für die Untersuchung zur Cholesterolsensitivität der APP-Prozessierung in HT-22 Zellen erfolgte die zwanzigstündige Inkubation mit dem Cholesterolsenker Simvastatin (HMG-CoA-Reduktase Hemmer). Zur Kontrolle wurde ohne weitere Zusätze sowie mit dem spezifischen Gamma-Sekretase Inhibitor (DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester)) inkubiert. Als Inkubationsmedium diente ein Medium welches mit Lipoprotein-defizientem Serum versetzt war (LPDS). B: Zur Untersuchung des Einflusses von Apo E3 und Apo E4 auf die APP-Prozessierung wurde neben den Kontrollen (ohne Zusätze; DAPT) mit Apo E3- und Apo E4-HDL inkubiert (20 h). Die Auswertung der Experimente erfolgte durch den Nachweis von APP und seinem Abbauprodukt mittels Immunoblot.

3.6.1. APP-Prozessierung in HT-22 Zellen

Zunächst wurde die APP-Expression und Prozessierung in HT-22 Zellen untersucht. Das experimentelle Vorgehen ist in Abb. 32A skizziert. Abweichend von den Untersuchungen zur Cholesterolsensitivität der APP-Prozessierung wurde jedoch zunächst keine Statin-Inkubation durchgeführt. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abb. 33 dargestellt.

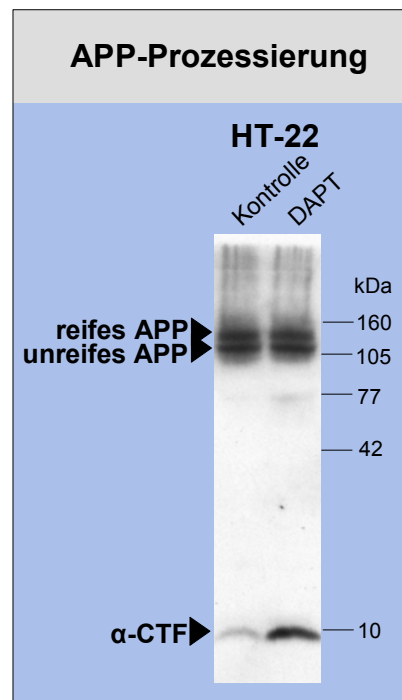


Abb. 33: APP-Expression und Prozessierung in HT-22-Zellen.

Immunoblot gegen APP (C-Terminus) nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Gradientengel) von Gesamtzellproteinpräparationen (je Spur 100 µg Protein geladen). Die Zellen wurden vor der Präparation des Gesamtzellproteins für 20 h mit und ohne DAPT (0,5 µM) inkubiert. APP und sein Abbauprodukt sowie der Molekulargewichtsmarker sind gekennzeichnet (APP = Amyloid-Vorläuferprotein; α-CTF = C-terminales APP-Fragment nach α-Sekretase-Prozessierung).

Abbildung 33 zeigt das erwartete Ergebnis. Die HT-22 Zellen exprimierten APP und prozessierten es erwartungsgemäß. Deutlich war die Doppelbande für das reife (glykosylierte) und unreife APP zu erkennen. Das reife APP hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 130 kDa, wohingegen das unreife APP bei ca. 110 kDa migrierte. Dies entspricht den Literaturangaben.

Da die HT-22 Zellen murinen Ursprungs sind, handelt es sich bei dem endogenen APP auch um das murine Protein. Im Gegensatz zum humanen Homolog, wird es nicht durch die β-Sekretase prozessiert, sondern ist lediglich ein Substrat für die α-Sekretase. Ursache ist eine abweichende Aminosäuresequenz im Bereich der β-Sekretase-Schnittstelle. Die α-Sekretase generiert bei der proteolytischen Spaltung von APP ein lösliches N-terminales Fragment (sAPP) sowie ein ca. 9 kDa großes C-terminales Fragment (α-CTF), welches als Substrat

für die γ -Sekretase fungiert. Dessen proteolytische Spaltung resultiert in der Freisetzung eines kleinen cytoplasmatischen Fragmentes, der AICD (APP-Intrazellulärdomäne), sowie eines kleinen N-terminalen Fragmentes, dem p3 (Vergl. auch Abschnitt 1.6.). Beide Fragmente werden jedoch rasch degradiert und sind daher schwer detektierbar.

Die spezifische Hemmung der γ -Sekretase durch DAPT führte erwartungsgemäß zu der beobachteten Anreicherung des α -CTF. Gleichzeitig blieb die Menge an reifem und unreifem APP unverändert, weil der α -Sekretase-Schnitt weiterhin ungehindert erfolgen konnte. Die löslichen Fragmente α APP und p3 enthalten nicht den C-Terminus des Proteins, gegen den der verwendete Antikörper gerichtet ist, so dass sie mit diesem nicht detektiert werden können.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die HT-22-Zellen endogenes APP exprimieren und prozessieren. Außerdem lässt sich die γ -Sekretase spezifisch durch DAPT hemmen. Weiterhin lässt die Menge des detektierbaren α -CTF bei unveränderter Menge von reifem und unreifem APP direkte Rückschlüsse auf die Aktivität der γ -Sekretase zu.

In einem nächsten Schritt konnte mit den Versuchen zur Cholesterolsensitivität der APP-Prozessierung begonnen werden.

3.6.2. Cholesterol und APP-Prozessierung in HT-22 Zellen

Die APP-Prozessierung erfolgt den Literaturangaben zur Folge cholesterolsensitiv (vergl. Abschnitt 1.6.). Während die Aktivität der β - und γ -Sekretase durch einen erhöhten intrazellulären Cholesterolspiegel zunimmt, wird die Aktivität der α -Sekretase gehemmt (Bodovitz and Klein, 1996). Ein erhöhter intrazellulärer Cholesterolspiegel stimuliert daher die amyloidogene Prozessierung von humanem APP, die in der Bildung des Alzheimer-Peptids A β resultiert.

Im murinen System ist nur eine nicht-amyloidogene Prozessierung des endogenen APP möglich, so dass ein erhöhter intrazellulärer Cholesterolspiegel in einer verringerten Prozessierung resultieren sollte. Eine Verringerung des intrazellulären Cholesterols sollte daher den gegenteiligen Effekt haben, und die Prozessierung stimulieren.

Durch Hemmung der endogenen Cholesterolsynthese mittels eines Statins (Simvastatin), war zu überprüfen, ob die HT-22-Zellen sich entsprechend dieser theoretischen Annahmen verhalten. Das Ergebnis der Untersuchungen ist in Abbildung 34 dargestellt.

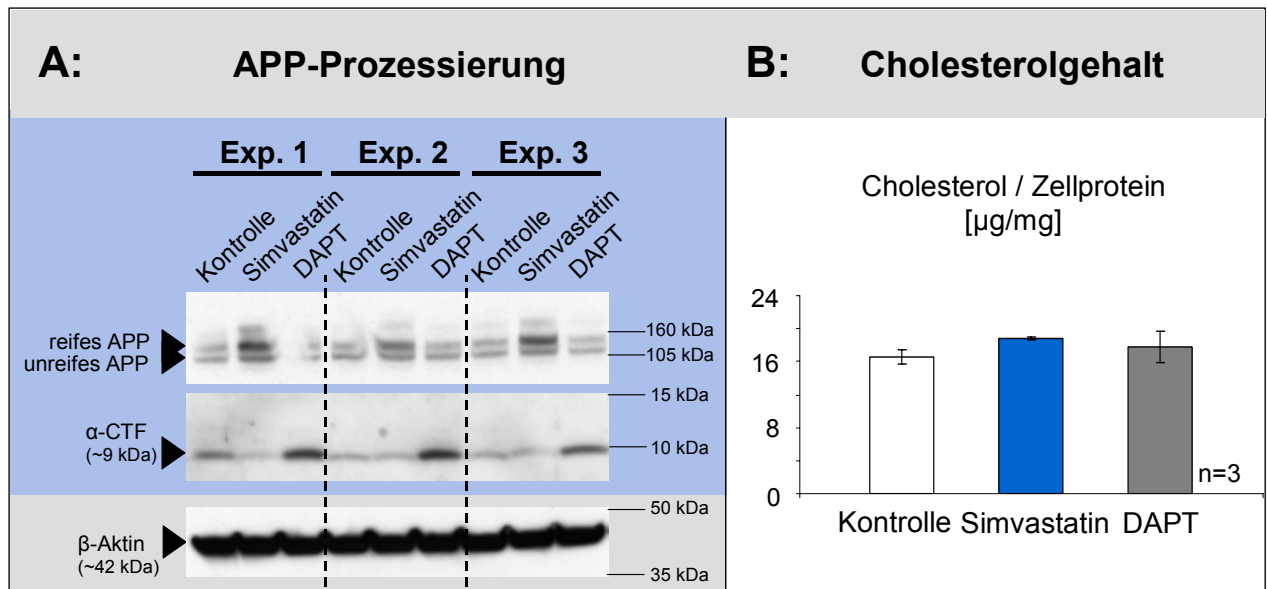


Abb. 34: Cholesterolsensitivität der APP-Prozessierung in HT-22 Zellen.

A: Immunoblot gegen APP (C-Terminus) nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Gesamtzellproteinpräparationen (je Spur 30 µg Protein geladen). Die Zellen wurden vor der Präparation des Gesamtzellproteins für 20 h ohne Zusätze, mit DAPT (1 µM) sowie mit Statin (10 µM) in Medium mit 10% LPDS inkubiert. Als Beladungskontrolle wurde β-Aktin detektiert. APP, das C-terminale Fragment sowie die Aktinkontrolle und der Molekulargewichtsmarker sind gekennzeichnet. Dargestellt sind drei unabhängige Experimente (Experiment 1-3). B: Cholesterolgehalt in den lysierten Zellen in µg Cholesterol pro mg Zellprotein. Angegeben sind die Mittelwerte aus den drei gezeigten Experimenten ± Standardabweichung.

Aus Abb. 34A wird deutlich, dass sich die Kontrollproben und die DAPT-behandelten Zellen analog zu dem in Abb. 33 dargestellten Experiment verhielten. DAPT führte gegenüber der Kontrolle zu einer Anreicherung des α-CTF bei gleich bleibenden Mengen reifen und unreifen APP (sieht man von der Luftblase auf Höhe von APP in der DAPT-Spur von Exp. 1 ab).

Die Statinbehandlung der Zellen führte jedoch zu einem überraschenden Ergebnis. Bei den betreffenden Proben war eine Anreicherung des reifen APP bei gleichzeitiger Reduktion der Menge von α-CTF zu beobachten. Dies steht im Widerspruch zu den theoretischen Annahmen. Die Statinbehandlung sollte den intrazellulären Cholesterolspiegel durch Hemmung der endogenen Cholesterolsynthese senken und so die Aktivität der α-Sekretase stimulieren. Das Gegenteil ist der Fall.

Durch die Bestimmung des Cholesterolgehaltes der verschiedenen Proben konnte dieses Ergebnis erklärt werden (Abb. 34B). Entgegen der zu erwartenden Senkung des intrazellulären Cholesterolspiegels führte die zwanzigstündige Inkubation mit Simvastatin zu einer Erhöhung desselben. Diese paradoxe Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Forschergruppen (persönliche Kommunikation bisher unveröffentlichter Daten, Dr. Dr. Dieter Lütjohann, Institut für Klinische Pharmakologie der Universität Bonn), die nach 20 h Inkubation von verschiedenen Zell-Linien mit Inhibitoren der endogenen

Cholesterolsynthese ebenfalls einen Anstieg des intrazellulären Cholesterolspiegels konstatierten. Ursache dieses Phänomens bei Langzeitinkubation scheint die verstärkte Aufnahme von Cholesterol aus dem umgebenden Medium zu sein. Das eingesetzte Inkubationsmedium enthielt zwar 10 % Lipoprotein-defizientes Serum, aber auch dies ist nicht komplett cholesterolfrei.

Der erhöhte intrazelluläre Cholesterolspiegel unter Statinbehandlung führte zu einer Inhibition der α -Sekretase, wodurch reifes APP akkumulierte. Gleichzeitig wurde weniger α -CTF gebildet, welches möglicherweise stimuliert durch den erhöhten Cholesterolspiegel noch schneller durch die γ -Sekretase abgebaut wurde.

Nachdem die Expression und Prozessierung von APP in den HT-22 Zellen untersucht war, und festgestellt wurde, dass diese Prozessierung auch in diesen Zellen cholesterolsensitiv erfolgt, waren die experimentellen Voraussetzungen gegeben, um den potentiellen Einfluß der Apo E-Isoformen auf die APP-Prozessierung zu untersuchen.

3.6.3. Apo E und APP-Prozessierung in HT-22 Zellen

Die HT-22 Zellen wurden analog zu den vorangegangenen Experimenten behandelt. Die Statininkubation wurde jedoch durch die Inkubation mit Apo E3- und Apo E4-HDL ersetzt. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abb. 35 dargestellt.

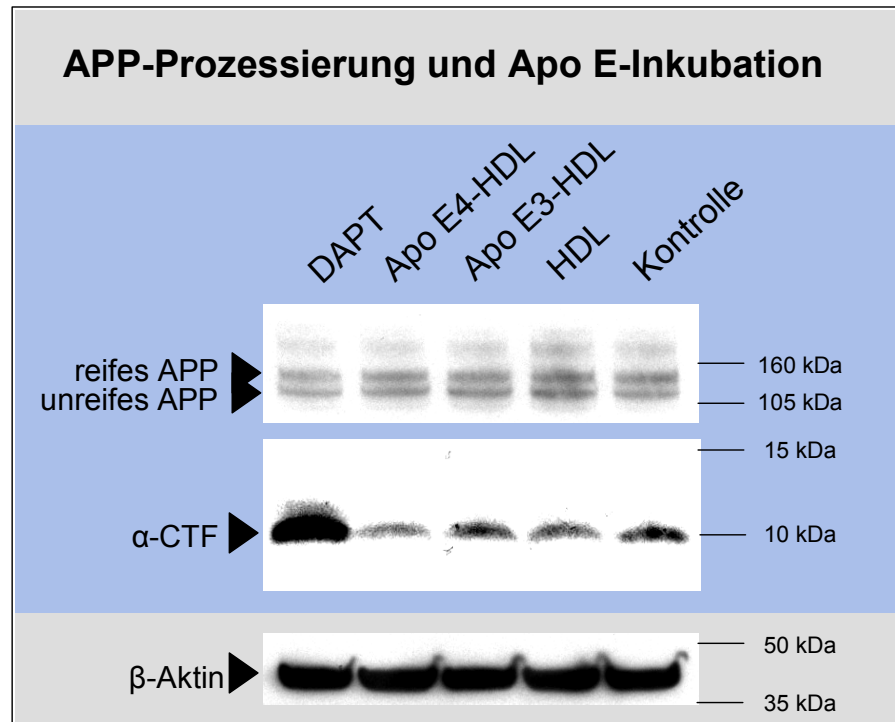


Abb. 35: Einfluss von Apo E3 und Apo E4 auf die APP-Prozessierung.

Immunoblot gegen APP (C-Terminus) nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Gesamtzellproteinpräparationen (je Spur 30 μ g Protein geladen). Die Zellen wurden vor Präparation des Gesamtzellproteins für 20 h in Medium mit 10% LPDS wie folgt inkubiert: ohne Zusatz, mit DAPT (1 μ M), mit Apo E-freier HDL (10 μ g/ml) sowie mit Apo E3- bzw. Apo E4-HDL (10 μ g/ml Apo E an 10 μ g/ml HDL-Protein). Als Beladungskontrolle wurde β -Aktin detektiert. APP, sein Fragment sowie das β -Aktin und der Molekulargewichtsmarker sind gekennzeichnet. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Experimenten.

Abb. 35 zeigt für die Kontrollprobe sowie die DAPT-inkubierten Zellen das aus Abb. 33 und 34 gewohnte Bild. Vergleicht man jedoch die Spuren mit den Apo E4-HDL und Apo E3-HDL inkubierten Zellen, so wird deutlich, dass bei vergleichbaren Mengen reifen und unreifen APP unter Apo E4-HDL Inkubation weniger α -CTF zu finden war. Die Apo E4-HDL Inkubation scheint also in irgendeiner Weise die Aktivität der γ -Sekretase zu stimulieren. Da die Aktivität der α -Sekretase keinen „Apo-E Effekt“ aufwies (vergleichbare Mengen APP in beiden Spuren), war diese Stimulation der γ -Sekretase vermutlich nicht auf eine Veränderung des intrazellulären Cholesterolspiegels zurückzuführen (wie in Abb. 34). Die Bestimmung des Cholesterolgehaltes bestätigte diese Vermutung (Daten nicht gezeigt). Es ließen sich keine Unterschiede im Cholesterolgehalt zwischen Apo E3- und Apo E4-HDL

Inkubation feststellen. Dieses Ergebnis ist kohärent mit den Ergebnissen der Cholesterolefflux Experimente (Abschnitt 3.5.).

Apo E4 scheint also die Prozessierung von C-terminalen APP-Fragmenten durch die γ -Sekretase zu fördern. Dieser Effekt wird vermutlich nicht durch eine Dysregulation des intrazellulären Cholesterolgehaltes vermittelt. Die Stimulation der γ -Sekretaseaktivität führt im humanen System neben der Bildung des nicht-amyloidogenen p3 auch zu einer vermehrten Bildung von A β , weil hier auch eine amyloidogene Prozessierung möglich ist. Wie Apo E4 diesen pathogenen Effekt jenseits des intrazellulären Cholesterolspiegels vermittelt, bedarf weiterführender Untersuchungen.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der Apolipoprotein E-Isoformen auf den Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen. Dabei sollte insbesondere die Frage geklärt werden, ob es nach Aufnahme von lipoproteinassoziertem Apo E zu einem isoformspezifischen Recycling dieses Apolipoproteins kommt und ob dies evtl. mit einem Efflux von intrazellulärem Cholesterol einhergeht. In diesem Zusammenhang sollte außerdem untersucht werden, welchen Einfluss die verschiedenen Apo E-Isoformen auf die intrazelluläre Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) haben. Im Fokus der Untersuchungen standen dabei die Isoformen Apo E3 (Wildtyp) und E4. Hintergrund ist die Rolle von Apo E4 als Risikofaktor für die Entwicklung einer Demenz vom Alzheimer Typ sowie der aktuell diskutierte Zusammenhang zwischen cerebraler Cholesterolhomeostase und Pathogenese der Alzheimer Krankheit.

Voraussetzung für die Bearbeitung dieser Fragestellung war die Auswahl und Charakterisierung eines geeigneten neuronalen Zellsystems sowie die Präparation geeigneter Modell-Liganden.

4.1. Auswahl und Charakterisierung des Zellsystems

Da das auszuwählende Zellsystem als Surrogat für Neurone bei der Untersuchung des zellulären Lipidstoffwechsels dienen sollte, musste es folgende Prämissen erfüllen:

Die Zellen sollten neuronaler Abstammung sein und von ihrer Verfügbarkeit und den Kultureigenschaften her für die Durchführung biochemischer Experimente geeignet sein. Die Zellen sollten zudem über neuronal exprimierte und funktionell aktive Lipoproteinrezeptoren verfügen.

Verschiedene neuronale Zell-Linien wurden daher auf ihre Eignung hin überprüft. Im Einzelnen waren dies die humane Neuroblastomzell-Linie LA-N-5 (Seeger et al., 1982), die murine monoklonale Neuroblastomzell-Linie Neuro2a (Olmsted et al., 1970) sowie die monoklonale, immortalisierte hippokampale Zell-Linie HT-22 (Morimoto and Koshland, Jr., 1990; Maher and Davis, 1996).

Die Zell-Linien wurden immunhistochemischen, biochemischen und proteinchemischen Untersuchungen unterzogen. Die Auswertung dieser Untersuchungen führte zur Auswahl der HT-22 Zellen, da diese über die geforderten Eigenschaften verfügen:

HT-22 Zellen leiten sich von HT-4 Zellen (*Mus musculus*) ab, welche immortalisierte Zellen hippokampalen Ursprungs sind (Morimoto *et al.*, 1990). Aus diesen wurden sie durch Subklonierung gewonnen (Maher *et al.*, 1996). HT-22 Zellen finden als *in vitro* Neuronenmodell bei der Erforschung neuronaler Stoffwechselwege breite Verwendung. So erfolgten mit ihnen Untersuchungen zur Auswirkung des oxidativen Stresses auf Neurone (Schafer *et al.*, 2004; van Leyen *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006), zur neuroprotektiven Wirkung von Östrogenen (Deecher *et al.*, 2005), zur Aggregation des tau-Proteins, welches bei der Pathologie der Alzheimer Krankheit eine wichtige Rolle spielt (Suo *et al.*, 2003), sowie zu zahlreichen anderen Fragestellungen.

Ihre Kultureigenschaften ermöglichen die Durchführung der angestrebten zellbiologischen Untersuchungen. Sie proliferieren schnell und wachsen adhärent, wobei keine zusätzliche Beschichtung des Zellkulturmaterials mit Adhärenz-fördernden Substanzen erforderlich ist. Ihre Morphologie mit den kurzen zytoplasmatischen Ausläufern erlaubt die immunhistochemische Untersuchung von endozytotischen Prozessen, weil perinukleäre und periphere zytoplasmatische Bereiche voneinander zu differenzieren sind (Abb. 10b und e).

Die Inkubation mit Apo E-haltigen Lipoproteinpartikeln resultierte in der Aufnahme des Apo E in zytoplasmatische Kompartimente (Abb. 10e). Studien einer anderen Arbeitsgruppe haben zudem gezeigt, dass die Inkubation mit den Apo E-Isoformen E3 und E4 für die HT-22 Zellen nicht zytotoxisch ist. Erst bei hohen Apo E-Konzentrationen (>20 µg/ml) in Verbindung mit langen Inkubationszeiten (> 20 h) konnten signifikante zytotoxische Effekte für Apo E4 nachgewiesen werden (Veinbergs *et al.*, 2002).

Die HT-22 Zellen verfügen im Vergleich zu Neuronen über einen sehr ähnlichen Besatz mit Lipoproteinrezeptoren (Abb. 11). So konnten LRP1 sowie der LDL-Rezeptor mittels Immunoblotuntersuchung in den Zellextrakten der HT-22 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 11A). Semiquantitative Analysen haben zudem gezeigt, dass das Expressionsverhältnis von LRP1 zum LDL-R in etwa dem von murinen Neuronen entspricht (Abb. 11B). Die anderen untersuchten Rezeptoren der LDL-R Familie waren dagegen nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis entsprach weitgehend den Literaturangaben für Neurone, die prädominant LRP1 aber auch den LDL-R sowie den VLDL-R und ApoER2 exprimieren (Rebeck *et al.*, 1993; LaDu *et al.*, 2000; Herz and Bock, 2002). Die Abwesenheit des VLDL-R in den Zellextrakten der HT22-Zellen war in diesem Zusammenhang von Vorteil, weil ein Ziel dieser Arbeit die Untersuchung des Apo E-Recyclings war, welches in nicht-neuronalen Zellen prädominant von LRP1 vermittelt wird (Heeren *et al.*, 2006) und die Abwesenheit anderer Apo E-bindender Rezeptoren, wie des VLDL-R, die Zahl alternativer Aufnahmewege verringerte. Die Anwesenheit des ApoER2 wurde dagegen nicht untersucht.

Neben LRP1 und LDL-R konnte auch der Scavenger Rezeptor SR-BI in den Zellextrakten der HT-22 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 11A). Dieser Rezeptor ist an der selektiven

Aufnahme von Cholesterol und Cholesterylestern beteiligt und wird der Literatur zur Folge überwiegend von Gliazellen exprimiert (Posse De Chaves et al., 2000; Husemann and Silverstein, 2001). Eine neuronale Expression des Rezeptors kann nach dem derzeitigen Kenntnissstand jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die mittels immunhistochemischer Methoden untersuchte zelluläre Lokalisation von LRP1 und dem LDL-R entsprach dem in diesem Labor für nicht-neuronalen Zell-Linien beobachteten Muster (PD Dr. Jörg Heeren, unveröffentlichte Beobachtungen aus diesem Labor). Der LDL-R lokalisiert überwiegend an der Plasmamembran, wohingegen LRP1 eher perinukleär zu finden ist (Abb. 12A).

Die Funktionalität von LRP1 wurde durch die Inkubation der Zellen mit dem LRP1-spezifischen Liganden RAP (receptor associated protein) untersucht. Seine Endozytose deutete darauf hin, dass LRP1 funktionell aktiv ist (Abb. 12B).

Die neuronale Abstammung der HT-22 Zellen wurde durch die proteinchemische und immunhistochemische Untersuchung spezieller Markerproteine bestätigt. HT-22 Zellen exprimieren das neuronale Markerprotein tau (Abb. 13A), und die homogene cytoplasmatische Lokalisation des Proteins in der immunhistochemischen Untersuchung (Abb. 13B) entsprach der Beschreibung in der Literatur (Suo *et al.*, 2003). Die gleichzeitige Abwesenheit des glialen Markerproteins GFAP favorisiert ebenfalls eine neuronale Abstammung der Zellen. Das Fehlen des zweiten neuronalen Markerproteins MAP2c beeinflusst diese Schlussfolgerung nicht, da MAP2c überwiegend von pränatalen Neuronen gebildet wird und die Expression in adulten Neuronen stark abnimmt.

Zusammenfassend war festzustellen, dass die HT-22 Zellen alle geforderten Prämissen für ein *in vitro* Neuronenmodell erfüllen. Dennoch handelt es sich bei diesen Zellen morphologisch und funktionell nicht notwendigerweise um Neurone, trotzdem waren sie für die angestrebten Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel das geeignete Modellsystem.

Die anderen untersuchten Zell-Linien waren dagegen aus verschiedenen Gründen für die angestrebten Untersuchungen ungeeignet: Die LA-N-5 Zellen exprimieren im Verhältnis zum LDL-R recht wenig LRP1 und verfügen zudem noch über weitere Apo E-Rezeptoren (Abb. 11A und B). Gleichzeitig eignet sich ihre Morphologie nicht für immunhistochemische Untersuchungen (Abb. 10d). Die Neuro2a Zellen hingegen exprimieren kaum LRP1 und der von ihnen exprimierte LDL-R weist ein stark aberrierendes Migrationsverhalten in der Gelelektrophorese auf (Abb. 11A). Aufgrund ihrer eher sphärischen Morphologie waren auch sie für die angestrebten immunhistochemischen Untersuchungen nur bedingt geeignet (Abb. 10 c und f).

4.2. Präparation und Charakterisierung der Modell-Liganden

Idealerweise sollten die Untersuchungen zum Einfluss der Apo E-Isoformen auf den neuronalen Lipidstoffwechsel mit Lipoproteinen aus dem Liquor cerebrospinalis (CSF-Lp) erfolgen, weil dies den physiologischen Verhältnissen am nächsten gekommen wäre. Die biologische Verfügbarkeit dieser Partikel war jedoch stark limitiert. So ist die Konzentration der CSF-Lp im Liquor cerebrospinalis um ein Vielfaches geringer als die Konzentration der Plasmalipoproteine im Blut (Tab. 2). Gleichzeitig beträgt das Liquorvolumen eines erwachsenen Menschen lediglich 140 ml und der Liquor cerebrospinalis lässt sich zudem nur durch eine Punktion des Rückenmarkkanals (Lumbalpunktion) gewinnen. Diese Einschränkung der biologischen Verfügbarkeit machte es unmöglich, genügend CSF-Lp von einem definierten Spender gewinnen zu können. Eine alternative Vereinigung mehrerer Liquorproben verschiedener Spender schied aus Gründen der Reproduzierbarkeit von Experimenten aus.

Da CSF-Lp jedoch bezüglich ihrer Lipidzusammensetzung, der Größe und Dichte sowie dem Besatz mit Apolipoproteinen einer Klasse von Plasmalipoproteinen, den HDL, sehr ähnlich sind (vergl. Abschnitt 1.2.), wurden die HDL als Modell-Liganden herangezogen.

Die HDL konnten erfolgreich mittels Ultrazentrifugation aus dem Plasma eines gesunden männlichen Spenders mit dem Apo E-Genotyp $\epsilon 3/3$ isoliert werden (Abb. 14 und 15A). Die präparierten Gesamt-HDL waren dabei nahezu frei von Kontaminationen mit anderen Plasmalipoproteinen (Abb. 15B und 16), und ihre Lipidzusammensetzung entsprach den Angaben für Gesamt-HDL aus der Literatur (Havel and Rapaport, 1995) (Tab. 4). Geringfügige Abweichungen von den Literaturangaben, z.B. im Phospholipidgehalt, können darauf zurückgeführt werden, dass die Literaturwerte auf der Untersuchung von Proben verschiedener Spender basieren, wohingegen die präparierte Gesamt-HDL von nur einem Spender stammte. Hauptapolipoproteine der isolierten Gesamt-HDL waren Apo AI und Apo E (Abb. 17A).

Die große Ähnlichkeit der präparierten Gesamt-HDL zu den CSF-Lp wird aus Tabelle 4 deutlich. So entspricht ihre Lipidzusammensetzung nahezu den Literaturangaben für CSF-LpE und CSF-LpEA deren Hauptapolipoproteine ebenfalls Apo E bzw. Apo E und Apo AI sind (vergl. Abschnitt 1.2.) (Koch et al., 2001). Die präparierten Gesamt-HDL wiesen im Vergleich zu den CSF-Lp einen geringfügig größeren Anteil an Gesamtcholesterol auf, nämlich 21 % statt 14-17% der Gesamtmasse. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass HDL neben Cholesterol auch Cholesterylester enthalten, deren Gehalt mit der Wandlung von kleinen zu großen HDL zunimmt (von Eckardstein et al., 2005). CSF-Lp enthalten dagegen nur geringe Mengen veresterten Cholesterols, weil der Großteil des

Cholesterols (> 99,5%) im Gehirn unverestert vorliegt (Bjorkhem and Meaney, 2004). Der Anteil der Cholesterylester am Gesamtcholesterolgehalt der HDL wurde jedoch nicht untersucht. Die präparierten HDL enthielten in Übereinstimmung mit den Literaturangaben geringe Mengen Triglyzeride (7% der Gesamtmasse)(Tab. 4). CSF-Lp enthalten dagegen den Literaturangaben zur Folge keine nachweisbaren Mengen an Triglyzeriden, weil Fettsäuren im Gehirn nicht verstoffwechselt werden. Der im Vergleich zu den CSF-Lp etwas geringere Anteil von Phospholipiden an der Gesamtmasse der HDL ist darauf zurückzuführen, dass die HDL im Gegensatz zu den CSF-Lp noch Triglyzeride und einen größeren Anteil Gesamtcholesterol enthalten, so dass sich der prozentuale Anteil der Phospholipide reduziert. Dieser betrug bei den präparierten HDL 14% der Gesamtmasse im Vergleich zu den Literaturwerten für CSF-Lp von 20-27%.

Eine Gelfiltrationschromatographische Untersuchung der präparierten HDL zeigte, dass ihre Partikelgröße sich im Größenbereich von CSF-Lp bewegte (Abb. 16). Die HDL fanden sich in den Fraktionen 20-25, wohingegen sich die CSF-Lp den Literaturangaben zur Folge unter identischen Versuchsbedingungen in den Fraktionen 18-23 finden (Koch *et al.*, 2001). Da bei der Gelfiltrationschromatographie eine Trennung nach Partikelgröße erfolgt, und große Partikel die Säule schneller verlassen als kleine, bedeutete dies, dass die CSF-Lp geringfügig größer sind als die präparierten HDL. Dieser Unterschied war jedoch marginal. Zusammenfassend war festzustellen, dass die präparierten HDL in ihrer Lipidzusammensetzung und ihrem Apolipoproteinbesatz sowie der Partikelgröße näherungsweise den CSF-Lp entsprachen und damit geeignete Modell-Liganden darstellten.

Da mit diesem Modell-Liganden der Einfluss der Apolipoprotein E-Isoform auf den Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen untersucht werden sollte, war es notwendig die präparierten HDL mit äquivalenten Mengen der verschiedenen Apo E-Isoformen anzureichern. Hierfür wurde rekombinantes humanes Apo E3 und Apo E4 an die präparierte Gesamt-HDL assoziiert (vergl. Abschnitte 2.2.3. und 2.2.4.). Mittels proteinchemischer Methoden (Abb. 18) und Gelfiltrationschromatographie (Abb. 19) konnte nachgewiesen werden, dass Apo E3 und Apo E4 partikelassoziiert vorlagen und die HDL äquivalente Mengen der Apo E-Isoformen trugen. Dies ist vor dem Hintergrund von großer Bedeutung, dass für Apo E4 eine präferentielle Bindung an große Lipoproteine beschrieben wurde (Dong and Weisgraber, 1996). Eine im Vergleich zu Apo E3 schlechtere Bindung von Apo E4 an die kleinen HDL-Partikel konnte unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht beobachtet werden.

Die für einen Teil der Experimente eingesetzte Gesamt-HDL stellte eine Mischpopulation der verschiedenen HDL-Subklassen dar. Sie enthielt vornehmlich HDL₂ und HDL₃ (Abb. 16). Wie bereits in Abschnitt 1.2. erwähnt tragen HDL₃ prädominant Apo AI, wohingegen HDL₂ Apo AI

und Apo E tragen. Da die Partikel aus dem Blut eines Spenders vom Apo E-Genotyp $\epsilon 3/3$ isoliert wurden, enthielten die Gesamt-HDL Präparationen auch immer eine gewisse Menge Apo E3 des Spenders. Dies war für den Großteil der durchgeführten Experimente jedoch nicht störend, weil die Isoform Apo E3 die „Wildtyp-Form“ darstellt und bei den entsprechenden Experimenten immer eine HDL-Kontrolle ohne Apo E-Anreicherung mitgeführt wurde. Für einige Experimente, die mittels immunologischer Verfahren ausgewertet wurden, war es jedoch notwendig, Apo E-freie HDL als Ausgangsmaterial für die Präparation von Apo E3 und E4 angereicherter HDL zu isolieren, weil die zur Detektion des Apo E verwendeten Antikörper nicht zwischen zugesetztem Apo E und dem Spender Apo E diskriminieren konnten. Hierfür erfolgte die Isolierung Apo E-freier HDL mittels Affinitätschromatographie. Es konnte erfolgreich Apo E-freie HDL isoliert werden (Abb. 17), welche prädominant Apo AI trug und somit HDL₃ darstellte.

Die aufwendige Präparation von Modell-Liganden war aus verschiedenen Gründen erforderlich. Zum einen sollten für die angestrebten Untersuchungen möglichst gute Surrogate für CSF-Lp eingesetzt werden, zum anderen ist es aus zellbiologischen Gründen erforderlich, dass das Apo E im Zellkulturmedium lipoproteinassoziiert vorliegt. So hat die Untersuchung einer anderen Gruppe zum Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen gezeigt, dass lipidfreies Apo E im Vergleich zu lipidiertem Apo E schlechter an die Zellen bindet und weniger gut aufgenommen wird (Ji et al., 1998). Zur Lösung dieses Problems erfolgte bei der zuvor zitierten Arbeit die Apo E-Inkubation in Gegenwart von Lipoproteinen, welche aus dem Plasma von Kaninchen gewonnen wurden. Diese als β -VLDL bezeichneten Lipoproteine tragen neben Apo E auch Apo B48 und sind aus zwei Gründen problematisch. Zum einen imitieren sie triglyzeridreiche Lipoproteine und gehören damit zu einer anderen Lipoproteinklasse als die HDL, welche den CSF-Lp am ähnlichsten sind. Zum anderen tragen sie das Apolipoprotein B48 (Apo B48), welches im Gehirn nicht vorkommt. Eine andere Arbeitsgruppe, die den Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen untersucht hat, favorisiert die Apo E-Inkubation in Gegenwart von fötalem Rinderserum. Dieses enthält bovine Lipoproteine an welche das zugesetzte Apo E assoziieren kann (Dekroon and Armati, 2001). Eigene Beobachtungen haben jedoch gezeigt, dass gleichzeitig große Mengen bovines Apo E vorhanden sind, welches potentiell die Aufnahme des zugesetzten Apo E beeinflussen könnte. Bei anderen Arbeitsgruppen erfolgte die Inkubation der neuronalen und glialen Zellen mit lipidfreiem Apo E (Michikawa et al., 2000; Dekroon et al., 2001; Hirsch-Reinshagen et al., 2004). Dieses Vorgehen ist aus den genannten Gründen als problematisch anzusehen und Gegenstand einer kontroversen Diskussion.

Die aufwendige Präparation der Modell-Liganden stellt dagegen ein experimentelles Werkzeug zur Verfügung, welches den physiologischen Vorbildern sehr ähnlich ist.

4.3. Einfluss der Apolipoprotein E-Isoformen auf den Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen

Nachdem ein neuronales Zellsystem ausgewählt und Modell-Liganden für Liquor-Lipoproteine präpariert waren, erfolgten die Untersuchungen zum Einfluss der Apolipoprotein-Isoformen auf den Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen.

4.3.1. Bindung und Aufnahme von Apo E3 und Apo E4

Wie bereits in Abschnitt 1.1. erwähnt, sind Neurone postnatal auf die Zufuhr exogenen Cholesterols angewiesen. Die Zufuhr erfolgt in Form von Apo E-haltigen Liquor-Lipoproteinen, die überwiegend von den Gliazellen sezerniert werden. Die Aufnahme dieser Partikel durch die Neurone erfolgt Apo E-vermittelt, wobei den Rezeptoren der LDL-R Familie eine tragende Rolle zukommt.

Erster Schritt zur Aufklärung des Einflusses der Apo E-Isoformen auf den Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen war daher die Bestimmung der Zelloberflächenbindung und Aufnahme von Apo E3 und E4.

Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen zur Apo E-Aufnahme (Abb. 21) ergab, dass sowohl Apo E3 (Abb. 21c) als auch Apo E4 (Abb. 21d) von den Zellen aufgenommen wurde. Die Aufnahme erfolgte für beide Apo E-Isoformen in vergleichbarem Umfang. Für Apo E4 konnte im Mittel über die durchgeführten Experimente eine leicht verstärkte Aufnahme beobachtet werden. Die Quantifizierung der Aufnahme und die Bestimmung der Zelloberflächenbindung in radiochemischen Experimenten bestätigte diese Beobachtung und ergab eine für Apo E4 signifikant verstärkte Bindung sowie Aufnahme (Abb. 22 und 23). Die prominentesten isoformspezifischen Unterschiede traten dabei im Konzentrationsbereich von 2–5 µg/ml auf, was der physiologischen Apo E-Konzentration im Liquor cerebrospinalis entspricht (Koch *et al.*, 2001). Die Aufnahme von Apo E4 ist hier im Vergleich zu Apo E3 um bis zu 20% (Abb. 23) und die Bindung um bis zu 65% gesteigert. Absolut beträgt die Aufnahme von Apo E3 und Apo E4 nach einstündiger Inkubation der Zellen mit 5 µg/ml Apo E im Mittel 570 bzw. 651 ng pro mg Zellprotein und die Bindung 124 bzw. 194 ng pro mg Zellprotein, was 20-30% der Aufnahme entspricht.

Die Aufnahme wird vermutlich, wie für Neurone beschrieben, überwiegend von den vorhandenen Lipoproteinrezeptoren (LDL-R und LRP1) vermittelt, eine Bindung und Aufnahme könnte jedoch auch durch eine spezielle Gruppe von Proteoglykanen an der Zelloberfläche, den HSPG (Heparansulfat-Proteoglykane), vermittelt werden. Für nicht-neuronale Zellen ist die Bindung und Aufnahme von Apo E und Lipoproteinpartikeln über

HSPGs beschrieben worden (Fielding et al., 1989; Sehayek et al., 1996; Beisiegel and Heeren, 1997). Für neuronale Zellen wird diese Möglichkeit ebenfalls diskutiert (Ji et al., 1998; Michikawa et al., 2000). Untersuchungen mit HSPG-defizienten nicht-neuronalen Zellen haben jedoch gezeigt, dass die HSPGs allenfalls für einen Teil der Apo E-Aufnahme verantwortlich sind. Die Anwesenheit von HSPGs auf den HT-22 Zellen und die potentiell über sie vermittelte Apo E-Bindung und -Aufnahme wurde jedoch nicht weiter untersucht.

Die beobachtete Aufnahme von Apo E in die neuronalen Zellen ist kohärent zu den Literaturangaben für humane Neurone. So konnte in der Primärkultur humaner Neurone mittels immunhistochemischer Methoden eine Aufnahme von Apo E3 und E4 gezeigt werden (Dekroon et al., 2001). Apo E3 findet sich dabei nach 30minütiger Inkubation überwiegend in frühen endosomalen Kompartimenten, wohingegen Apo E4 im Vergleich zu Apo E3 prädominant in späten endosomalen und lysosomalen Kompartimenten lokalisiert. Mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte ein isoformspezifisches Apo E-Recycling sein. Dies wurde im Rahmen der zuvor zitierten Arbeit jedoch nicht intensiver untersucht. Ebenso unterblieb eine genaue Quantifizierung der Apo E-Aufnahme. Die durch eine andere Arbeitsgruppe an einer neuronalen Zell-Linie durchgeführten quantitativen Untersuchungen ergaben eine Steigerung der Aufnahme der eingesetzten Lipoproteinpartikel nach Anreicherung mit Apo E3 und E4, wobei Apo E4 die Aufnahme potenter vermittelte. Überraschenderweise war nach zweistündiger Inkubation mit 7,5 µg/ml Apo E weniger zellassoziiertes Apo E4 als E3 nachweisbar (340 zu 720 ng Apo E pro mg Zellprotein) (Ji et al., 1998). Die Menge des aufgenommenen Apo E von weniger als 1000 ng Apo E pro mg Zellprotein bewegte sich bei dieser Untersuchung aber im Bereich eigener Beobachtungen. Aus experimentellen Gründen können die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nur bedingt mit den eigenen Untersuchungen verglichen werden. Zum einen fanden als Vehikel für das Apo E die bereits erwähnten β -VLDL aus dem Kaninchen Verwendung, welche TRL imitieren und stark von den HDL-ähnlichen Liquor-Lipoproteinen divergieren. Außerdem tragen diese Partikel das Apo B48, das im Gehirn nicht vorkommt. Zum anderen handelt es sich bei der eingesetzten neuronalen Zell-Linie um Neuro2a-Zellen, deren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergeben hat, dass diese nur geringe Mengen des für Neurone typischen LRP1 exprimieren (Abb. 11A). Stattdessen exprimieren sie prädominant eine im Molekulargewicht abweichende Form des LDL-R.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es bei den untersuchten neuronalen Zellen zu einer isoformspezifischen Bindung und Aufnahme von Apo E gekommen ist. Apo E4 hat dabei in verstärktem Maße an die Zelloberfläche gebunden und ist besser aufgenommen worden als Apo E3. Ursache für die verstärkte Bindung von Apo E4 an die Rezeptoren auf der Zelloberfläche könnten seine besonderen physikochemischen Eigenschaften sein (vergl.

Abschnitt 1.3.). So resultiert aus dem Aminosäureaustausch (Cys nach Arg) an Position 112 eine zusätzliche positive Ladung sowie die Möglichkeit zu einer Interdomänen-Interaktion. Dies könnte Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften an Zelloberflächenrezeptoren haben. Diese Vermutung bedarf jedoch noch einer experimentellen Validierung. Die vermehrte Aufnahme von Apo E4 spiegelt möglicherweise ein reduziertes Recycling dieser Isoform wieder, welches zu einer intrazellulären Retardierung von Apo E4 führen würde. Weiteres Indiz für dieses isoformspezifische Recycling sind die zitierten Beobachtungen aus der Primärkultur humaner Neuronen. Hier wurde für endozytisiertes Apo E4 eine Lokalisation in späten endosomalen und lysosomalen Kompartimenten beobachtet. Apo E3 lokalisierte dagegen prädominant in frühen endosomalen Kompartimenten, aus welchen für nicht-neuronale Zellen das Recycling beobachtet wurde (Dekroon *et al.*, 2001; Heeren *et al.*, 2006).

Die Möglichkeit eines isoformspezifischen Apo E-Recyclings in neuronalen Zellen wurde daher untersucht.

4.3.2. Apo E-Recycling in HT-22 Zellen

Die Untersuchung des Apo E-Recycling erfolgte mittels radiochemischer und proteinchemischer Experimente. Die verschiedenen experimentellen Ansätze bestätigten die Vermutung, dass es in den neuronalen Zellen analog zu den nicht-neuronalen Zellen zu einem isoformspezifischen Apo E-Recycling kommt, bei welchem Apo E4 schlechter recycelt wird als Apo E3 (Heeren *et al.*, 2004).

Die radiochemische Untersuchung (Abb. 25) ergab für Apo E3 im Mittel ein Recycling von 168 ng Apo E pro mg Zellprotein. Für Apo E4 betrug dieser Wert 128 ng Apo E pro mg Zellprotein. Setzt man die entsprechenden radiochemischen Experimente zur Apo E-Aufnahme (Inkubation mit 5 µg/ml Apo E) (Abb. 23) in Bezug zu diesen Werten, so wird 20% des nach einer Stunde aufgenommenen Apo E4 während der folgenden einstündigen Postinkubationsphase recycelt. Für Apo E3 liegt dieser Wert dagegen bei 30%. Das Recycling von Apo E3 ist damit um den Faktor 1,5 effektiver als das von Apo E4. Der Wert für das Apo E3 Recycling bewegt sich zudem im Bereich der Literaturangaben für nicht-neuronale Zellen. So wurde bei Untersuchungen an einer Leberzell-Linie nach einstündiger Postinkubationsphase 36% des zuvor aufgenommenen Apo E recycelt (Heeren *et al.*, 2001). Bei diesen Experimenten wurde jedoch mit TRL-assoziiertem Apo E inkubiert, so dass ein direkter Vergleich schwierig ist.

Die ebenfalls in der Literatur beschriebene Stimulation des Apo E-Recyclings durch die Zugabe des Apo E-Akzeptors HDL (Heeren *et al.*, 2003) zeigte bei den radiochemischen Experimenten keinen signifikanten Effekt. Lediglich für Apo E3 konnte eine leichte

Stimulation des Recyclings beobachtet werden. Dies lag vermutlich an den bereits im Ergebnisteil diskutierten Limitierungen des experimentellen Systems.

Die proteinchemischen Untersuchungen bestätigten die Beobachtung des isoformspezifischen Recyclings. Mittels Immunoblot (Abb. 26A) konnte zudem nachgewiesen werden, dass es während der Postinkubationsphase tatsächlich zu einer Retroendozytose intakten Apo E3 und Apo E4 kommt, wobei Apo E4 in geringerem Umfang retroendozytiert wird als Apo E3. Die densitometrische Auswertung (Abb. 26B) ergab zudem eine Stimulation des Apo E3-Recyclings durch den Akzeptor. Die Quantifizierung des retroendozytierten Apo E mittels eines Apo E-ELISA (Abb. 27) bestätigte die Stimulation des Apo E3-Recyclings durch den Akzeptor. Für Apo E4 konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden.

Trotz methodisch begründeter Schwankungen in der Ausprägung der isoformspezifischen Unterschiede beim Apo E-Recycling wurde unter identischen Inkubationsbedingungen stets ein vermindertes Recycling von Apo E4 im Vergleich zu Apo E3 beobachtet.

Damit ist erstmals das Recycling von Apo E in neuronalen Zellen nachgewiesen worden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass das beobachtete Recycling isoformspezifisch erfolgt, wobei Apo E4 signifikant schlechter recycelt wird als Apo E3. Zusammen mit den bereits erwähnten Ergebnissen der Untersuchung zur intrazellulären Lokalisation von endozytiertem Apo E3 und E4 in der Primärkultur humaner Neurone (Dekroon *et al.*, 2001) lässt sich postulieren, dass dieses isoformspezifische Apo E-Recycling ebenfalls in humanen Neuronen präsent ist. Dies könnte u.a. erklären warum Träger des $\epsilon 4$ -Allels, welche Apo E4 exprimieren, ein Defizit bei Reparatur- und Regenerationsprozessen von Neuronen aufweisen (Poirier, 1996). Die intrazelluläre Retardierung von Apo E4 könnte hier dazu führen, dass die Apo E-vermittelte Ver- und Entsorgung der geschädigten Neurone mit Lipiden gestört ist. Das verminderte Recycling von Apo E4 könnte auch seine Rolle als Risikofaktor für die Alzheimer Erkrankung erklären. Studien an nicht-neuronalen Zellen haben gezeigt, dass das Recycling von Apo E mit einem Cholesterolefflux assoziiert ist (Heeren *et al.*, 2003) und dass das verminderte Recycling von Apo E4 zu einer intrazellulären Cholesterollakkumulation führt (Heeren *et al.*, 2004). Ein erhöhter intrazellulärer Cholesterolspiegel in den Neuronen fördert wiederum die Bildung des Alzheimer-Proteins A β , welches extrazellulär aggregiert und sich in den senilen Plaques ablagert (Vance *et al.*, 2005).

Um den Einfluss der Apo E-Isoformen auf den Lipidstoffwechsel neuronaler Zellen eingehender zu untersuchen und um die Frage einer möglichen Apo E4-vermittelten Cholesterollakkumulation in den neuronalen Zellen zu klären, erfolgten Untersuchungen zum ApoE-Recycling assoziierten Cholesterolefflux.

4.3.3. Cholesterol-Efflux aus HT-22 Zellen

Die Untersuchungen zum Cholesterol-Efflux erfolgten zunächst analog zu den Untersuchungen zum Apo E-Recycling mit HDL-assoziiertem Apo E3 und E4. Hierfür wurde Apo E-freie HDL eingesetzt, die mit Apo E3 und E4 angereichert wurde.

Bereits während der Inkubation der Zellen mit den Liganden kam es zu einem deutlichen Cholesterol-Efflux (Abb. 29A). Dieser Effekt beruhte vornehmlich auf der Anwesenheit der eingesetzten HDL-Partikel. So steigerte die Inkubation der Zellen mit Apo E-freier HDL in nahezu identischem Umfang den basalen Cholesterol-Efflux wie die HDL mit Apo E3- und Apo E4-Anreicherung. Die Steigerung betrug für die Apo E-freie HDL 72%, für die HDL mit Apo E3-Anreicherung 81% und für die HDL mit Apo E4-Anreicherung 78%. Der geringfügig höhere Efflux mit Apo E-Anreicherung war nicht signifikant. Dieser HDL-induzierte Cholesterol-Efflux ist nicht verwunderlich, weil die als Vehikel für das Apo E eingesetzte Apo E-freie HDL den HDL₃ entspricht und prädominant Apo AI trägt, welches ein potenter Cholesterol-Akzeptor ist (Hara and Yokoyama, 1991) (vergl. Abschnitt 1.2.). Der Cholesterol-Efflux während der Postinkubationsphase (Abb. 29B) fiel deutlich geringer aus und betrug bei den mit Liganden vorinkubierten Zellen einheitlich ca. 20% des Effluxes während der Ligandeninkubationsphase.

In der Postinkubationsphase sollte der Apo E-Recycling assoziierte Cholesterol-Efflux beobachtet werden. Es waren jedoch keine Unterschiede im Cholesterol-Efflux zwischen Zellen, die mit Apo E-freier HDL oder mit Apo E angereicherter HDL vorinkubiert wurden, detektierbar. Dabei spielte es auch keine Rolle, ob mit Apo E3 und Apo E4 vorinkubiert wurde. Lediglich durch Zugabe des Akzeptors (Apo E-freie HDL) ließ sich insgesamt der Cholesterol-Efflux während der Postinkubationsphase steigern. Dies unterstreicht nochmals die potente Funktion der Apo E-freien HDL als Cholesterol-Akzeptor. Aber auch unter Akzeptor-Stimulus war kein Apo E-Effekt auf den Cholesterol-Efflux detektierbar.

Zusammenfassend konnte weder eine zusätzliche Stimulation des Cholesterol-Efflux durch Apo E3 und Apo E4 während der Ligandeninkubationsphase beobachtet werden, noch konnte ein Apo E-Recycling assoziierter Cholesterol-Efflux detektiert werden.

Die relative Auswertung der Experimente ergab, dass die Zellen während der Inkubation mit den Liganden nur ca. 6% des markierten Cholesterols abgeben (Abb. 30). Addiert man den Efflux aus der Postinkubationsphase (mit Akzeptor) hinzu, beträgt der Gesamtefflux bei den ligandeeinkubierten Zellen 8,3–9,0%. Auch bei dieser relativen Auswertung ist kein signifikanter Apo E-Effekt erkennbar. Allenfalls für die Apo E3 inkubierten Zellen zeigte sich eine marginale Steigerung des Cholesterol-Efflux. Diese ist jedoch nicht signifikant.

Ordnet man diese Ergebnisse in die Literatur ein, so finden sich Untersuchungen zum Cholesterol-Efflux in der Primärkultur muriner Astrozyten (Hirsch-Reinshagen *et al.*, 2004).

Die Astrozyten wurden in einem ähnlichen experimentellen System mit 10 µg/ml lipidfreiem Apo AI inkubiert, welches nach 8 h Inkubation zu einem Efflux von 8,5% des markierten Cholesterols führte. Lipidfreies Apo AI ist, wie in Abschnitt 1.2. beschrieben, ein potenter Cholesterol-Akzeptor und initial an der Bildung von HDL beteiligt. Insofern ähnelt die Inkubation mit Apo AI der Inkubation mit Apo E-freier HDL, weil diese als Hauptapolipoprotein Apo AI tragen (Abb. 15). Der beobachtete Efflux von 8,5% nach 8stündiger Inkubation bewegt sich im Bereich der eigenen Beobachtungen zum Gesamtefflux nach Ligandeninkubation und Postinkubation mit Apo E-freier HDL von 8,3 %. Im Rahmen der zuvor zitierten Arbeit wurde auch für 8 Stunden mit 10 µg/ml lipidfreiem Apo E3 und E4 inkubiert, was in einen Efflux von 8,75% für Apo E3 und 8,25% für Apo E4 resultierte, wobei der Unterschied zwischen Apo E3 und E4 nicht signifikant war. Bei den eigenen Untersuchungen kam es nach einstündiger Inkubation mit 10 µg/ml Apo E3- und Apo E4-HDL zu einem Efflux von 6,49 % für Apo E3 und 5,78% für Apo E4, wobei diese Unterschiede ebenfalls nicht signifikant waren und die Inkubation mit Apo E-freier HDL bereits zu einem Efflux von 5,81% führte (Abb. 30). Die eigenen Untersuchungen können nur bedingt mit den Literaturangaben verglichen werden, weil die Inkubationszeiten divergieren und weil das Apo E im eigenen System an HDL assoziiert vorlag. Zudem erfolgten die zitierten Untersuchungen an Astrozyten und nicht an neuronalen Zellen.

Eine andere wissenschaftliche Arbeit hat dagegen den Apo E-vermittelten Cholesterol-Efflux in der Primärkultur von Neuronen aus der Ratte untersucht (Michikawa *et al.*, 2000). Hierfür wurden die Zellen für 4 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von lipidfreiem Apo E3 und E4 inkubiert (0-50 µg). Bei einer Apo E-Konzentration von 12 µg/ml erfolgte für Apo E3 ein Cholesterol-Efflux von 5% und für Apo E4 von 4,35%, wobei die Unterschiede bei dieser Konzentration nicht signifikant waren. Diesen Ergebnissen stehen die Resultate der eigenen Untersuchungen gegenüber, die wie bereits erwähnt, nach einstündiger Inkubation mit 10 µg/ml Apo E3- und Apo E4-HDL zu einem Efflux von 6,49 % für Apo E3 und 5,78% für Apo E4 führten, wobei ebenfalls keine Signifikanz festgestellt wurde. Die eigenen Beobachtungen bewegen sich dessen ungeachtet quantitativ im Rahmen der für Neuronen gemachten Beobachtungen. Die Inkubation mit 50 µg/ml Apo E resultierte bei der zitierten Arbeit in einem für Apo E4 signifikant reduzierten Cholesterol-Efflux. Allerdings erreichte der Efflux bereits bei einer Apo E-Konzentration von 25 µg/ml sein Maximum von 4,40% für Apo E4 und 5,25% für Apo E3. Der signifikante Unterschied zwischen Apo E3- und E4-Inkubation bei 50 µg/ml Apo E ist jedoch fragwürdig, weil die eingesetzte Apo E-Menge dem Zehnfachen der Konzentration im Liquor cerebrospinalis entspricht und für neuronale Zellen gezeigt wurde, dass Apo E4-Konzentrationen von >20 µg/ml einen zytotoxischen Effekt haben können (Koch *et al.*, 2001;Veinbergs *et al.*, 2002).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei den durchgeführten Experimenten ein signifikanter Cholesterol-Efflux aus den neuronalen Zellen in Gegenwart von Apo E-freien HDL beobachtet wurde. Ursache ist die Anwesenheit von Apo AI, welches zumindest in seiner lipidfreien Form ein potenterer Cholesterol-Akzeptor ist als Apo E (Hara *et al.*, 1991). Die Anreicherung dieser HDL mit Apo E3 und E4 hatte keinen zusätzlichen stimulierenden Einfluss auf den Cholesterol-Efflux, weil vermutlich bereits durch Anwesenheit des Apo AI eine maximale Exkretion von Cholesterol aus den neuronalen Zellen erreicht wurde. Hinweise hierfür geben die zitierten Ergebnisse aus der Primärkultur von Neuronen, welche gezeigt haben, dass der Cholesterol-Efflux durch Apo E3-Zugabe auf maximal 5,25% zu steigern ist.

Ein Apo E-Recycling assoziierter Cholesterol-Efflux konnte unter den experimentellen Bedingungen nicht beobachtet werden. Dies könnte in der Tatsache begründet sein, dass der Großteil des aus der Zelle mobilisierbaren Cholesterols bereits während der Ligandeninkubationsphase exkretiert wurde. In der Folge konnte es während der Postinkubationsphase (Recycling-Phase) nur noch in einem geringen Umfang zum Cholesterol-Efflux kommen. Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass die Zugabe von Apo E-freier HDL (Akzeptor) in der Postinkubationsphase zu einem deutlich geringeren Efflux führt als während der Ligandeninkubationsphase (Abb. 29B).

Um den Einfluss der HDL auf den Cholesterol-Efflux zu eliminieren, erfolgten Experimente bei denen das Apo E3 und E4 an Liposomen assoziiert wurde (Abschnitt 3.5.2.). Die Auswertung dieser Untersuchungen ergab, dass die Inkubation mit Liposomen ohne Apo E-Anreicherung zu keiner signifikanten Stimulation des Cholesterol-Efflux führt (Abb. 31A). Der „HDL-Effekt“ war also wunschgemäß nicht zu beobachten. Die erwartete Stimulation durch Assoziation von Apo E blieb jedoch auch aus. Während der Postinkubationsphase kam es zwar akzeptorinduziert (Apo E-freie HDL) zu einer deutlichen Stimulation des Cholesterol-Efflux, ein Apo E-Recycling assoziierter Efflux war jedoch auch hier nicht nachweisbar (Abb. 31B).

Da die Liposomen ein recht artifizielles Surrogat für Lipoproteine darstellen und es während der Ligandeninkubation zu keiner Apo E-vermittelten Stimulation des Cholesterol-Efflux kommt, liegt die Vermutung nahe, dass das an die Liposomen assoziierte Apo E nicht biologisch aktiv ist. Möglicherweise könnte das Apo E in einer falschen Orientierung an die Liposomen assoziieren, wodurch die Rezeptorbindung und damit Aufnahme erschwert würde. In der Folge wäre auch kein Apo E-Recycling assoziierter Cholesterol-Efflux zu beobachten, weil es während der Ligandeninkubation nicht zu einer Apo E-Aufnahme gekommen ist. Dies wurde jedoch nicht eingehender untersucht, weil die Liposomen zu stark

von den physiologischen Gegebenheiten divergieren und sich in diesem Zusammenhang als ungeeignetes experimentelles Modell erwiesen haben.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit der vorliegenden Arbeit erstmals ein isoformspezifisches Recycling von Apo E in neuronalen Zellen nachgewiesen wurde. Das reduzierte Recycling von Apo E4 in diesen Zellen könnte eine mögliche Erklärung für seine pathologischen Effekte auf neuronale Regenerations- und Reparaturprozesse sein.

Der postulierte Apo E-Recycling assoziierte Cholesterol-Efflux konnte mit dem gewählten experimentellen System nicht nachgewiesen werden.

4.4. Apo E und APP Prozessierung in HT-22-Zellen

Parallel zur Untersuchung des Apo E-Recyclings und seiner Auswirkungen auf die Cholesterohomeostase der neuronalen Zellen erfolgte die Analyse des Einflusses der Apolipoprotein E-Isoformen auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP).

Wie bereits in Abschnitt 1.6. beschrieben, spielt die proteolytische Prozessierung dieses Proteins eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung. Die Apolipoprotein E-Isoform Apo E4 ist ein genetischer Risikofaktor für diese Erkrankung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher geprüft werden, ob es einen isoformspezifischen Einfluss des Apo E auf die APP-Prozessierung gibt. Hierfür musste zunächst die Expression und Prozessierung des APP in den HT-22 Zellen analysiert werden, bevor weitergehende Untersuchungen erfolgen konnten. Die Auswertung der entsprechenden Experimente (Abb. 33) ergab, dass die verwendeten HT-22 Zellen endogen APP exprimieren und es, wie für murines APP beschrieben, überwiegend auf dem nicht-amyloiden Weg prozessieren: Zunächst wird durch die Aktivität der α -Sekretase ein membranständiges C-terminales (α -CTF) sowie ein lösliches N-terminales Fragment ($s\alpha$ APP) gebildet. Das C-terminale Fragment (α -CTF) kann anschließend durch die γ -Sekretase prozessiert werden. Die resultierende APP-Intrazellulärdomäne (AICD) und das p3-Peptid werden schnell proteolytisch abgebaut (De Strooper et al., 1995). Die spezifische Inhibierung der γ -Sekretase durch den Hemmstoff DAPT führt zur Anreicherung des α -CTF, was darauf hinweist, dass es neben der α -Sekretase-Aktivität auch eine aktive γ -Sekretase in den HT-22 Zellen gibt.

Die Untersuchung der Cholesterolsensitivität der APP-Prozessierung in den HT-22 Zellen (Abb. 34A und B) ergab, dass bereits ein leicht erhöhter intrazellulärer Cholesterolspiegel die α -Sekretase Aktivität hemmt. Dies resultiert in einer Akkumulation des reifen APP sowie in einer Reduktion der Menge an α -CTF. Diese Inhibition der α -Sekretase-Aktivität ist bereits in der Literatur beschrieben worden (Bodovitz and Klein, 1996). Die Zugabe eines γ -Sekretase-

Inhibitors (DAPT) führte ebenfalls zu einer Akkumulation des α -CTF, gleichzeitig blieb die Menge an reifem APP jedoch unverändert. Dies bestätigt die Spezifität von DAPT, welches zwar die γ -Sekretase Prozessierung des α -CTF inhibierte, die α -Sekretase Prozessierung des reifen APP jedoch nicht beeinflusste.

Nachdem die APP-Expression und -Prozessierung in den HT-22-Zellen charakterisiert worden waren, erfolgten die Untersuchungen zum Einfluss der Apo E-Isoformen auf die APP-Prozessierung.

Die Auswertung der Experimente ergab, dass es nach Inkubation mit HDL-assoziiertem Apo E3 und Apo E4 zu einer isoformspezifischen Beeinflussung der γ -Sekretase Aktivität kam (Abb 35). Im Vergleich zu Apo E3 reduzierte Apo E4 die Menge des α -CTF bei gleichzeitig unveränderten Mengen von reifem APP sowie intrazellulären Cholesterols. Daraus konnte man schließen, dass Apo E4 diesen Effekt nicht über die α -Sekretase oder den Cholesterolgehalt der Zelle vermittelt. Die beobachtete verstärkte Prozessierung des α -CTF geht daher auf eine cholesterolunabhängige Stimulation der γ -Sekretase zurück.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Isoform Apo E4 die Prozessierung der C-terminalen APP-Fragmente durch die γ -Sekretase fördert. Da die γ -Sekretase im humanen Zell-Systemen sowohl am nicht-amyloidogenen als auch amyloidogenen Weg der APP-Prozessierung beteiligt ist, führt dies unter Umständen auch zu einer verstärkten Bildung des pathogenen A β -Peptids. Der Einfluss auf die β -Sekretase konnte in diesem murinen Zellsystem nicht untersucht werden.

Wie könnte nun dieser stimulierende und cholesterolunabhängige Effekt von Apo E4 auf die Prozessierung von APP durch die γ -Sekretase vermittelt sein?

Eine mögliche Erklärung könnte die zelluläre Lokalisation der einzelnen proteolytischen Schritte der APP-Prozessierung liefern. APP gelangt nach der Synthese an die Zelloberfläche und wird rasch wieder endozytiert. In der Folge gelangt es in frühe endosomale Kompartimente, von wo aus es an die Zelloberfläche recycelt werden kann oder lysosomal degradiert wird. Die amyloidogene Prozessierung (β - und γ -Sekretase-Schnitt) erfolgt auf dem endozytotischen Weg, die Prozessierung durch die α -Sekretase dagegen überwiegend an der Plasmamembran (Vetrivel and Thinakaran, 2006).

Es ist denkbar, dass Apo E und APP nach ihrer Endozytose in frühen endosomalen Kompartimenten kolokalisieren und beide Proteine zusammen einen ähnlichen Recyclingweg einschlagen. Das reduzierte Apo E4-Recycling könnte dann dazu führen, dass das APP mit Apo E4 intrazellulär retardiert wird und damit leichter für die Prozessierung durch die γ -Sekretase zugänglich ist. In der Folge entstünde auch mehr pathogenes A β .

Konkrete Indizien für diese Hypothese liefert auch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit (Ye et al., 2005). Im Rahmen der zitierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Apo E4-

Inkubation von APP überexprimierenden Zellen aus der Ratte im Vergleich zu Apo E3 zu einer verstärkten A β Produktion führte. Analog zu der eigenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass dabei die Aktivität der α -Sekretase unbeeinflusst blieb. Auch die β -Sekretase wies keine gesteigerte Aktivität auf. Gleichzeitig konnte analog zur eigenen Arbeit während der Inkubation der Zellen mit schwach lipidiertem Apo E3 und Apo E4 keine Veränderung des intrazellulären Cholesterolspiegels beobachtet werden. Weiter wurde gezeigt, dass für den Apo E4-Effekt eine Aufnahme des Apo E notwendig ist und dass LRP1 eine wichtige Rolle bei der Vermittlung dieses Effektes spielt. Von anderen Arbeitsgruppen wurde zudem beschrieben, dass APP mittels eines intrazellulären Adapterproteines (FE65) mit LRP1 interagieren kann (Trommsdorff et al., 1998; Pietrzik et al., 2004).

Verknüpft man diese zitierten Beobachtungen mit den Beobachtungen dieser Arbeit zum Apo E-Recycling, so kann man postulieren, dass APP an der Zelloberfläche über das Adapterprotein FE65 mit Apo E/LRP1-Komplexen interagieren kann und nach gemeinsamer Endozytose zunächst in frühe endosomale Kompartimente gelangt. Das reduzierte Recycling von Apo E4 im Vergleich zu Apo E3 könnte dann dazu führen, dass ebenfalls weniger APP recycelt werden kann. Denkbar ist, dass aufgrund der speziellen physikochemischen Eigenschaften von Apo E4 (vergl. Abschnitt 1.3.) die Apo E4/LRP1/APP-Komplexe schlechter dissoziieren können als die Apo E3/LRP1/APP-Komplexe, was möglicherweise in einer verstärkten endosomalen Retardierung von Apo E4, LRP1 und APP resultiert. Auf diese Weise wird APP leichter für die γ -Sekretase zugänglich und dies resultiert unter anderem in einer verstärkten Bildung von A β . Da das Apo E4-Recycling lediglich vermindert und nicht vollständig inhibiert ist, führt es latent zu einer leicht verstärkten Bildung von pathogenen A β . Erst im Alter und zusammen mit anderen neurodegenerativen Faktoren kommt es dann zur Ausprägung der Alzheimer Erkrankung. Dieses Modell könnte daher die Rolle von Apo E4 als Risikofaktor für die Alzheimer Erkrankung erklären.

Weitere Untersuchungen zur intrazellulären Kolo-kalisation von Apo E3, Apo E4, LRP1 und APP müssen erfolgen, um diese Hypothese zu bestätigen.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aufnahme und das Recycling der Apolipoprotein E-Isoformen sowie der Einfluss dieses Vorgangs auf den intrazellulären Cholesterolspiegel und die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) in neuronalen Zellen untersucht.

Hierfür wurde zunächst ein neuronales Zellsystem selektiert und charakterisiert sowie geeignete Modell-Liganden isoliert.

Die Untersuchung verschiedener neuronaler Zell-Linien im Hinblick auf das Vorhandensein von neuronal exprimierten Lipoproteinrezeptoren resultierte in der Auswahl der murinen neuronalen Zell-Linie HT-22, welche über die entsprechenden Rezeptoren verfügte. Wegen der limitierten biologischen Verfügbarkeit von Lipoproteinen aus dem Liquor cerebrospinalis (CSF-Lp) erfolgte alternativ eine Präparation von High-Density-Lipoproteinen (HDL) aus humanem Plasma. Die bio- und proteinchemische Charakterisierung der isolierten HDL bestätigte die in der Literatur beschriebene große Ähnlichkeit dieser Partikel zu den Lipoproteinen des Liquor cerebrospinalis. Untersuchungen zur Anreicherung der isolierten HDL mit den verschiedenen Apo E-Isoformen ergaben, dass die HDL geeignete Vehikel für Apo E3 und Apo E4 darstellten.

Die Auswertung der zellbiologischen Experimente zum Einfluss dieser beiden Isoformen auf den Lipidstoffwechsel der HT-22 Zellen führte zu folgenden Ergebnissen:

Apo E4 wird im Vergleich zu Apo E3 in verstärktem Umfang auf der Zelloberfläche gebunden. Gleichzeitig ist die Menge des intrazellulär nachweisbaren Apo E4 erhöht. Sowohl Apo E3 als auch Apo E4 werden in Pulse-Chase-Experimenten nach erfolgter Aufnahme retroendozytiert. Dieses Recycling ist jedoch für Apo E4 vermindert. Weder das Apo E3- noch das Apo E4-Recycling war unter den gewählten experimentellen Bedingungen mit einem Cholesterol-Efflux aus den HT-22 Zellen assoziiert. Zudem war im Vergleich zu Apo E3 keine Erhöhung des intrazellulären Cholesterolspiegels nach Apo E4-Inkubation in den Pulse-Chase-Experimenten nachweisbar.

Die Inkubation der Zellen mit Apo E4 führte im Vergleich zu Apo E3 jedoch zu einer verstärkten Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) durch die γ -Sekretase. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass Apo E4 seinen pathogenen Effekt bei der Alzheimer Erkrankung nicht notwendigerweise ausschließlich über die Dysregulation der neuronalen Cholesterolhomeostase vermittelt. Weitere Untersuchungen müssen jedoch erfolgen, um den genauen Mechanismus dieser Beeinflussung aufzuklären.

Abbildungsverzeichnis

Abb. Nr.	Titel	Seite
Abb 1	Cholesterolhomeostase des Gehirns	9
Abb 2	Aufbau eines Lipoproteins	10
Abb 3	HDL-Metabolismus im Plasma	13
Abb 4	Gegenüberstellung der Plasma- und Liquor-Lipoproteine	14
Abb 5	Primär und Sekundärstruktur des Apolipoprotein E	19
Abb 6	Schematische Darstellung der erweiterten LDL-Rezeptorfamilie der Säugetiere	22
Abb 7	Strukturmodell von SR-BI	28
Abb 8	Modell des Apo E-Recyclings	30
Abb 9	Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP)	35
Abb 10	Lichtmikroskopische und immunhistochemische Untersuchung der verschiedenen neuronalen Zell-Linien	69
Abb 11	Analyse des Lipoprotein-Rezeptorbesatzes der neuronalen Zell-Linien	71
Abb 12	Immunhistochemische Untersuchung der HT-22 Zellen bezüglich der intrazellulären Distribution und Funktionalität der Lipoproteinrezeptoren	73
Abb 13	Expression neuronaler Markerproteine in HT-22 Zellen	74
Abb 14	Schematische Darstellung der Präparation der Modell-Liganden	76
Abb 15	Separation der Lipoproteinklassen aus humanem Plasma	77
Abb 16	Gelfiltrationschromatographie-Profil (FPLC-Profil) der präparierten Gesamt-HDL	78
Abb 17	Überprüfung der Affinitätschromatographische Auftrennung der präparierten Gesamt-HDL	81
Abb 18	Untersuchung der radioaktiven Liganden	82
Abb 19	Gelfiltrationschromatographie-Profil der markierten Liganden	83
Abb 20	Schematischer Ablauf der Versuche zur Untersuchung der Apo E-Aufnahme	85
Abb 21	Immunhistochemische Untersuchung der Apo E-Aufnahme	86
Abb 22	Bindung von Apo E3 und E4 an HT22-Zellen	88
Abb 23	Aufnahme von Apo E3 und E4 in HT22-Zellen	89
Abb 24	Schematischer Ablauf der Versuche zur Untersuchung des Apo E-Recyclings	90
Abb 25	Recycling von Apo E3 und E4 in HT22-Zellen (radiochemische Untersuchung)	91
Abb 26	Recycling von Apo E3 und E4 in HT22-Zellen (Immunoblot)	92
Abb 27	Recycling von Apo E3 und E4 in HT22-Zellen (Apo E-ELISA)	93
Abb 28	Schematischer Ablauf der Experimente zum Cholesterol-Efflux	94

Abb 29	Cholesterol-Efflux während und nach Inkubation mit HDL-assoziiertem Apo E	95
Abb 30	Relativer Cholesterol-Efflux während der Ligandeninkubationsphase	96
Abb 31	Cholesterol-Efflux während und nach Inkubation mit Liposomen-assoziiertem Apo E	98
Abb 32	Schematischer Ablauf der Versuche zur Untersuchung der APP-Prozessierung in HT22-Zellen	100
Abb 33	APP-Expression und Prozessierung in HT22-Zellen	101
Abb 34	Cholesterolsensitivität der APP-Prozessierung in HT-22 Zellen	103
Abb 35	Einfluss von Apo E3 und Apo E4 auf die APP-Prozessierung	105
Tab. 1	Gegenüberstellung der Biochemische Parameter der Plasma- und Liquor-Lipoproteine	15
Tab. 2	Lipid- und Apolipoproteinkonzentration im humanen Plasma und Liquor cerebrospinalis	16
Tab. 3	Häufigkeit der Apo E-Phänotypen in der Normalbevölkerung	18
Tab. 4	Lipidzusammensetzung der präparierten Gesamt-HDL	79

1. Abildayeva, K. *et al.* 24(S)-Hydroxycholesterol participates in a Liver X Receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates Apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* (2006).
2. Aggerbeck, L.P., Wetterau, J.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. & Agard, D.A. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the amino-terminal (receptor-binding) domain of human apolipoprotein E3 from serum very low density lipoproteins. *J. Mol. Biol.* **202**, 179-181 (1988).
3. Albers, J.J., Tollefson, J.H., Wolfbauer, G. & Albright, R.E., Jr. Cholesteryl ester transfer protein in human brain. *Int. J. Clin. Lab Res.* **21**, 264-266 (1992).
4. Andersen, O.M. *et al.* Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11. *Biochemistry* **45**, 2618-2628 (2006).
5. Assemat, E. *et al.* Overlapping expression patterns of the multiligand endocytic receptors cubilin and megalin in the CNS, sensory organs and developing epithelia of the rodent embryo. *Gene Expr. Patterns.* **6**, 69-78 (2005).
6. Bauer, H. Problem of the identity of cerebrospinal fluid proteins with protein bodies in blood serum. I. Peculiarities of cerebrospinal fluid proteins in regard to fore-fraction, gamma-globulin and protein-bound lipids.]. *Dtsch. Z. Nervenheilkd.* **175**, 354-377 (1956).
7. Beffert, U., Stolt, P.C. & Herz, J. Functions of lipoprotein receptors in neurons. *J. Lipid Res.* **45**, 403-409 (2004).
8. Beisiegel U. Structure and Function of Apolipoproteins. Rosseneu M. (ed.), pp. 269-294 (CRC Press, Boca Raton, 1992).
9. Beisiegel, U. *et al.* Apolipoprotein E-binding proteins isolated from dog and human liver. *Arteriosclerosis* **8**, 288-297 (1988).
10. Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. & Stanley, K.K. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* **341**, 162-164 (1989).
11. Beisiegel, U., Weber, W. & Bengtsson-Olivecrona, G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 8342-8346 (1991).
12. Beisiegel, U. Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **6**, 117-122 (1995).
13. Beisiegel, U. & Heeren, J. Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *Proc. Nutr. Soc.* **56**, 731-737 (1997).
14. Beisiegel, U. & Spector, A.A. Lipids and lipoproteins in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 243-244 (2001).
15. Bjorkhem, I. *et al.* Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J. Lipid Res.* **39**, 1594-1600 (1998).
16. Bjorkhem, I., Diczfalusy, U. & Lutjohann, D. Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms. *Curr. Opin. Lipidol.* **10**, 161-165 (1999).

17. Bjorkhem, I., Meaney, S. & Diczfalusy, U. Oxysterols in human circulation: which role do they have? *Curr. Opin. Lipidol.* **13**, 247-253 (2002).
18. Bjorkhem, I. & Meaney, S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 806-815 (2004).
19. Bodovitz, S. & Klein, W.L. Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 4436-4440 (1996).
20. Bohm, C. *et al.* SorLA signaling by regulated intramembrane proteolysis. *J. Biol. Chem.* (2006).
21. Boschert, U., Merlo-Pich, E., Higgins, G., Roses, A.D. & Catsicas, S. Apolipoprotein E expression by neurons surviving excitotoxic stress. *Neurobiol. Dis.* **6**, 508-514 (1999).
22. Boyles, J.K., Pitas, R.E., Wilson, E., Mahley, R.W. & Taylor, J.M. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J. Clin. Invest* **76**, 1501-1513 (1985).
23. Boyles, J.K. *et al.* A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J. Clin. Invest* **83**, 1015-1031 (1989).
24. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47 (1986).
25. Cam, J.A. *et al.* The low density lipoprotein receptor-related protein 1B retains beta-amyloid precursor protein at the cell surface and reduces amyloid-beta peptide production. *J. Biol. Chem.* **279**, 29639-29646 (2004).
26. Chobanian, A.V. & Hollander, W. Body cholesterol metabolism in man. I. The equilibration of serum and tissue cholesterol. *J. Clin. Invest* **41**, 1732-1737 (1962).
27. Chou, C.Y., Jen, W.P., Hsieh, Y.H., Shiao, M.S. & Chang, G.G. Structural and functional variations in human apolipoprotein e3 and e4. *J. Biol. Chem.* **281**, 13333-13344 (2006).
28. Connelly, M.A., Klein, S.M., Azhar, S., Abumrad, N.A. & Williams, D.L. Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J. Biol. Chem.* **274**, 41-47 (1999).
29. Corder, E.H. *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-923 (1993).
30. Danik, M., Champagne, D., Petit-Turcotte, C., Beffert, U. & Poirier, J. Brain lipoprotein metabolism and its relation to neurodegenerative disease. *Crit Rev. Neurobiol.* **13**, 357-407 (1999).
31. Dargel R. Biochemie und Pathobiochemie der Lipoproteine. Akademie Verlag, Berlin (1991).
32. Davignon, J., Gregg, R.E. & Sing, C.F. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* **8**, 1-21 (1988).

33. Davis,W.E., Gerstl,B., Orth,D.L. & SmithTH,J.K. Lipoprotein patterns of spinal fluid obtained by paper electrophoresis. *AMA. Arch. Neurol. Psychiatry* **76**, 608-613 (1956).
34. de Knijff,P. *et al.* Familial dysbetalipoproteinemia associated with apolipoprotein E3-Leiden in an extended multigeneration pedigree. *J. Clin. Invest* **88**, 643-655 (1991).
35. de Knijff,P., Van den Maagdenberg,A.M., Frants,R.R. & Havekes,L.M. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Hum. Mutat.* **4**, 178-194 (1994).
36. De Strooper,B. *et al.* Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. *EMBO J.* **14**, 4932-4938 (1995).
37. Deecher,D.C., Daoud,P., Bhat,R.A. & O'Connor,L.T. Endogenously expressed estrogen receptors mediate neuroprotection in hippocampal cells (HT22). *J. Cell Biochem.* **95**, 302-312 (2005).
38. Dekroon,R.M. & Armati,P.J. Synthesis and processing of apolipoprotein E in human brain cultures. *Glia* **33**, 298-305 (2001).
39. Dekroon,R.M. & Armati,P.J. The endosomal trafficking of apolipoprotein E3 and E4 in cultured human brain neurons and astrocytes. *Neurobiol. Dis.* **8**, 78-89 (2001).
40. DeMattos,R.B. *et al.* Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containing lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice. *Neurochem. Int.* **39**, 415-425 (2001).
41. DeMattos,R.B., Rudel,L.L. & Williams,D.L. Biochemical analysis of cell-derived apoE3 particles active in stimulating neurite outgrowth. *J. Lipid Res.* **42**, 976-987 (2001).
42. DeMattos,R.B. *et al.* Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 10843-10848 (2002).
43. DeMattos,R.B. *et al.* ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron* **41**, 193-202 (2004).
44. Dencker,S.J. & Swahn,B. The diagnostic value of lipoprotein determinations in cerebrospinal fluid. *Acta Psychiatr. Scand.* **36**, 325-336 (1961).
45. Dietschy,J.M. & Turley,S.D. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 105-112 (2001).
46. Dietschy,J.M. & Turley,S.D. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* **45**, 1375-1397 (2004).
47. Dong,L.M. & Weisgraber,K.H. Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 19053-19057 (1996).

48. Edmond, J., Korsak, R.A., Morrow, J.W., Torok-Both, G. & Catlin, D.H. Dietary cholesterol and the origin of cholesterol in the brain of developing rats. *J. Nutr.* **121**, 1323-1330 (1991).
49. Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. & Simons, K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* **160**, 113-123 (2003).
50. Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivecrona, T. & Vlodavsky, I. Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J. Clin. Invest.* **90**, 2013-2021 (1992).
51. Elshourbagy, N.A. *et al.* Expression of rat apolipoprotein A-IV and A-I genes: mRNA induction during development and in response to glucocorticoids and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 8242-8246 (1985).
52. Elshourbagy, N.A., Liao, W.S., Mahley, R.W. & Taylor, J.M. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 203-207 (1985).
53. Fagan, A.M., Bu, G., Sun, Y., Daugherty, A. & Holtzman, D.M. Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 30121-30125 (1996).
54. Fagan, A.M. & Holtzman, D.M. Astrocyte lipoproteins, effects of apoE on neuronal function, and role of apoE in amyloid-beta deposition in vivo. *Microsc. Res. Tech.* **50**, 297-304 (2000).
55. Fazio, S., Linton, M.F., Hasty, A.H. & Swift, L.L. Recycling of apolipoprotein E in mouse liver. *J. Biol. Chem.* **274**, 8247-8253 (1999).
56. Fielding, C.J. & Fielding, P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **36**, 211-228 (1995).
57. Fielding, P.E., Ishikawa, Y. & Fielding, C.J. Apolipoprotein E mediates binding of normal very low density lipoprotein to heparin but is not required for high affinity receptor binding. *J. Biol. Chem.* **264**, 12462-12466 (1989).
58. Fisher, C., Beglova, N. & Blacklow, S.C. Structure of an LDLR-RAP complex reveals a general mode for ligand recognition by lipoprotein receptors. *Mol. Cell* **22**, 277-283 (2006).
59. Fujii, H. *et al.* Immunohistochemical localization and mRNA expression of apolipoprotein A-I in rat spinal cord. *J. Atheroscler. Thromb.* **9**, 93-98 (2002).
60. Fukumoto, H., Deng, A., Irizarry, M.C., Fitzgerald, M.L. & Rebeck, G.W. Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted Abeta levels. *J. Biol. Chem.* **277**, 48508-48513 (2002).
61. Ginsberg, H.N. Synthesis and secretion of apolipoprotein B from cultured liver cells. *Curr. Opin. Lipidol.* **6**, 275-280 (1995).

62. Gong, J.S. *et al.* Apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human ApoE3 and ApoE4 knock-in mice. *J. Biol. Chem.* **277**, 29919-29926 (2002).
63. Goritz, C., Mauch, D.H. & Pfrieger, F.W. Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol. Cell Neurosci.* **29**, 190-201 (2005).
64. Gotto, A.M., Jr., Pownall, H.J. & Havel, R.J. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.* **128**, 3-41 (1986).
65. Griffin, B.A. & Packard, C.J. Metabolism of VLDL and LDL subclasses. *Curr. Opin. Lipidol.* **5**, 200-206 (1994).
66. Grimm, M.O. *et al.* Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1118-1123 (2005).
67. Guyton, J.R. *et al.* Novel large apolipoprotein E-containing lipoproteins of density 1.006-1.060 g/ml in human cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* **70**, 1235-1240 (1998).
68. Hara, H. & Yokoyama, S. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J. Biol. Chem.* **266**, 3080-3086 (1991).
69. Hasty, A.H. *et al.* The recycling of apolipoprotein E in macrophages: influence of HDL and apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* **46**, 1433-1439 (2005).
70. Havel, R.J., Eder, H.A. & Bragdon, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**, 1345-1353 (1955).
71. Havel, R.J., Chao, Y., Windler, E.E., Kotite, L. & Guo, L.S. Isoprotein specificity in the hepatic uptake of apolipoprotein E and the pathogenesis of familial dysbetalipoproteinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 4349-4353 (1980).
72. Havel, R.J. & Hamilton, R.L. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology* **8**, 1689-1704 (1988).
73. Havel, R.J. & Rapaport, E. Management of primary hyperlipidemia. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1491-1498 (1995).
74. Hayashi, H., Campenot, R.B., Vance, D.E. & Vance, J.E. Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *J. Biol. Chem.* **279**, 14009-14015 (2004).
75. Heeren, J. *et al.* Nonphysiological overexpression of low-density lipoprotein receptors causes pathological intracellular lipid accumulation and the formation of cholesterol and cholesteryl ester crystals in vitro. *J. Mol. Med.* **77**, 735-743 (1999).
76. Heeren, J., Weber, W. & Beisiegel, U. Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 3)**, 349-359 (1999).
77. Heeren, J., Grewal, T., Jackle, S. & Beisiegel, U. Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 42333-42338 (2001).

78. Heeren,J. & Beisiegel,U. Intracellular metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 255-260 (2001).
79. Heeren,J., Niemeier,A., Merkel,M. & Beisiegel,U. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J. Mol. Med.* **80**, 576-584 (2002).
80. Heeren,J. *et al.* Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J. Biol. Chem.* **278** , 14370-14378 (2003).
81. Heeren,J. *et al.* Impaired recycling of apolipoprotein E4 is associated with intracellular cholesterol accumulation. *J. Biol. Chem.* **279**, 55483-55492 (2004).
82. Heeren,J., Beisiegel,U. & Grewal,T. Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 442-448 (2006).
83. Herz,J., Clouthier,D.E. & Hammer,R.E. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* **71**, 411-421 (1992).
84. Herz,J., Couthier,D.E. & Hammer,R.E. Correction: LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* **73**, 428 (1993).
85. Herz,J. & Beffert,U. Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 51-58 (2000).
86. Herz,J. & Bock,H.H. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 405-434 (2002).
87. Herz,J. LRP: a bright beacon at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest* **112**, 1483-1485 (2003).
88. Hirsch-Reinshagen,V. *et al.* Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain. *J. Biol. Chem.* **279**, 41197-41207 (2004).
89. Hirsch-Reinshagen,V. *et al.* The absence of ABCA1 decreases soluble ApoE levels but does not diminish amyloid deposition in two murine models of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **280**, 43243-43256 (2005).
90. Ho,A. & Sudhof,T.C. Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 2548-2553 (2004).
91. Hoe,H.S. *et al.* F-spondin interaction with the apolipoprotein E receptor ApoEr2 affects processing of amyloid precursor protein. *Mol. Cell Biol.* **25**, 9259-9268 (2005).
92. Holtzman,D.M. *et al.* Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 9480-9484 (1995).
93. Husemann,J., Loike,J.D., Kodama,T. & Silverstein,S.C. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) mediates adhesion of neonatal murine microglia to fibrillar beta-amyloid. *J. Neuroimmunol.* **114**, 142-150 (2001).

94. Husemann, J. & Silverstein, S.C. Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain. *Am. J. Pathol.* **158**, 825-832 (2001).
95. Husemann, J., Loike, J.D., Anankov, R., Febbraio, M. & Silverstein, S.C. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* **40**, 195-205 (2002).
96. Hussain, M.M. *et al.* Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1300**, 151-170 (1996).
97. Ishida, B.Y., Albee, D. & Paigen, B. Interconversion of prebeta-migrating lipoproteins containing apolipoprotein A-I and HDL. *J. Lipid Res.* **31**, 227-236 (1990).
98. Ji, Y. *et al.* Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J. Biol. Chem.* **274**, 33398-33402 (1999).
99. Ji, Z.S., Pitas, R.E. & Mahley, R.W. Differential cellular accumulation/retention of apolipoprotein E mediated by cell surface heparan sulfate proteoglycans. Apolipoproteins E3 and E2 greater than e4. *J. Biol. Chem.* **273**, 13452-13460 (1998).
100. Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S. & Drachman, D.A. Statins and the risk of dementia. *Lancet* **356**, 1627-1631 (2000).
101. Johnson, E.B., Hammer, R.E. & Herz, J. Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in *Megf7*-deficient mice. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3523-3538 (2005).
102. Jung, T., Engels, M., Kaiser, B., Poppek, D. & Grune, T. Intracellular distribution of oxidized proteins and proteasome in HT22 cells during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1303-1312 (2006).
103. Jurevics, H. & Morell, P. Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J. Neurochem.* **64**, 895-901 (1995).
104. Karten, B., Campenot, R.B., Vance, D.E. & Vance, J.E. Expression of ABCG1, but not ABCA1, correlates with cholesterol release by cerebellar astroglia. *J. Biol. Chem.* **281**, 4049-4057 (2006).
105. Koch, S. *et al.* Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. *J. Lipid Res.* **42**, 1143-1151 (2001).
106. Kounnas, M.Z. *et al.* The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes *Pseudomonas* exotoxin A. *J. Biol. Chem.* **267**, 12420-12423 (1992).
107. Kounnas, M.Z. *et al.* An overview of the structure and function of glycoprotein 330, a receptor related to the alpha 2-macroglobulin receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **737**, 114-123 (1994).
108. Kounnas, M.Z., Haudenschild, C.C., Strickland, D.K. & Argraves, W.S. Immunological localization of glycoprotein 330, low density lipoprotein receptor related protein and 39 kDa receptor associated protein in embryonic mouse tissues. *In Vivo* **8**, 343-351 (1994).

109. Kounnas,M.Z. *et al.* LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* **82**, 331-340 (1995).
110. Kowal,R.C., Herz,J., Goldstein,J.L., Esser,V. & Brown,M.S. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 5810-5814 (1989).
111. Krieger,M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J. Clin. Invest* **108**, 793-797 (2001).
112. Kunitake,S.T., Mendel,C.M. & Hennessy,L.K. Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. *J. Lipid Res.* **33**, 1807-1816 (1992).
113. LaDu,M.J. *et al.* Nascent astrocyte particles differ from lipoproteins in CSF. *J. Neurochem.* **70**, 2070-2081 (1998).
114. LaDu,M.J. *et al.* Lipoproteins in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **903**, 167-175 (2000).
115. Lauer,S.J. *et al.* Two copies of the human apolipoprotein C-I gene are linked closely to the apolipoprotein E gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 7277-7286 (1988).
116. Lautenschlager,N., Kurz,A. & Muller,U. [Inheritable causes and risk factors of Alzheimer's disease]. *Nervenarzt* **70**, 195-205 (1999).
117. Linton,M.F. *et al.* Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. *J. Clin. Invest* **88**, 270-281 (1991).
118. Liu,C.X., Musco,S., Lisitsina,N.M., Yaklichkin,S.Y. & Lisitsyn,N.A. Genomic organization of a new candidate tumor suppressor gene, LRP1B. *Genomics* **69**, 271-274 (2000).
119. Liu,C.X., Li,Y., Obermoeller-McCormick,L.M., Schwartz,A.L. & Bu,G. The putative tumor suppressor LRP1B, a novel member of the low density lipoprotein (LDL) receptor family, exhibits both overlapping and distinct properties with the LDL receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 28889-28896 (2001).
120. Lleo,A. *et al.* Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) interacts with presenilin 1 and is a competitive substrate of the amyloid precursor protein (APP) for gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* **280**, 27303-27309 (2005).
121. Llera-Moya,M. *et al.* Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J. Lipid Res.* **40**, 575-580 (1999).
122. Lombardi,P., Mulder,M., van der,B.H., Frants,R.R. & Havekes,L.M. Inefficient degradation of triglyceride-rich lipoprotein by HepG2 cells is due to a retarded transport to the lysosomal compartment. *J. Biol. Chem.* **268**, 26113-26119 (1993).
123. Lund,E.G., Guileyardo,J.M. & Russell,D.W. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 7238-7243 (1999).

124. Maher,P. & Davis,J.B. The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *J. Neurosci.* **16**, 6394-6401 (1996).
125. Mahley,R.W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **240**, 622-630 (1988).
126. Mahley,R.W. Heparan sulfate proteoglycan/low density lipoprotein receptor-related protein pathway involved in type III hyperlipoproteinemia and Alzheimer's disease. *Isr. J. Med. Sci.* **32**, 414-429 (1996).
127. Mahley,R.W., Nathan,B.P. & Pitas,R.E. Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **777**, 139-145 (1996).
128. Mahley,R.W. & Ji,Z.S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* **40**, 1-16 (1999).
129. Mahley,R.W., Huang,Y. & Weisgraber,K.H. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *J. Clin. Invest* **116**, 1226-1229 (2006).
130. Mahley,R.W., Weisgraber,K.H. & Huang,Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 5644-5651 (2006).
131. Marschang,P. *et al.* Normal development and fertility of knockout mice lacking the tumor suppressor gene LRP1b suggest functional compensation by LRP1. *Mol. Cell Biol.* **24**, 3782-3793 (2004).
132. Marz,W. *et al.* Apolipoprotein E polymorphism is associated with both senile plaque load and Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **777**, 276-280 (1996).
133. Matsunaga,A. *et al.* Population frequency of apolipoprotein E5 (Glu3-->Lys) and E7 (Glu244-->Lys, Glu245-->Lys) variants in western Japan. *Clin. Genet.* **48**, 93-99 (1995).
134. Mauch,D.H. *et al.* CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **294**, 1354-1357 (2001).
135. May,P., Bock,H.H., Nimpf,J. & Herz,J. Differential glycosylation regulates processing of lipoprotein receptors by gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* **278**, 37386-37392 (2003).
136. Merkel,M., Eckel,R.H. & Goldberg,I.J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* **43**, 1997-2006 (2002).
137. Michikawa,M., Fan,Q.W., Isobe,I. & Yanagisawa,K. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J. Neurochem.* **74**, 1008-1016 (2000).
138. Mies,H.J. [Inspissation of cerebrospinal fluid in preparation for paper electrophoresis; a simple and protective procedure.]. *Klin. Wochenschr.* **31**, 159-161 (1953).
139. Mockel,B. *et al.* Expression of apolipoprotein A-I in porcine brain endothelium in vitro. *J. Neurochem.* **62**, 788-798 (1994).

140. Moestrup, S.K. & Kozyraki, R. Cubilin, a high-density lipoprotein receptor. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**, 133-140 (2000).
141. Morales, C.R., Igdoura, S.A., Wosu, U.A., Boman, J. & Argraves, W.S. Low density lipoprotein receptor-related protein-2 expression in efferent duct and epididymal epithelia: evidence in rats for its in vivo role in endocytosis of apolipoprotein J/clusterin. *Biol. Reprod.* **55**, 676-683 (1996).
142. Morimoto, B.H. & Koshland, D.E., Jr. Excitatory amino acid uptake and N-methyl-D-aspartate-mediated secretion in a neural cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 3518-3521 (1990).
143. Muse, E.D., Jurevics, H., Toews, A.D., Matsushima, G.K. & Morell, P. Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain. *J. Neurochem.* **76**, 77-86 (2001).
144. Nunan, J. & Small, D.H. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* **483**, 6-10 (2000).
145. Offe, K. *et al.* The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J. Neurosci.* **26**, 1596-1603 (2006).
146. Olivecrona, T., Liu, G., Hultin, M. & Bengtsson-Olivecrona, G. Regulation of lipoprotein lipase. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 509-513 (1993).
147. Olmsted, J.B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F. & Rosenbaum, J. Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **65**, 129-136 (1970).
148. Paik, Y.K. *et al.* Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 3445-3449 (1985).
149. Panzenboeck, U. *et al.* ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an in vitro blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 42781-42789 (2002).
150. Pfrieger, F.W. Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays* **25**, 72-78 (2003).
151. Pfrieger, F.W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 1158-1171 (2003).
152. Pieters, M.N. *et al.* Selective uptake of cholesteryl esters from apolipoprotein-E-free high-density lipoproteins by rat parenchymal cells in vivo is efficiently coupled to bile acid synthesis. *Biochem. J.* **280 (Pt 2)**, 359-365 (1991).
153. Pietrzik, C.U. *et al.* FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* **24**, 4259-4265 (2004).
154. Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Hui, D. & Weisgraber, K.H. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J. Biol. Chem.* **262**, 14352-14360 (1987).

155. Pitas,R.E., Boyles,J.K., Lee,S.H., Foss,D. & Mahley,R.W. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* **917**, 148-161 (1987).
156. Poirier,J. *et al.* Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* **342**, 697-699 (1993).
157. Poirier,J. Apolipoprotein E in the brain and its role in Alzheimer's disease. *J. Psychiatry Neurosci.* **21**, 128-134 (1996).
158. Posse De Chaves,E.I., Vance,D.E., Campenot,R.B., Kiss,R.S. & Vance,J.E. Uptake of lipoproteins for axonal growth of sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* **275**, 19883-19890 (2000).
159. Presley,J.F., Mayor,S., McGraw,T.E., Dunn,K.W. & Maxfield,F.R. Bafilomycin A1 treatment retards transferrin receptor recycling more than bulk membrane recycling. *J. Biol. Chem.* **272**, 13929-13936 (1997).
160. Raffai,R.L. & Weisgraber,K.H. Cholesterol: from heart attacks to Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* **44**, 1423-1430 (2003).
161. Rebeck,G.W., Reiter,J.S., Strickland,D.K. & Hyman,B.T. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* **11**, 575-580 (1993).
162. Rensen,P.C. *et al.* Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 8564-8571 (2000).
163. Roses,A.D. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* **47**, 387-400 (1996).
164. Saito,M., Benson,E.P., Saito,M. & Rosenberg,A. Metabolism of cholesterol and triacylglycerol in cultured chick neuronal cells, glial cells, and fibroblasts: accumulation of esterified cholesterol in serum-free culture. *J. Neurosci. Res.* **18**, 319-325 (1987).
165. Saunders,A.M. *et al.* Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1467-1472 (1993).
166. Schaefer,E.J. *et al.* Familial apolipoprotein E deficiency. *J. Clin. Invest* **78**, 1206-1219 (1986).
167. Schafer,M., Goodenough,S., Moosmann,B. & Behl,C. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta is involved in the resistance to oxidative stress in neuronal HT22 cells. *Brain Res.* **1005**, 84-89 (2004).
168. Schneider,J.A., Gearing,M., Robbins,R.S., de l'Aune,W. & Mirra,S.S. Apolipoprotein E genotype in diverse neurodegenerative disorders. *Ann. Neurol.* **38**, 131-135 (1995).
169. Schwandt P.,R.W.O. Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, New York (1995).
170. Schwiegelshohn,B. *et al.* Effects of apoprotein E on intracellular metabolism of model triglyceride-rich particles are distinct from effects on cell particle uptake. *J. Biol. Chem.* **270**, 1761-1769 (1995).

171. Seeger,R.C., Danon,Y.L., Rayner,S.A. & Hoover,F. Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody. *J. Immunol.* **128**, 983-989 (1982).
172. Sehayek,E. *et al.* Heparan sulfate-dependent and low density lipoprotein receptor-related protein-dependent catabolic pathways for lipoprotein lipase in mouse embryonic fibroblasts. *Isr. J. Med. Sci.* **32**, 449-454 (1996).
173. Shanmugaratnam,J. *et al.* Retinal Muller glia secrete apolipoproteins E and J which are efficiently assembled into lipoprotein particles. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **50**, 113-120 (1997).
174. Shore,V.G. & Shore,B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* **12**, 502-507 (1973).
175. Simons,M. *et al.* Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 6460-6464 (1998).
176. Snipes,G.J. & Suter,U. Cholesterol and myelin. *Subcell. Biochem.* **28**, 173-204 (1997).
177. Suo,Z., Wu,M., Citron,B.A., Palazzo,R.E. & Festoff,B.W. Rapid tau aggregation and delayed hippocampal neuronal death induced by persistent thrombin signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 37681-37689 (2003).
178. Swarnakar,S., Temel,R.E., Connelly,M.A., Azhar,S. & Williams,D.L. Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. *J. Biol. Chem.* **274**, 29733-29739 (1999).
179. Swift,L.L. *et al.* A recycling pathway for resecretion of internalized apolipoprotein E in liver cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 22965-22970 (2001).
180. Thelen,K.M. *et al.* Brain cholesterol synthesis in mice is affected by high dose of simvastatin but not of pravastatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**, 1146-1152 (2006).
181. Trommsdorff,M., Borg,J.P., Margolis,B. & Herz,J. Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 33556-33560 (1998).
182. van Leyen,K., Siddiq,A., Ratan,R.R. & Lo,E.H. Proteasome inhibition protects HT22 neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J. Neurochem.* **92**, 824-830 (2005).
183. Vance,J.E., Hayashi,H. & Karten,B. Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 193-212 (2005).
184. Veinbergs,I., Everson,A., Sagara,Y. & Masliah,E. Neurotoxic effects of apolipoprotein E4 are mediated via dysregulation of calcium homeostasis. *J. Neurosci. Res.* **67**, 379-387 (2002).
185. Veniant,M.M. *et al.* Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice. *J. Clin. Invest* **102**, 1559-1568 (1998).
186. Verroust,P.J. & Christensen,E.I. Megalin and cubilin--the story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrol. Dial. Transplant.* **17**, 1867-1871 (2002).

187. Vetrivel, K.S. & Thinakaran, G. Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* **66**, S69-S73 (2006).
188. von Eckardstein, A., Nofer, J.R. & Assmann, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 13-27 (2001).
189. von Eckardstein, A., Hersberger, M. & Rohrer, L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* **8**, 147-152 (2005).
190. Wahrle, S. *et al.* Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol. Dis.* **9**, 11-23 (2002).
191. Wang, L. *et al.* Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 13878-13883 (2002).
192. Wardell, M.R., Brennan, S.O., Janus, E.D., Fraser, R. & Carrell, R.W. Apolipoprotein E2-Christchurch (136 Arg---Ser). New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Invest* **80**, 483-490 (1987).
193. Warshawsky, I., Broze, G.J., Jr. & Schwartz, A.L. The low density lipoprotein receptor-related protein mediates the cellular degradation of tissue factor pathway inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 6664-6668 (1994).
194. Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., Rall, S.C., Jr. & Mahley, R.W. Apolipoprotein E: receptor binding properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* **183**, 159-171 (1985).
195. Weisgraber, K.H. & Mahley, R.W. Characterization of apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Methods Enzymol.* **129**, 145-166 (1986).
196. Weisgraber, K.H. *et al.* Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J. Biol. Chem.* **261**, 2068-2076 (1986).
197. Weisgraber, K.H. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J. Lipid Res.* **31**, 1503-1511 (1990).
198. Weisgraber, K.H. & Shinto, L.H. Identification of the disulfide-linked homodimer of apolipoprotein E3 in plasma. Impact on receptor binding activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 12029-12034 (1991).
199. Weisgraber, K.H. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv. Protein Chem.* **45**, 249-302 (1994).
200. Wellington, C.L. *et al.* ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab Invest* **82**, 273-283 (2002).
201. Wernette-Hammond, M.E. *et al.* Glycosylation of human apolipoprotein E. The carbohydrate attachment site is threonine 194. *J. Biol. Chem.* **264**, 9094-9101 (1989).
202. Whitney, K.D. *et al.* Regulation of cholesterol homeostasis by the liver X receptors in the central nervous system. *Mol. Endocrinol.* **16**, 1378-1385 (2002).
203. Wicher, G., Larsson, M., Rask, L. & Aldskogius, H. Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-2/megalyn is transiently expressed in a subpopulation of neural

- progenitors in the embryonic mouse spinal cord. *J. Comp Neurol.* **492**, 123-131 (2005).
204. Wicher, G. *et al.* Low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin is expressed in oligodendrocytes in the mouse spinal cord white matter. *J. Neurosci. Res.* **83**, 864-873 (2006).
205. Williams, K.R., Saunders, A.M., Roses, A.D. & Armati, P.J. Uptake and internalization of exogenous apolipoprotein E3 by cultured human central nervous system neurons. *Neurobiol. Dis.* **5**, 271-279 (1998).
206. Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G. & Siegel, G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* **57**, 1439-1443 (2000).
207. Xu, Q. *et al.* Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J. Neurosci.* **26**, 4985-4994 (2006).
208. Yamada, T. *et al.* Astroglial localization of cholesteryl ester transfer protein in normal and Alzheimer's disease brain tissues. *Acta Neuropathol. (Berl)* **90**, 633-636 (1995).
209. Yang, J.W., Czech, T., Gelpi, E. & Lubec, G. Extravasation of plasma proteins can confound interpretation of proteomic studies of brain: a lesson from apo A-I in mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **139**, 348-356 (2005).
210. Ye, S. *et al.* Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 18700-18705 (2005).
211. Zannis, V.I. *et al.* Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J. Lipid Res.* **23**, 911-914 (1982).
212. Zannis, V.I. & Breslow, J.L. Apolipoprotein E. *Mol. Cell Biochem.* **42**, 3-20 (1982).
213. Zannis, V.I., McPherson, J., Goldberger, G., Karathanasis, S.K. & Breslow, J.L. Synthesis, intracellular processing, and signal peptide of human apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* **259**, 5495-5499 (1984).

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an:

Frau Prof. Ulrike Beisiegel für die Überlassung des Themas, die engagierte und persönliche Betreuung sowie für die Möglichkeit, die Ergebnisse meiner Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen vorstellen zu können.

Herrn Prof. Konrad Wiese für die Möglichkeit, am Department Biologie zu promovieren.

Jörg Heeren für die sehr kollegiale Zusammenarbeit, die wertvollen Ratschläge und den wissenschaftlichen Diskurs.

Meine Mitdoktoranden für das nette Arbeitsklima, die kollegiale Unterstützung und den sehr persönlichen Umgang.

Das gesamte Team des Instituts für Molekulare Zellbiologie für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung jeglicher Art.

Annika Rakow für ihr Engagement und ihre Geduld.