

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

**Einfluss von Insulin auf die Rezeptor- vermittelte Aufnahme
Triglyzerid- reicher Lipoproteine**

Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Anna Steinbeck
aus München

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin

an der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/ die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/ in

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/ in

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung **6**

2 Einleitung **7- 31**

2.1 Lipoproteine

2.2 Exogener Lipoprotein- Stoffwechsel

2.3 Endogener Lipoprotein- Stoffwechsel

2.4 LDL- Rezeptor Familie

2.4.1 LDL- Rezeptor

2.4.2 LDL- Receptor- Related- Protein (LRP1) und Liganden

2.4.3 VLDL- Rezeptor

2.4.4 GP330/ Megalin

2.4.5 Heparansulfat- Proteoglykane

2.5 Rezeptor- vermittelte Endozytose

2.6 Insulinresistenz und Typ II Diabetes mellitus

2.7 Dyslipoproteinämien beim Typ II Diabetes mellitus

2.8 Ziel der Arbeit

3 Material und Methoden **32- 44**

3.1 Geräte

3.2 Verbrauchsmittel

3.3 Chemikalien

3.4 Zellen

3.5 Zellkultur

3.6 Präparation von humanen Chylomikronen- Remnants

3.7 Markierung der Liganden

3.7.1 Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

3.7.2 Radioaktive Markierung

3.8 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

3.9 Zelluläre Aufnahme/ Bindung mit Hilfe der Immunfluoreszenz

3.10 SDS- Page und Autoradiographie

3.11 Quantifizierung der zellulären Aufnahme mit radioaktiv markierten Liganden

3.12 Proteinbestimmung

4 Ergebnisse **45- 61**

4.1 Charakterisierung humaner Chylomikronen

4.2 Translokation von LRP1 in Leberzellen

4.3 Insulin- abhängige Bindung und Aufnahme von Liganden in Leberzellen

4.4 Aufnahmeexperimente von radioaktiv markierten Liganden des LRP1- Rezeptors

5 Diskussion **62- 68**

5.1 Biochemische Charakteristika von Chylomikronen

5.2 Experimenteller Aufbau

5.3 Einfluss von Insulin auf die Rolle von LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel

6 Zusammenfassung **69**

7 Literaturverzeichnis **70- 78**

8 Anhang **79- 86**

8.1 Abkürzungsverzeichnis

8.2 Abbildungsverzeichnis

8.3 Danksagung

8.4 Lebenslauf

8.5 Eidesstattliche Erklärung

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die mit der Nahrung aufgenommenen Fette werden in den Mucosazellen des Dünndarms in Chylomikronen eingebaut und erreichen den Blutkreislauf über den Lymphweg. Intravaskulär werden die Triglyzerid- reichen Chylomikronen durch die katalytische Aktivität der endothelständigen Lipoproteinlipase (LpL) hydrolysiert, wobei Chylomikronen- Remnants (CR) und freie Fettsäuren entstehen. Die freien Fettsäuren werden von den Parenchymzellen des Muskel- und Fettgewebes aufgenommen und werden durch ihre Oxidation zu direkten Energielieferanten für die Zellen. Alternativ werden sie in Form von Triglyzeriden im Fettgewebe gespeichert. Während der Hydrolyse wird durch die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) das Apolipoprotein E (ApoE) auf CR übertragen. ApoE und die an die Partikel assoziierte LpL vermitteln die Bindung der CR an den hepatischen Lipoprotein- Rezeptoren, „low density lipoprotein (LDL)- Receptor- related Protein“ (LRP1) und dem LDL- Rezeptor (LDLR), und damit die Aufnahme der CR in die Leber. LRP1 wird als der wichtigste hepatische Remnants- Rezeptor angesehen, der in der postprandialen Phase CR schnell und effizient aus dem Blut entfernen kann. Es konnte gezeigt werden, dass LRP1 in Adipozyten durch Insulin stimuliert an die Plasmamembran transloziert (Descamps, Bilheimer et al. 1993; Zhang, Links et al. 2004), ähnlich der Funktionsweise des Glucosetransporters Glut4. In dieser zellbiologischen Arbeit soll untersucht werden, ob Insulin eine Translokation von LRP1 aus intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran von Hepatozyten induziert, und ob dieser Prozess quantitativ an der Aufnahme von CR beteiligt ist.

2 Einleitung

2.1 Lipoproteine

Lebensmittel enthalten als Energielieferanten Kohlenhydrate, Proteine und Lipide für den menschlichen Organismus. Quellen der Nahrungslipide sind fetthaltige tierische und pflanzliche Nahrungsmittel. Der grösste Teil der Nahrungslipide besteht aus Triglyzeriden, mit dem höchstem Energiegehalt von allen Nährstoffen. Darüber hinaus sind Phospholipide, Sphingolipide, Cholesterin und fettlösliche Vitamine in der Nahrung enthalten, mit entscheidenden Funktionen, wie dem Aufbau zellulärer Membranen, der Synthese von Steroidhormonen und wichtigen Signalmolekülen, sowie der Bildung von Gallensäuren. Auf Grund ihrer überwiegend hydrophoben Eigenschaften werden nicht- veresterte, sogenannte freie Fettsäuren im Blut an Serumalbumin als Träger gebunden, alle anderen Lipide müssen mit sogenannten Apolipoproteinen in Form von Lipoproteinen transportiert werden. Diese Partikel bestehen aus einem hydrophoben Kern aus Triglyzeriden und Cholesterinestern (CE), umgeben von einer hydrophilen Hülle aus Phospholipiden, freiem Cholesterin (fC) und Apolipoproteinen, wobei ein mizellarer Komplex entsteht, der im wässrigen Milieu des Blutes löslich ist. Da sich die Lipoproteine in der Dichte, der Grösse, dem Verhältnis der Lipide zu den Apolipoproteinen und der elektrischen Ladung unterscheiden, können sie in fünf Klassen eingeteilt werden (Gotto, Pownall et al. 1986). Der Bestimmung der Dichte der Lipoproteine liegt eine klare Trennung der einzelnen Fraktionen in der Ultrazentrifugation mittels eines Kaliumbromid-Dichtegradienten zu Grunde (Havel, Eder et al. 1955). Bei geringster Dichte ($\delta < 0,96$ g/ ml) sind die Triglyzerid- reichen Chylomikronen die grössten Lipoproteine (\varnothing 75- 1200 nm) mit einem Lipid- Proteinverhältnis von 99:1. Mit steigender Dichte und zunehmendem Proteinanteil nimmt die Grösse und der Triglyzeridanteil der Lipoproteine ab und es folgen die Very Low Density Lipoproteins (VLDL, $\delta = 0,96$ - 1,006 g/ ml, \varnothing 30- 80 nm), die Intermediate Density Lipoproteins (IDL, $\delta = 1,006$ - 1,019 g/ ml, \varnothing 25- 35 nm), die Low Density Lipoproteins (LDL, $\delta = 1,019$ - 1,063 g/ ml, \varnothing 18- 25 nm) und die High Density Lipoproteins (HDL, $\delta = 1,063$ - 1,21 g/ ml, \varnothing 5- 12 nm) mit einem Lipid- Proteinverhältnis von 50:50. Weiterhin können die Apolipoproteine in nicht austauschbare, nicht in Wasser lösliche Apolipoproteine der Gruppe B (ApoB₁₀₀ und ApoB₄₈) und wasserlösliche, untereinander austauschbare

der Gruppen A, C, D und E eingeteilt werden. Über amphiphile Helices der Proteinketten sind die Apolipoproteine sowohl mit dem Lipidanteil als auch mit der wässrigen Umgebung in Kontakt und haben neben ihrer strukturgebenden Funktion wichtige Aufgaben für die Regulation des Lipidmetabolismus (Havel and Kane. 2001). So vermitteln beispielsweise ApoE und ApoB₁₀₀ als Liganden für Rezeptoren die Aufnahme der Lipoproteine in die Zielzellen und initiieren weitere Stoffwechselwege. ApoC- II ist Aktivator der Lipoproteinlipase (LpL), ApoA- I und ApoD aktivieren die Lecithin- Cholesterin- Acyltransferase (LCAT) (Merkel, Eckel et al. 2002; Havel and Kane. 2001).

2.2 Exogener Lipoprotein- Stoffwechsel

Der Lipoproteinstoffwechsel kann in drei Bereiche gegliedert werden, die in engem Zusammenhang miteinander stehen, und an dessen Anfang die Verstoffwechslung der über die Nahrung aufgenommenen Lipide steht, was als exogener Transport der Lipide bezeichnet wird. Die Verdauung der Lipide beginnt mit der Hydrolyse der Triglyzeride durch Mund- und Magenlipase und wird nach Assoziation mit den Gallensäuren von der Pankreaslipase fortgesetzt. Es entstehen Di- und Monoglyzeride und freie Fettsäuren, welche mit Phospholipiden und Cholesterin die löslichen Mizellen bilden. Diese erlauben den Transport der Produkte der Fettverdauung an den Bürstensaum der Mucosazellen, wo sie nach Dissoziation der Gallensäuren, welche im Jejunum wieder dem enterohepatischen Kreislauf zugeführt werden, resorbiert werden. Cholesterinester (CE) werden durch die Cholesterinesterase des Pankreas hydrolysiert und das freie Cholesterin (fC) wird über NPC1L1 vermittelt in die Mucosazelle aufgenommen (Altmann, Davis et al. 2004).

Innerhalb der Mucosazelle erfolgt aus den anfallenden langkettigen Fettsäuren die Resynthese der Triglyzeride durch Übertragung der freien Fettsäuren auf β - Monoglyzeride oder eine de novo Synthese aus α - Glyzerophosphat und freien Fettsäuren. Die Triglyzeride assoziieren mit Phospholipiden, Cholesterin, ApoA- I, ApoA- II, ApoA- IV, ApoB₄₈ und fettlöslichen Vitaminen zu den Chylomikronen, die je nach aufgenommener Nahrung in ihrer Zusammensetzung variieren. Nach Exozytose in den interstitiellen Raum werden sie über die Lymphe abtransportiert und gelangen unter Umgehung der Leber über den Ductus Thoracicus in den

venösen Kreislauf. Kurzkettige, nicht- veresterte Fettsäuren hingegen werden über die Pfortader abtransportiert. Intravaskulär werden ApoC- I, ApoC- II, ApoC- III und ApoE von den HDL auf die Chylomikronen übertragen, wobei ApoC- II essentieller Kofaktor für die Lipoproteinlipase (LpL) ist, die an den Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) der Endothelzellen gebunden ist (Mahley and Ji 1999). Das aktivierte Enzym hydrolysiert den Triglyzeridkern der Chylomikronen (Eisenberg, Sehayek et al. 1992), die dabei freiwerdenden Fettsäuren werden durch β - Oxidation in Herz- und Skelettmuskelzellen als Energiequelle genutzt oder im Fettgewebe gespeichert (Mahley and Ji 1999). Während der Hydrolyse werden Phospholipide und Apolipoproteine, insbesondere ApoA- I, abgegeben und wiederum auf HDL übertragen (Tall and Lange 1978). Die entstehenden Restpartikel, die Chylomikronen- Remnants (CR) haben etwa den halben Durchmesser der Chylomikronen und sind wegen des Verlustes an Triglyzeriden reich an Cholesterin und CE. Die während der Lipolyse von den Endothelzellen abgelöste LpL bleibt an die CR assoziiert (Felts, Itakura et al. 1975; Goldberg, Kandel et al. 1986; Zambon, Schmidt et al. 1996; Heeren, Niemeier et al. 2002), bindet mit hoher Affinität LRP1 und vermittelt so die endozytotische Aufnahme der Remnants in die Hepatozyten (Beisiegel, Weber et al. 1991; Heeren, Niemeier et al. 2002). Vor allem aber durch das nach der Lipolyse an der Oberfläche der Partikel exponierte ApoE entsteht eine hochaffine Bindung des ApoE an dem endozytotisch wirksamen, hepatischen LDL-Rezeptor (LDLR) und an LRP1 (Bradley and Gianturco 1986; Kowal, Herz et al. 1989; Willnow, Orth et al. 1994; Beisiegel 1995; Beisiegel 1998; Rohlmann, Gotthardt et al. 1998). Neben der Leber ist der Knochen das wichtigste Organ für die Aufnahme der CR (Hussain, Mahley et al. 1989). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten Lipoproteinrezeptoren synthetisieren und LRP1 vermittelt CR aufnehmen (Niemeier, Kassem et al. 2005). Auf diese Weise werden dem Knochen fettlösliche Vitamine und bestimmte Fettsäuren zugeführt (Lamon-Fava, Sadowski et al. 1998; Niemeier, Kassem et al. 2005). An der Bindung und Aufnahme der Remnants in die Leber sind weiterhin die HSPG auf den Hepatozyten beteiligt. Durch die an den HSPG gebundene Hepatische Lipase (HL) werden die Remnants vor der Aufnahme erneut prozessiert (Mahley and Ji 1999). Unmittelbar vor der Aufnahme werden die CR ebenfalls mit aus Hepatozyten frei sezerniertem ApoE angereichert. Über die Rezeptor- vermittelte Endozytose der CR, welche später noch detailliert beschrieben wird (siehe Abschnitt 2.5), können die mit der Nahrung aufgenommenen

Triglyzeride, CE und Oberflächenlipide in kurzer Zeit aus dem Blut entfernt werden und werden von der Leber reguliert, dem Stoffwechsel zugeführt.

2.3 Endogener Lipoprotein- Stoffwechsel

In der Leber werden aus endogenen Quellen Triglyzeride, Phospholipide und Cholesterin synthetisiert und werden ähnlich wie bei der Chylomikronen- Remnants (CR)- Synthese in den intestinalen Zellen zu VLDL zusammengesetzt. Diese werden in das Blut sekretiert, um das periphere Gewebe mit Triglyzeriden und Cholesterin zu versorgen. Dabei stammen die für die Biosynthese der Triglyzeride benötigten Fettsäuren bei ausreichendem Nahrungsangebot aus lebereigenem Acetyl- CoA aus dem Kohlenhydratstoffwechsel. Bei länger andauerndem Fasten, bei Zufuhr besonders fettreicher Nahrung oder bei Diabetes mellitus kommt es zu einem Anstieg der Serumkonzentration der Fettsäuren, welche von der Leber aus der Zirkulation aufgenommen werden. Sowohl die Biosynthese der Triglyzeride als auch die Sekretion der VLDL wird durch kohlenhydratreiche Mahlzeiten, Ethanolzufuhr und erhöhte Spiegel nicht- veresterter Fettsäuren stimuliert. Ähnlich der Synthese der Chylomikronen in den Enterozyten entstehen und assoziieren die VLDL mit den Apolipoproteinen in dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) und dem Golgi- Apparat der Hepatozyten, von wo aus der VLDL- Partikel in Sekretgranula gespeichert und über den Disse- Raum in die Sinusoide der Leber gelangt. Das entstehende VLDL enthält ApoB₁₀₀ und wird durch Wechselwirkungen mit den HDL- Partikeln mit ApoE und C, insbesondere C- II angereichert. Folglich werden auch die VLDL, von der endothelständigen Lipoproteinlipase (LpL) , aktiviert durch C- II, abgebaut, wobei grosse VLDL 1- Partikel zu kleineren VLDL 2- Partikeln und zu IDL umgewandelt werden (Griffin and Packard 1994). Die bei der Hydrolyse der IDL- Partikel freiwerdenden Fettsäuren dienen wiederum der Energieversorgung peripherer Gewebe und es resultieren IDL- Partikel mit einem hohen Gehalt an Cholesterin und ApoE. Über die Bindung des ApoE und ApoB₁₀₀ werden VLDL 2- Partikel und IDL primär über den LDL- Rezeptor (LDLR) in die Hepatozyten aufgenommen (Havel and Hamilton 1988). Alternativ entstehen aus IDL die LDL. Für diese weitere Metabolisierung der IDL zu den LDL scheint hauptsächlich die Hepatische Lipase (HL) verantwortlich zu sein (Rubinstein, Gibson et al. 1985). Dabei werden die Triglyzeride der IDL hydrolysiert, alle Apolipoproteine bis auf ApoB₁₀₀ werden

abgegeben, und die entstehenden LDL nehmen von den HDL Cholesterolester (CE) auf, enzymatisch gesteuert durch das Cholesterolester- Transfer- Protein (CETP) (Kunitake, Mendel et al. 1992). Die zirkulierenden LDL- Partikel werden über die Bindung von ApoB₁₀₀ an den LDLR von extrahepatischem Gewebe oder der Leber aufgenommen (Brown and Goldstein 1986). Da Cholesterin essentieller Bestandteil zellulärer Membranen ist, ausserdem Ausgangspunkt für die Biosynthese von Steroidhormonen und der Gallensäuren, sind zudem alle Zellen des Organismus zur de novo Synthese von Cholesterin befähigt. Sowohl die zelluläre de novo Synthese als auch die Rezeptor- vermittelte Aufnahme der LDL- Partikel wird von den Zellen durch Sterol- regulierte Bindungsproteine sehr genau gesteuert, um intrazellulär hohe Cholesterin- Konzentrationen zu vermeiden (Brown, Herz et al. 1997), da diese zytotoxisch wirken können (Leake and Peters 1982; Sevanian and Peterson 1986; Brady, Filling- Katz et al. 1989). Das Ringsystem des Cholesterins kann vom Organismus nicht gespalten werden und so kann es nur durch die Leber in freier Form oder nach Oxidation in Form von Gallensäuren ausgeschieden werden. Folglich können bei erniedrigter LDLR- Expression in der Leber oder Defekten im LDLR- Gen oder des ApoB₁₀₀- Gens sehr hohe LDL- Konzentrationen im Blut entstehen (Hobbs, Brown et al. 1992). Erhöhte LDL Plasmaspiegel, insbesondere bei gleichzeitig erniedrigtem HDL, sind ein wesentlicher Risikofaktor in der Entstehung der Arteriosklerose (Rader 2002; Choi, Vilahur et al. 2006; Heller, de Faire et al. 1993; Rader, Cohen et al. 2003). Dabei wird der LDL- Partikel oxidativ modifiziert und die veränderten Strukturen des ApoB₁₀₀ binden an Scavenger- Rezeptoren, welche über einen unabhängigen Mechanismus, nicht von Cholesterin reguliert, die Aufnahme des Partikels in Makrophagen vermitteln. Aus Makrophagen bilden sich bei zunehmender Cholesterineinlagerung Schaumzellen, welche pathogonomisch für eine beginnende atherosklerotische Veränderungen der Gefässe sind (Krieger and Herz 1994).

Um ein Überangebot an Cholesterin in der Peripherie zu vermeiden und um die Cholesterinhomöostase aufrechtzuerhalten, werden in Leber und Dünndarm HDL- Partikel gebildet. Diese nehmen überschüssiges Cholesterin auf und transportieren es zur Leber, wo dieses dem enterohepatischen Kreislauf zugeführt wird (Lewis and Rader 2005; Tall, Costet et al. 2002). Dieser Mechanismus wird als reverser Cholesterintransport bezeichnet und erklärt die inverse Korrelation zwischen koronarer Herzerkrankung und der HDL- Cholesterol- Konzentration (Miller and Miller

1975). HDL- Partikel enthalten ApoA- I, ApoA- II, ApoA- IV und ApoE, nehmen freies Cholesterin (fC) auf, welches von dem Enzym Lecithin- Cholesterin- Acyltransferase (LCAT) verestert wird (Havel and Kane. 2001). ApoA- I fungiert bei dieser Reaktion als Kofaktor (Fielding and Fielding 1980). Dabei handelt es sich vor allem um die kleineren, dichteren HDL₃- Partikel, die nach weiterer Cholesterinaufnahme die grösseren, weniger dichten HDL₂ bilden. Mit Hilfe des CETPs können die CE der HDL auf ApoB- haltige Lipoproteine gemeinsam mit ApoE übertragen werden. Je nach Stoffwechselsituation betrifft dies vorbeikommende Chylomikronen in der Resorptionsphase und VLDL- Partikel in der Postresorptionsphase, die nach Bindung an den LDLR der Leber aus der Zirkulation entfernt werden. Mit dem „Scavenger-Receptor- Class- B- Type I“ (SR- BI) existiert daneben ein Mechanismus, durch welchen HDL auch direkt von der Leber aufgenommen wird und somit zum reversen Cholesterintransport beitragen kann (Acton, Rigotti et al. 1996; Lewis and Rader 2005; Tall, Costet et al. 2002).

2.4 LDL- Rezeptor- Familie

Die Lipoproteinrezeptoren nehmen über eine hochaffine Bindung die Lipoproteine aus der Zirkulation in die Zellen der verschiedenen Gewebe auf. Die LDL- Rezeptor- Familie umfasst mittlerweile im Bereich der Säugetiere 7 Mitglieder: der LDL- Rezeptor (LDLR) (Brown and Goldstein 1974), LRP1 (Herz, Hamann et al. 1988), GP330/ Megalin oder LRP2 (Raychowdhury, Niles et al. 1989; Saito, Pietromonaco et al. 1994), der VLDL- Rezeptor (VLDLR) (Takahashi, Kawarabayasi et al. 1992), LR11 (Yamazaki, Bujo et al. 1996) und zwei gehirnspezifische Rezeptoren LR8B (Novak, Hiesberger et al. 1996) und ApoE- Rezeptor 2 (Kim, Iijima et al. 1996). Sie werden zu den Typ- 1 Membranproteinen gezählt, welche sich durch ein extrazelluläres Aminoende, ein einzelnes Transmembransegment und ein zytoplasmatisches carboxyterminales Ende auszeichnen. Strukturell gemeinsam sind den einzelnen Rezeptoren jeweils fünf verschiedene Domänen, welche die funktionalen Einheiten der Rezeptoren bilden.

Am aminoterminalen Ende befindet sich die Domäne, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist (Russell, Esser et al. 1989). Sie besteht aus einer für die verschiedenen Rezeptoren variablen Wiederholung von 40 Aminosäuren (AS), die eine konservierte Sequenz von 6 Cysteinmolekülen einschliesst, an deren negativ-

geladenen AS- Resten sich die hoch konservierte Ser- Asp- Glu (SDE)- Sequenz befindet. Da diese Struktur homolog bei unterschiedlichen Komplementfaktoren vorzufinden ist, wird sie auch als „complement type repeat“ bezeichnet (Brown and Goldstein 1986; Goldstein, Hobbs and Brown. 2001).

Im Anschluss daran liegt die „EGF precursor homology domain“, die für die säureinduzierte Dissoziation der Liganden nach der Aufnahme benötigt wird (Davis, van Driel et al. 1987). Namensgebend waren dabei cysteinreiche Wiederholungen, sogenannte „growth factor repeats“, welche durch Verbindungsregionen getrennt werden und Homologien zu dem Vorläufermolekül des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) aufweisen.

Auf sie folgt eine dritte Domäne, mit 18 Serin- oder Threoninresten, die über ihre Hydroxylgruppe kovalent mit Zuckerresten verbunden ist und daher „O- linked sugar domain“ genannt wird. Sie bildet die Verbindung zur Transmembrandomäne, über die der Rezeptor in der Plasmamembran verankert ist.

Im Cytoplasma befindet sich schliesslich das carboxyterminale Ende, mit der Sequenz Asp- Prol- Val- Tyr (NPXY), die eine entscheidende Rolle für die Expression des Rezeptors in bestimmten Membranbereichen, und nach der Internalisierung der Liganden, für das Recycling des Rezeptors trägt (Chen, Goldstein et al. 1990).

2.4.1 LDL- Rezeptor

Als Prototyp der LDL- Rezeptor- Familie gilt der LDL- Rezeptor (LDLR), für dessen Aufklärung von Struktur und Wirkungsweise Joseph Goldstein und Michael Brown 1985 mit dem Nobel- Preis für Medizin ausgezeichnet wurden. Der LDLR wird im rauhen Endoplasmatischen Reticulum (rER) in Form eines Precursor- Proteins mit einem Molekulargewicht von 120 kDa synthetisiert. Anschliessend wird es wie alle Glykoproteine im rER und im Golgi- Apparat prozessiert und in den funktionsfähigen Zustand von 160 kDa überführt (Schneider, Beisiegel et al. 1982; Cummings, Kornfeld et al. 1983). Nach dem Transport in die Plasmamembran der Zellen wird der Rezeptor vermehrt in bestimmten Bereichen, sogenannten „coated pits“ exprimiert (Anderson 1986). Sieben Wiederholungen einer cysteinreichen, 40 Aminosäuren (AS) umfassenden Sequenz am aminoterminalen Ende bilden die Bindungsstelle für ApoB₁₀₀ und ApoE. Die Bindung des ApoB₁₀₀ an dem LDLR erfolgt über die

Wiederholungen 3- 6 (Russell, Esser et al. 1989), wohingegen ApoE Moleküle aus den Chylomikronen- Remnants (CR), IDL und VLDL bedingt durch Unterschiede in Grösse und Struktur und daraus resultierenden anderen Bindungseigenschaften eine höhere Affinität zu der Wiederholung 5 aufweisen (Innerarity, Mahley et al. 1978). Die Apolipoproteine binden mit einer Sequenz positiv geladener AS (Weisgraber, Innerarity et al. 1983; Hospattankar, Law et al. 1986) an einen dazu komplementären Bereich mit negativ geladenen AS in der Bindungsdomäne des LDLR (Milne, Theolis et al. 1989).

In seiner Funktion von Bindung und Aufnahme der cholesterinreichen LDL- Partikel ist der LDLR für die Senkung des Cholesterinspiegels im Plasma verantwortlich. Seine Schlüsselstellung in der Cholesterinhomöostase wird verdeutlicht, indem er mittels dem aufgenommenen Cholesterin und seiner Metaboliten an der Repression der endogenen Cholesterinbiosynthese beteiligt ist, und somit eine Überladung der Zellen mit Cholesterin verhindert. Die Bedeutung des Rezeptors wird durch die Tatsache belegt, dass verschiedene Mutationen, die für das LDLR- Gen beschrieben wurden (Hobbs, Russell et al. 1990), zu einem Funktionsverlust des Rezeptors führen und die autosomal dominant vererbare Hypercholesterinämie (FH) hervorrufen. Erhöhte ApoB₁₀₀- haltige Lipoproteinkonzentrationen verursachen bei den Betroffenen eine frühzeitige Arterioskleroseentstehung, die zu koronaren und/ oder zerebralen Gefässerkrankungen führt (Brown and Goldstein 1986; Rader, Cohen et al. 2003; Goldstein, Hobbs and Brown. 2001).

Auch an der Aufnahme der CR ist der LDLR beteiligt, was sowohl in Studien an Tiermodellen (Jackle, Huber et al. 1993; Choi and Cooper 1993), als auch für den Menschen gezeigt werden konnte (Everson and Krawitt 1991). Interessanterweise kommt es bei Patienten mit homozygotem LDLR- Defekt dennoch nicht zu erhöhten Plasmakonzentrationen der CR oder der VLDL- Remnants. Auf Grund dessen wurde gefolgert, dass ein weiterer LDLR- unabhängiger Aufnahmemechanismus für die Internalisierung der Remnants in die Leber existieren muss.

2.4.2 LDL- Receptor- Related- Protein (LRP1) und Liganden

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht ein weiteres Mitglied der LDL- Rezeptor- Familie, das LDL- Receptor- Related- Protein (LRP1). Erstmals wurde es 1988 durch die Arbeitsgruppe Herz als Oberflächenprotein mit auffallenden Sequenzhomologien

zum LDL- Rezeptor (LDLR) und dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) beschrieben. Die Ähnlichkeit in Struktur, die hohe Expression in der Leber und die gemeinsame Eigenschaft Calcium zu binden, führten zu dem Namen LDL- Rezeptor-Related- Protein und es wurde gezeigt, dass es sich um einen ApoE- bindenden Rezeptor mit wichtiger Funktion im Lipoproteinstoffwechsels handelt (Beisiegel, Weber et al. 1989).

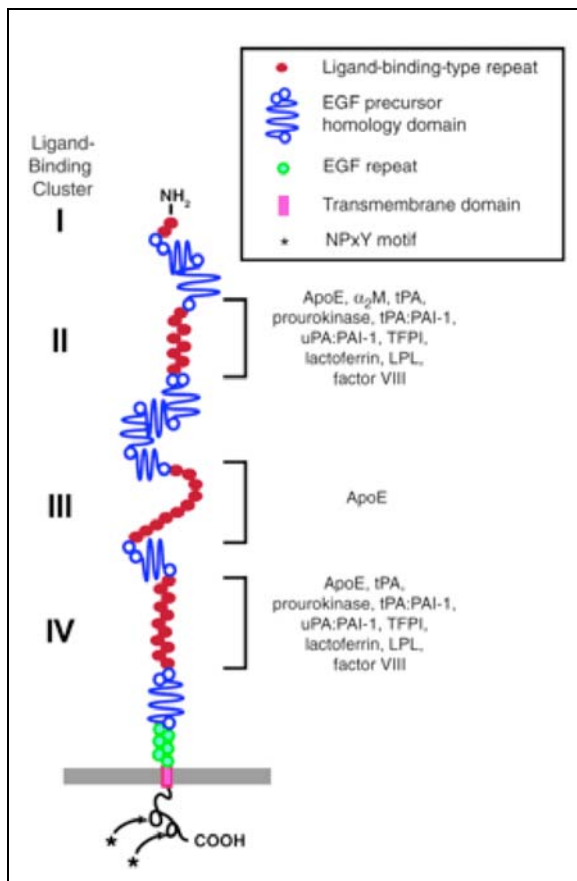


Abb. 1: Schematische Darstellung des LRP1- Rezeptors

Gezeigt ist die Struktur mit den funktionellen Einheiten und den Liganden von LRP1, die bevorzugt an die gezeigten Ligandenbindungsdomänen binden können. (aus Übersicht von Herz and Strickland 2001).

Bei seiner Synthese am rauhen Endoplasmatischen Reticulum (rER) entsteht aus der Primärsequenz von 4525 Aminosäuren (AS) zunächst ein 600 kDa grosses Protein, welches im Rahmen der posttranslationalen Modifizierung neben einer umfangreichen Glykosylierung durch die Protease Furin im trans- Golgi- Netzwerk in zwei Untereinheiten gespalten wird (Herz, Kowal et al. 1990; Willnow, Moehring et al. 1996). Das 85 kDa- Fragment bildet die zytoplasmatische Domäne, durchzieht die Membran und ist über eine nicht- kovalente Bindung mit dem 515 kDa- grossen

extrazellulären Fragment verbunden. Damit ist LRP1 ähnlich wie Megalin/ GP330 ca. vier- bis fünfmal so gross wie die anderen Familienmitglieder und bildet eine Vielzahl von Domänen, die eine Vielzahl von Ligandenbindungen ermöglichen. Der Rezeptor enthält die für die Familie charakteristischen Strukturelemente, ist aber dennoch durch spezifische Abweichungen gekennzeichnet: die Ligandenbindungsdomänen sind in 4 Cluster unterteilt, EGF- Vorläufer- Homologie- Domänen ersetzen die „O-linked sugar domain“ des LDLR. Die zytoplasmatische Domäne, ist mit 100 AS doppelt so gross wie die des LDLR, und enthält zwei NPXY- Sequenzen. Nach der Entdeckung eines Rezeptor- assoziierten Proteins (RAP) (Herz, Goldstein et al. 1991) wurde festgestellt, dass RAP im ER an neu entstehendes LRP1 bindet. RAP wurde als Chaperon identifiziert, moduliert somit den Prozess der Faltung und verhindert eine frühzeitige Bindung potentieller Liganden an die extrazelluläre Domäne, indem es an jedem der Bindungscluster II- IV von LRP1 binden kann. Fehlt RAP kommt es bei entsprechenden KO- Mäusen zu einer stark verminderten LRP1 Synthese (Willnow, Armstrong et al. 1995). Infolge dessen dient RAP in vielen Experimenten als wirkungsvoller Inhibitor der Ligandenbindung, als auch, wie in dieser Arbeit angewandt, als Marker für funktionelles LRP1 (Willnow, Sheng et al. 1994).

Nach der Klonierung des LRP1- Rezeptors (Herz, Hamann et al. 1988) stellte sich im Vergleich mit dem α 2- Makroglobulin (α 2M)- Rezeptor heraus, dass es sich dabei um ein und denselben Rezeptor handelte (Kristensen, Moestrup et al. 1990; Strickland, Ashcom et al. 1990). Exprimiert wird LRP1 in den Parenchymzellen der Leber (Herz, Hamann et al. 1988), den Neuronzellen des ZNS (Wolf, Lopes et al. 1992) und in den Synzytiotrophoblasten der Plazenta (Jensen, Moestrup et al. 1988). Überraschenderweise konnte LRP1 in der folgenden Zeit eine Vielzahl von Liganden zugeordnet werden, weshalb die komplexe Funktionsweise von LRP1 Schwerpunkt vieler Studien wurde. Man geht davon aus, dass die hohe Flexibilität in der Bindung der Liganden durch Konformationsänderungen der Liganden bindenden Sequenzbereiche des Rezeptors zustande kommt. Eine Vielzahl der Liganden von LRP1 stammen aus dem Proteinaseinstoffwechsel, wobei Komplexe aus Proteinase und Proteinase- Inhibitoren über LRP1 in die Leber aufgenommen werden. Dazu zählt aktiviertes α 2- Makroglobulin (α 2M) (Moestrup and Gliemann 1989; Ashcom, Tiller et al. 1990), Matrixmetalloproteinasen (MMP), tPA, uPA, PAI- 1 (siehe Abb. 1 aus Herz and Strickland 2001; S.15). Durch die häufige Beteiligung von MMPs und

uPA, an der Progression maligner Prozesse (Eccles, Box et al. 1996; Ossowski and Reich 1983) stieg das tumorbiologische Interesse an LRP1, und in der Tat konnte in einigen Tumoren eine Herunterregulation von LRP1 beobachtet werden (Kancha, Stearns et al. 1994). Als weiterer extrazellulärer Ligand von LRP1 ist das Pseudomonas- Exotoxin A (Willnow and Herz 1994) identifiziert worden, das nach LRP1- vermittelter Aufnahme in die Zelle zytotoxisch wirkt. Weitere Liganden sind eine Untergruppe humaner Rhinoviren Typ2 (Hofer, Gruenberger et al. 1994). Im Zusammenhang mit Arbeiten zu HIV- 1 stiess man auf einen Liganden, der nach seiner Aufnahme als Transkriptionsfaktor möglicherweise in Neuronen ruhende Viren aktivieren kann, und mit der im Spätstadium von AIDS- Patienten beschriebenen Demenz in Zusammenhang steht (Liu, Jones et al. 2000). Durch Ähnlichkeiten von LRP1 mit Proteinen, die an der Entstehung der Alzheimer Demenz beteiligt sind, konnte auch hier ein Zusammenhang dargestellt werden, im Sinne eines Absinkens des LRP1- Levels bei Expression von mutiertem Presenilin- 1, bzw. Überexpression von Presenilin- 1 (Van Uden, Carlson et al. 1999). Neben weiteren Funktionen im ZNS, wie beispielsweise ein LRP1- vermittelter Calciumeinstrom in Neuronen (Bacsikai, Xia et al. 2000), oder die Rolle von LRP1 in der Langzeitpotenzierung im Hippocampus (Zhuo, Holtzman et al. 2000), konnte für die LDL- Rezeptor- Familie eine Reihe von intrazellulären Bindungspartnern identifiziert werden (Gotthardt, Trommsdorff et al. 2000). Dabei handelt es sich grösstenteils um Proteine mit Phosphotyrosin- Interaktionsdomänen oder ähnlichen Protein- Interaktionsdomänen, was auf eine entscheidende Rolle von LRP1 in der zellulären Signaltransduktion hinweist.

Neben RAP wurde in dieser Arbeit bovines Lactoferrin (Lf), als weiterer spezifischer Ligand von LRP1 (Willnow, Goldstein et al. 1992; Meilinger, Haumer et al. 1995) für die Aufnahmeexperimente mit radioaktiv markierten Liganden verwendet. Das eisenbindende Glykoprotein ist mit dem Plasmaprotein Transferrin (Tf) verwandt, das für den Transport des Eisens im Blut verantwortlich ist und bindet an die Bindungscluster II und IV des LRP1- Rezeptors. 1969 wurde es von Johansson (Johansson 1969) erstmals aus humaner Milch isoliert, konnte mittlerweile aber auch in der Milch von anderen Säugetieren nachgewiesen werden (Maus, Rind, Pferd, Ziege, Schwein) (Weiner and Szuchet 1975). Die AS- Sequenzen von unterschiedlichen Spezies zeigen Abweichungen bis zu 30%, die grösste Homologie haben humanes und bovines Lf (Norris, Baker et al. 1989). Das 80 kDa grosse Lf

besteht aus einer einsträngigen AS- Kette, die in zwei Lappen gefaltet ist und zwei N-glycosidisch gebundenen Glykanen. Jeder Lappen, der aus homologen Sequenzen besteht und eine α - Helix- Struktur aufweist, ist in zwei Domänen unterteilt. Zwischen den Domänen befindet sich eine Bindungsstelle, an der dreiwertige Eisenionen (Fe^{3+}) reversibel gebunden werden können (Brock 2002). Im menschlichen Körper ist Lf zu 15- 20% mit Eisen gesättigt und wird als Holo- Lf bezeichnet. Beträgt die Eisensättigung weniger als 5%, spricht man von Apo- Lf (Steijns and van Hooijdonk 2000), das in dieser Form in exokrinen Sekreten wie Milch, Speichel, Tränenflüssigkeit, Pankreasaft etc. vorliegt. Lf befindet sich im menschlichen Körper in zwei Reservoirs, dem stationärem Pool auf Schleimhautoberflächen und dem zirkulatorischem Pool in polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten. Durch Degranulation der Neutrophilen, und Freisetzung von Lf (Roseanu, Chelu et al. 2000) im Rahmen von Infektionen und Entzündungen, steigt die sonst geringe Blutplasmakonzentration von Lf an, was vermuten lässt, dass Lf bei Entzündungsprozessen eine Rolle im physiologischen Eisenmetabolismus spielt. Durch die Hydrolyse von Lf durch Proteasen des Magen- Darm Trakts entsteht Lactoferricin, das eine starke biologische Aktivität aufweist (Weinberg 2001) und eine bakterizide Wirkung entfaltet. Darüber hinaus scheint Lf bei einer Vielzahl von physiologischen Vorgängen regulatorische Funktionen, wie der Beeinflussung immunologischer Vorgänge (Brock 2002) einzunehmen, die genauen Aufgaben und Mechanismen, insbesondere im Bereich des Lipoproteinstoffwechsels sind dennoch weitestgehend ungeklärt.

Der Fokus dieser Arbeit ist auf LRP1 als Rezeptor im Lipoproteinstoffwechsel gerichtet. Dort interagiert LRP1 mit ApoE (Beisiegel, Weber et al. 1989), mit ApoE angereicherten VLDL (Chappell, Inoue et al. 1994), β - VLDL (Kowal, Herz et al. 1989), der Lipoproteinlipase (LpL) (Beisiegel, Weber et al. 1991; Chappell, Fry et al. 1992; Nykjaer, Bengtsson-Olivecrona et al. 1993; Krapp, Zhang et al. 1995) und der Hepatischen Lipase (HL) (Nykjaer, Bengtsson-Olivecrona et al. 1993; Ji, Lauer et al. 1994; Shafi, Brady et al. 1994; Krapp, Ahle et al. 1996). Nachdem gezeigt werden konnte, dass primär LRP1 und der LDLR für die Rezeptor- vermittelte Aufnahme der Chylomikronen- Remnants (CR) verantwortlich sind (Rohlmann, Gotthardt et al. 1998) stellte sich heraus, dass die Aufnahme durch die Bindung von ApoE und der LpL an LRP1 vermittelt wird (Beisiegel, Weber et al. 1989; Kowal, Herz et al. 1989; Beisiegel, Weber et al. 1991; Verges, Bensadoun et al. 2004; Espirito Santo, Pires et

al. 2004). Neben den CR ist ApoE Ligand von VLDL, VLDL- Remnants, IDL und vermittelt über die Bindung an die Lipoproteinrezeptoren die Aufnahme dieser Partikel in die Zelle. Dies verdeutlicht die zentrale Rolle von ApoE für die Homöostase Triglyzerid- reicher Lipoproteine. ApoE, das erstmals 1973 als Apolipoprotein mit hohem Anteil von Arginin- Resten beschrieben wurde (Shore and Shore 1973) wird zu 90% in der Leber synthetisiert und gelangt über Exozytose aus den Hepatozyten in den Disse- Raum. Dort assoziiert es mit den CR, VLDL- R, HDL/ HDL- Vorstufen und ist mit einer Konzentration von 30- 50 μg im Plasma gesunder Menschen nachweisbar. ApoE kann strukturell wie auch funktional in zwei Einheiten unterteilt werden, dem aminoterminalen und dem carboxyterminalen Ende, die über eine „hinge- region“ miteinander verbunden sind (Wetterau, Aggerbeck et al. 1988). An dem aminoterminalen Ende sind 191 AS zu 4 α - Helices (Wilson, Wardell et al. 1991) gefaltet, welche die Rezeptorbindungsdomäne bilden. Über die positiven Ladungen dieser Region interagiert ApoE mit der „complement type“- Domäne des LDLR (Weisgraber and Rall 1987; Aggerbeck, Wetterau et al. 1988; Mahley 1988). Die Bindung von ApoE an LRP1 erfolgt an den Bindungsclustern II, III, und IV des Rezeptors (siehe Abb. 1 aus Herz and Strickland 2001; S.15). Über das aus 83 AS bestehende carboxyterminale Ende wird über amphiphatische Strukturen die Bindung an die Lipoproteine, sowie die Bindung an Heparin vermittelt (Weisgraber, Mahley et al. 1990). Mittels isoelektrischer Fokussierung im Western Blot können drei Isoformen von ApoE unterschieden werden, ApoE2, ApoE3 und ApoE4 (Utermann, Canzler et al. 1977), die aus drei unabhängigen Allelen $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ gebildet werden und einen genetischen Polymorphismus darstellen (Innerarity, Mahley et al. 1978; Innerarity, Bersot et al. 1984). Das Allel $\epsilon 3$ ist in der Bevölkerung mit 70- 85% am häufigsten vertreten, gefolgt von $\epsilon 4$ mit 12- 18% und $\epsilon 2$ mit 3- 12% (Zannis, Breslow et al. 1982). Neben den drei homozygoten Formen ($E_{2/2}$, $E_{3/3}$, $E_{4/4}$) existieren entsprechend drei heterozygote Formen ($E_{2/3}$, $E_{2/4}$, $E_{3/4}$). Die für die Experimente in dieser Arbeit häufigste ApoE- Isoform zeichnet sich durch die AS Cystein an Position 112 und Arginin an der Position 158 aus (Mahley, Huang et al. 1999). ApoE2 weist im Vergleich zu ApoE3 eine deutlich verringerte Bindung an die Proteoglykane der Zelloberfläche sowie an den LDLR (~2% der Aktivität im Vergleich zur Normalform ApoE3) auf. Homozygote Träger des $\epsilon 2$ - Alleles haben eine Dyslipoproteinämie und können eine Hyperlipoproteinämie Typ III (HLP- III) entwickeln (Utermann, Canzler et al. 1977; Breslow, Zannis et al. 1982). Die HLP ist jedoch nur teilweise durch die

stark reduzierte Affinität gegenüber dem LDLR und den Proteoglykanen zu erklären (Schneider et al. 1981), da nur ~5% der homozygoten $\epsilon 2$ - Allel Träger das Krankheitsbild entwickeln (Utermann, Canzler et al. 1977; Davignon, Gregg et al. 1988). Mit Liganden- Blotting Experimenten wurde gezeigt, dass ApoE2 im Vergleich zum ApoE3 eine geringere Affinität zum LRP1 aufweist (Kowal, Herz et al. 1990). ApoE4 besitzt ebenfalls pathophysiologische Relevanz, da Personen mit dieser Isoform ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einerseits von Atherosklerose und andererseits der Alzheimer Erkrankung haben (Davignon, Gregg et al. 1988; Roses 1996; Mahley, Huang et al. 1999). Für den Lipoproteinstoffwechsel ist bedeutend, dass der ApoE4 Phänotyp mit erhöhten Triglyzerid- und niedrigen HDL-Konzentrationen korreliert (Davignon, Gregg et al. 1988). Außerdem werden hohe LDL- Spiegel mit der ApoE4 Isoform assoziiert. Im Vergleich zum ApoE3 hat ApoE4 eine leicht erhöhte Affinität gegenüber dem LDLR (Knouff, Hinsdale et al. 1999) und ist im Plasma weniger mit HDL und mehr mit VLDL assoziiert (Weisgraber, Mahley et al. 1990). Trotz der höheren Affinität zum LDLR und obwohl ApoE4 im Vergleich zum ApoE3 schneller in die Leber aufgenommen wird (Gregg, Zech et al. 1986; Knouff, Hinsdale et al. 1999), liegt bei Individuen mit ApoE4 ein verzögerte Aufnahme postprandialer Remnants vor (Bergeron and Havel 1996). Kürzlich publizierte quantitative Analysen der LRP1- vermittelten Aufnahme der ApoE- Isoformen zeigen, dass keine Unterschiede zwischen den Isoformen vorhanden sind (Ruiz, Kouivaskaia et al. 2005).

2.4.3 VLDL- Rezeptor

1992 konnte eine cDNA kloniert werden, die für ein Protein kodierte, das in seiner Struktur Ähnlichkeiten mit dem LDL- Rezeptor (LDLR) aufwies. Es konnte VLDL- Partikel aufnehmen und wurde deshalb VLDL- Rezeptor (VLDLR) genannt (Takahashi, Kawarabayasi et al. 1992) und stellt ein weiteres Mitglied der LDL- Rezeptor- Familie dar. Zu den verschiedenen Liganden des VLDLR gehören aus dem Bereich der Lipoproteine mit Lipoproteinlipase (LpL) angereicherte Chylomikronen- Remnants (CR) (Niemeier, Gafvels et al. 1996), β - VLDL, VLDL und IDL (Takahashi, Kawarabayasi et al. 1992; Takahashi, Suzuki et al. 1995). Im Unterschied zu LRP1 zeigte sich, dass der VLDLR beim Menschen hauptsächlich in Herz, Muskel, und Fettgewebe exprimiert wird (Gafvels, Caird et al. 1993). Auf Grund

des Expressionsmusters wird vermutet, dass der VLDLR bei der Versorgung der verschiedenen Gewebe mit Energie in Form freier Fettsäuren aus den Triglyzeridreichen Lipoproteinen beteiligt ist (Gafvels, Caird et al. 1993). Durch die nur geringe Expression in der Leber scheint der VLDLR für die schnelle hepatische Aufnahme von Remnants- Partikeln keine Rolle zu spielen.

2.4.4 GP330/ Megalin

GP330/ Megalin ist neben LRP1 einer der grössten Vertreter der LDL- Rezeptor-Familie (Saito, Pietromonaco et al. 1994) mit ähnlichen Liganden wie LRP1 (Kounnas, Morris et al. 1992; Willnow, Goldstein et al. 1992; Stefansson, Chappell et al. 1995; Medh, Bowen et al. 1996). Im Unterschied zu LRP1 kann der Rezeptor ApoB₁₀₀ binden und spielt vermutlich durch Bindung und Aufnahme von LDL an GP330/ Megalin in der Cholesterinversorgung des Gehirns in der Embryonalperiode eine entscheidende Rolle (Willnow, Hilpert et al. 1996). Da dieser Rezeptor hauptsächlich in den proximalen Tubuli der Niere und an den Ependymzellen lokalisiert ist, hat er für die Untersuchung der hepatischen Remnants-Internalisierung keine Relevanz.

2.4.5 Heparansulfat- Proteoglykane

Um mit Nachbarzellen und mit Komponenten der extrazellulären Matrix in Kontakt zu treten, befinden sich auf der Oberfläche von Zellen verschiedenster Gewebe anionische, polymere Strukturen, die Proteoglykane. Sie bestehen aus einem core-Protein und Glykosaminoglykanen aus Disaccharideinheiten. Je nach Baustein lassen sich die Proteoglykane in Chondroitinsulfat-, Dermatansulfat-, Keratansulfat-, und Heparansulfat- Proteoglykane (HSPG) unterteilen (Ruoslahti 1988). Für die HSPG konnte eine Beteiligung an der Aufnahme der Remnants- Partikel Triglyzeridreicher Lipoproteine gezeigt werden (Ji, Brecht et al. 1993; Ji, Sanan et al. 1995; Beisiegel and Heeren 1997; Mahley and Ji 1999; MacArthur, Bishop et al. 2007). Die core- Proteine der HSPG heissen Syndecan, Perlecan, Glypican und bilden ihre Grundstruktur (Rosenberg, Shworak et al. 1997). An der Oberfläche eines Hepatozyten befinden sich ca. 4×10^6 HSPG- Moleküle, welche über den Disse-Raum in Kontakt mit dem Blutkreislauf stehen (Yanagishita and Hascall 1992). Der

Aufnahmemechanismus der Chylomikronen- Remnants (CR) wurde in dem sogenannten „Secretion- Recapture“- Modell beschrieben (Ji, Sanan et al. 1995). Dabei binden zunächst die mit Lipoproteinlipase (LpL) assoziierten Remnants-Partikel die HSPG an der Oberfläche der Hepatozyten (Ji, Sanan et al. 1995). Bei der Hydrolyse durch die Hepatische Lipase (HL) kommt es zu einer Anreicherung der Partikel mit ApoE, welches von den Hepatozyten sezerniert, die Aufnahme der prozessierten CR über den LDL- und den LRP1- Rezeptor vermittelt. In vitro konnte auch eine direkte Aufnahme durch die HSPG gezeigt werden, somit ein Lipoprotein-Rezeptor unabhängiger Mechanismus (Fernandez-Borja, Bellido et al. 1996; Sehayek, Wang et al. 1996).

2.5 Rezeptor- vermittelte Endozytose

Mittels Rezeptor- vermittelter Endozytose werden viele verschiedene Moleküle spezifisch über die Barriere der Plasmamembran hinweg in das Zellinnere aufgenommen. Durch die Bindung und Internalisierung durch membranständige Rezeptoren können auf diese Weise Transportproteine, wie z.B. LDL oder Transferrin, einige Polypeptidhormone wie Insulin und der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF), oder Zellen des Immunsystems aufgenommen werden. Zudem dient sie der Entfernung körpereigener Zellen die abgebaut werden sollen, sowie der Eliminierung körperfremder Zellen und stellt somit im weiteren Sinne einen zellulären Abwehrmechanismus dar. Einige Viren und Toxine nutzen dagegen diesen Mechanismus um in die Zelle einzudringen. In der Zelle werden die Substanzen weiterverarbeitet, deponiert, oder gelangen mittels vesikulärem Transport an den Ort ihrer Bestimmung. Diese Aufgaben erfordern ein spezifisches Erkennen des aufzunehmenden Materials, welches durch entsprechende Rezeptoren in der Plasmamembran der Zellen erfolgt. An bestimmten Regionen der Zellmembran, sogenannten „Clathrin- Coated- Pits“ (Coated Pits) bilden sich Rezeptor- Ligand-Einheiten, die durch Einstülpung dieser Bereiche in die Zelle aufgenommen werden (Anderson, Goldstein et al. 1977). Die Entstehung neuer Coated Pits kann vermutlich auch nach Bindung der Liganden und Dimerisierung der Rezeptoren induziert werden, z.B. bei dem Insulin- oder dem EGF- Rezeptor (Dunn and Hubbard 1984; Hopkins, Miller et al. 1985).

Der spezifischen Anreicherung der LDL- Rezeptoren (LDLR) dient eine tyrosinhaltige Tetrapeptidsequenz (NPXY) als Erkennungsmerkmal, die sich im zytoplasmatischen Teil des LDLR befindet (Pearse 1988; Chen, Goldstein et al. 1990). Clathrin, ein grosses Protein von ca. 190 kDa bildet sogenannte Triselikone (Brodsky 1988), welche sich in Hexagonen und Pentagonen zusammenlagern und die Zellmembran auf der zytoplasmatischen Seite korbartig einhüllen. Adaptorproteine (AP) binden den Clathrin- Coat (Ahle, Mann et al. 1988; Robinson 1994) an die Plasmamembran (AP2) oder an die Membran des trans- Gogi- Netzwerks (AP1) und vermitteln selektiven Vesikeltransport in Richtung Endosomen/ Lysosomen (Pearse 1988; Keen and Beck 1989). In vitro haben AP die Fähigkeit, die zytoplasmatischen Domänen von Transmembranrezeptoren zu binden, beispielsweise wird die zytoplasmatische Domäne des LDLR von AP2 gebunden (Pearse 1988). Für das Abschnüren der Vesikel aus der Plasmamembran scheint die spontane Krümmung der Triselikonen eine entscheidende Rolle zu spielen (Heuser 1980). Dennoch zeigte sich, dass die Invagination Energie in Form von ATP benötigt, als in ATP- depletierten Zellen das Abschnüren der Vesikel blockiert war (Schmid and Carter 1990).

Dynamin aus der Familie der G- Proteine ist essentiell an dem Prozess der Abschnürung beteiligt, indem es eine ringförmige Struktur bildet, die unter GTP- Verbrauch die Verbindung zwischen Plasmamembran und Vesikel trennt (Hinshaw and Schmid 1995). Es entstehen die sogenannten „Clathrin- Coated- Vesicles“ (Coated Vesicles), welche unter Katalyse des ATP- abhängigen Chaperonproteins hsc70 (Uncoating- Enzyme) (Braell, Schlossman et al. 1984) ihre Clathrin- Hülle verlieren, welche erneut zu Triselikonen polymerisiert (Rothman and Schmid 1986). Die Vesikel fusionieren mit sogenannten sortierenden Endosomen (Geuze, Slot et al. 1983), grosse Vesikel mit tubulären und membranösen Ausläufern, in welchen sich die Wege der unterschiedlichen Rezeptor- Ligand- Systeme trennen. In einigen Systemen werden die Rezeptoren recycelt (Mukherjee, Ghosh et al. 1997), während die Liganden in den Lysosomen abgebaut werden. Durch eine ph- Wert- Erniedrigung löst sich dabei zunächst die Bindung zwischen dem Ligand und seinem Rezeptor und die Liganden verbleiben in den zentralen Lumina, während sich die Rezeptoren in den tubulären Ausläufern des sortierenden Endosoms sammeln und durch Abschnürung einzelner Vesikel an die Oberfläche der Zelle zurückkehren (Hopkins, Gibson et al. 1990). Durch weitere Ansäuerung entwickeln sich späte prälysosomale Endosomen, welche mit Lysosomen fusionieren, in denen die

Liganden abgebaut oder dem Stoffwechsel der Zelle zugeführt werden. Dieser Mechanismus wurde sowohl für den LDLR (Brown, Anderson et al. 1983), als auch für den α 2MR/ LRP1- Rezeptor (Dickson, Nicolas et al. 1981) beschrieben. Bei der Untersuchung der intrazellulären Transportwege für LDL und HDL stellte man interessanterweise fest, dass einige Rezeptor- Ligand- Komplexe während der Ansäuerung ihrer Trennung entgingen und gemeinsam an die Oberfläche der Zellen zurücktransportiert wurden, was als Retroendozytose bezeichnet wird (Greenspan and St Clair 1984; Alam, Yatsu et al. 1989; Kambouris, Roach et al. 1990). Dabei könnte die Retroendozytose der intakten HDL- Partikel im reversen Transport der Cholesterinmoleküle von Bedeutung sein (Rogler, Herold et al. 1991). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass internalisierte Chylomikronen- Remnants (CR) in peripheren Endosomen desintegrieren und die verschiedenen Bestandteile des Partikels dann unterschiedlich sortiert werden (Heeren and Beisiegel 2001). In Makrophagen wurde unmittelbar nach der Endozytose der Lipidanteil der VLDL in Lysosomen und das ApoE in peripheren Endosomen detektiert (Myers, Tabas et al. 1993; Tabas, Lim et al. 1990). In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde in Leberzellen ein reduzierter Abbau von ApoE in vivo gefunden (Rensen, Jong et al. 2000). In humanen Hepatomazellen und Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass ApoE und die Lipoproteinlipase (LpL) als Bestandteil der CR nicht lysosomal abgebaut werden, sondern zusammen mit Cholesterin und Phospholipiden als ‚Surface Remnants‘ in peripheren Endosomen verbleiben (Heeren, Weber et al. 1999). Diese „Surface Remnants“ werden induziert durch HDL an die Zelloberfläche transportiert und mit diesen reseziert (Heeren, Grewal et al. 2003). Mittlerweile konnte die in vivo Relevanz dieses Stoffwechselweges in Nagermodellen gezeigt werden (Fazio, Linton et al. 1999; Heeren, Grewal et al. 2001; Swift, Valyi-Nagy et al. 2001), wobei das Recycling der „Surface Remnants“ anscheinend sowohl bei der hepatischen Synthese von VLDL (Fazio, Linton et al. 1999; Fazio, Linton et al. 2000), als auch bei der Regenerierung ApoE- haltiger HDL (Farkas, Swift et al. 2003; Heeren, Grewal et al. 2001; Heeren, Grewal et al. 2003; Heeren and Beisiegel 2001; Heeren, Beisiegel et al. 2006) eine wichtige Rolle spielt. Studien mit LDLR- defizienten Zellen und Mäusen weisen darauf hin, dass LRP1 und nicht der LDLR für das Recycling verantwortlich ist (Fazio, Linton et al. 1999; Heeren, Grewal et al. 2001). Sollen dagegen Rezeptor, wie beispielsweise der EGF- Rezeptor, und Ligand abgebaut werden, gelangt der Komplex über den klassischen Abbauweg in die

Lysosomen, wo hydrolytische Enzyme beide Konstituenten degradieren (De Duve and Wattiaux 1966).

Als klassisches Beispiel des Rezeptor- Recyclings gilt der Transferrin- Rezeptor (TfR), der zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) aufnimmt, welches im Plasma an Transferrin (Tf) assoziiert ist. Während sich das Eisen durch die Ansäuerung in den sortierenden Endosomen von dem Tf löst, bleibt die Bindung des Tf an den Rezeptor über Apo- Tf erhalten und der TfR- Komplex wird über sogenannte Recycling- Endosome zurück an die Zelloberfläche transportiert. Dort zerfällt der Komplex bei neutralem ph- Wert und der Rezeptor kann einen neuen eisenhaltigen Liganden aufnehmen (Octave, Schneider et al. 1983). In umgekehrter Richtung existiert ein Transport von der Plasmamembran zu den sortierenden Endosomen (Ghosh and Maxfield 1995), ähnlich dem zwischen Golgi- Apparat und Endoplasmatischen Reticulum (ER) (Sandvig and van Deurs 1996), was den komplexen Funktionsbereich der Recycling- Endosome im Membrantransport verdeutlicht.

2.6 Insulinresistenz und Typ II Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist ein Überbegriff für eine ätiologisch und pathogenetisch heterogene Gruppe von chronischen Erkrankungen des Kohlenhydratstoffwechsels, deren gemeinsames Charakteristikum der erhöhte Blutzuckerspiegel, die Hyperglykämie ist. Neben einer Dysfunktion des Kohlenhydratstoffwechsels liegen häufig auch Störungen des Fett-, Eiweiß- und des Elektrolytstoffwechsels vor. Dabei wird zwischen dem juvenilen Typ I Diabetes und dem Typ II Diabetes unterschieden, der sich meistens erst ab dem 40. Lebensjahr manifestiert. Zunehmend wird allerdings ein Auftreten des Typ II Diabetes in jüngeren Altersgruppen registriert, insbesondere bei stark übergewichtigen Kindern und Jugendlichen. Während dem Typ I Diabetes eine autoimmun bedingte Störung der β - Zelle zu Grunde liegt, ist die Entstehung des Typ II Diabetes grundsätzlich verschieden. Dabei hat sich die Vorstellung von der Pathophysiologie und der Bedeutung des Typ II Diabetes in den letzten Jahren grundlegend gewandelt. Ende der 80er Jahre konnte gezeigt werden, dass nicht ein Insulinmangel das wesentliche Problem der Erkrankung darstellt, im Gegenteil sogar übermässig viel Insulin von dem Pankreas sezerniert wird, bei gleichzeitig normalen oder erhöhten Blutzuckerspiegeln. Das Insulin kann seine Wirkungen auf Grund eines verminderten Ansprechens der Zielorgane jedoch nicht

entfalten. Dieser Zustand beschreibt den heutigen Begriff der Insulinresistenz, die erstmalig von Himsworth und Kerr 1939 beschrieben wurde, um die relativ geringe Wirkung von exogenem Insulin bei adipösen Diabetikern zu charakterisieren (Kahn, Hull et al. 2006). Mittlerweile ist allgemein akzeptiert, dass die Insulinresistenz Mittelpunkt einer generalisierten Stoffwechselstörung darstellt, die der Manifestation des Typ II Diabetes bereits um Jahre vorausgeht. Die Prävalenz der Insulinresistenz in der erwachsenen Bevölkerung ist hoch, bei etwa 10- 25%, wobei nur ein Teil der Betroffenen in der Folge einen Typ II Diabetes entwickelt (Häring. 1999, Beck-Nielsen 1999). Allerdings sind in der Gruppe der Typ II Diabetiker 80- 90% insulinresistent (Bonora, Kiechl et al. 1998; Isomaa, Almgren et al. 2001). Eine quantitative Dimension erhält die Insulinresistenz, indem sie unterschiedlich ausgeprägt sein kann, von leicht über schwer bis hin zur seltenen absoluten Insulinresistenz. Die Insulinresistenz wirkt sich dabei vor allem auf die Hauptzielgewebe bzw. Organe der Insulinwirkung aus und es wird eine periphere Insulinresistenz von Skelettmuskel und Fettgewebe von einer zentralen Insulinresistenz der Leber unterschieden. Allerdings können auch andere Gewebe wie die Niere, das Endothel oder pankreatische Betazellen insulinresistent sein (Kwon, Xu et al. 1999). Neben einer erheblichen genetischen Disposition scheinen eine Reihe von exogenen Faktoren eine erhöhte Inzidenz der Insulinresistenz hervorzurufen, bzw. eine bereits bestehende Insulinresistenz zu verstärken. Dazu zählt ein niedriges Geburtsgewicht, Adipositas mit androider Verteilung des Körperfetts, fettreiche Ernährung, Bewegungsmangel, Rauchen und Stress (Bloomgarden 1998). Diese Risikofaktoren stimmen fast lückenlos mit den Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen überein, und viele Studien belegen einen engen Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und Atheroskleroseentwicklung (Bonora, Willeit et al. 1997; Hedblad, Nilsson et al. 2000). Das Insulin- Resistenz- Syndrom beim Typ II Diabetes ist ebenfalls mit der Entwicklung arteriosklerotischer Folgeerkrankungen assoziiert (Rett 1999). Weiterhin steht die Insulinresistenz im Mittelpunkt des sogenannten Metabolischen Syndroms, auch als Syndrom X bezeichnet, zu dessen Konstellation zusätzlich eine zentrale Adipositas, Dyslipidämie, Hypertonie, Gerinnungsstörungen, Hyperglykämie und endotheliale Dysfunktion zählen (Reaven 1988). Dabei geht die Insulinresistenz ebenfalls dem Metabolischen Syndrom prospektiv voraus.

Neben den bereits genannten Faktoren wirken weitere Einflüsse auf die Insulinresistenz ein, wie die zum Insulin gegenregulatorischen Hormone Glukagon, Adrenalin/ Noradrenalin, Kortisol und das Wachstumshormon, die eine Insulinresistenz verstärken oder unterhalten können (Bloomgarden 1998). In seltenen Fällen können dementsprechend endokrine Erkrankungen wie z.B. das Cushing- Syndrom, Akromegalie oder ein Phäochromozytom eine Rolle bei der Insulinresistenz spielen. Auch Medikamente wie Glukokortikoide, Betablocker, Thiazide oder orale Kontrazeptiva können an der Entstehung einer Insulinresistenz beteiligt sein. Prädiabetisch beruht die Insulinresistenz vermutlich überwiegend auf einer mangelnden Insulinempfindlichkeit des Skelettmuskels (Häring. 1999). Um das verminderte Ansprechen zu kompensieren und den Blutzuckerspiegel im Normbereich zu halten produziert das Pankreas unphysiologisch hohe Mengen an Insulin, bis nach Jahren die β - Zellen erschöpft sind und sich eine gestörte Glucosetoleranz entwickelt. Vor allem postprandial können Glucosespitzen nicht mehr abgefangen werden, bis schliesslich der Nüchternblutzucker anhaltend hoch bleibt und der Diabetes manifest wird (Häring. 1999). Zusätzlich kennzeichnet den Typ II Diabetes eine Störung in der Kinetik der Insulinsekretion der β - Zelle, insbesondere bezüglich der frühen Phase der Insulinsekretion, so dass im Verhältnis zur Glucose stets ein relatives Insulindefizit besteht. Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung können sich dabei prinzipiell gegenseitig beeinflussen, eine Reihe von Studien weisen jedoch darauf hin, dass die Insulinresistenz eine Sekretionsstörung nach sich ziehen kann (Eriksson, Franssila-Kallunki et al. 1989; Warram, Martin et al. 1990). Die Insulinresistenz der Leber scheint sich erst zu entwickeln, wenn der Diabetes manifest wird. Da hohe Insulinspiegel normalerweise die hepatische Gluconeogenese und den Glucoseausstoss supprimieren, trägt die Insulinresistenz der Leber erheblich zu dem erhöhten Nüchternglucosespiegel des Diabetikers bei. In diesem Zusammenhang bezeichnet der Begriff Glucosetoxizität eine Verstärkung, einerseits der Resistenz der insulinabhängigen Zielgewebe, als auch über eine Störung der Signaltransduktion, der Insulinsekretionsstörung.

Vieles spricht dafür, dass die Insulinresistenz das Ergebnis von molekularen Defekten der Insulinwirkung ist (Bloomgarden 1998), wobei die Signaltransduktionskette auf allen Ebenen, vom Insulinrezeptor bis hin zu den Effektorsystemen, gehemmt oder gestört sein kann. Die Struktur des Insulinrezeptors scheint nur in seltenen Fällen an der Entstehung der Insulinresistenz beteiligt zu

sein. Punktmutationen führen nicht zu einer Insulinresistenz und nur sehr seltene polygene Mutationen sind in Einzelfällen für eine Insulinresistenz verantwortlich (Kellerer, Lammers et al. 1999). Auf Rezeptorebene konnte schliesslich eine stärkere Downregulation der höher insulinaffinen Insulinrezeptor- Isoform A in insulinresistenten Geweben festgestellt werden. Dieser Effekt ist möglicherweise aber auch der Hyperinsulinämie zuzuschreiben (Kellerer, Lammers et al. 1999). Auf der Ebene der Signaltransduktion hat die PI- 3- Kinase eine entscheidende Bedeutung. Sie leitet das Signal in Richtung der Glucosetransporter (Glut), und aktiviert die Proteinkinase B (PKB), die bei der Glucoseaufnahme, Glykolyse, Glykogensynthese und Proteinsynthese beteiligt ist. Weiterhin leitet ein anderer Signalweg über die PI- 3- Kinase zu der Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAP), über die mitogene Insulineffekte vermittelt werden. Durch Serinphosphorylierung bestimmter Kopplungsproteine, vor allem des Insulinrezeptorsubstrats IRS- 1, kann die PI- 3- Kinase dabei eine Veränderung der Signalweiterleitung bewirken und somit auf diese regulatorisch einwirken. An der Insulinsignaltransduktion ist dennoch eine Vielzahl weiterer Substanzen beteiligt (Kellerer, Lammers et al. 1999). Andere Studien konzentrieren sich auf die Untersuchung bestimmter Proteine, wie den Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Plasminogen- Aktivator- Inhibitor I (PAI- I), die von Adipozyten von insulinresistenten Typ II Diabetikern vermehrt sezerniert werden und dabei offensichtlich Insulinresistenz- fördernd wirken (Juhan-Vague and Alessi 1993; Hotamisligil and Spiegelman 1994). TNF- α wird dabei eine Schlüsselrolle als Bindeglied zwischen Adipositas einerseits und Insulinresistenz und Typ II Diabetes andererseits zugeschrieben (Hotamisligil and Spiegelman 1994).

2.7 Dyslipoproteinämien beim Typ II Diabetes

Eine erweiterte Definition der Insulinresistenz muss auch deren pathophysiologische Bedeutung, deren Ursachen und Folgen mit einschliessen, insbesondere die Dyslipidämien und die kardiovaskulären Erkrankungen, welche eng mit dem Typ II Diabetes assoziiert sind. Eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der diabetischen Dyslipidämie spielen die freien Fettsäuren (fFS), die aus dem intraabdominellen Fettgewebe durch Lipolyse in den Blutkreislauf freigesetzt werden. Bedingt durch die Insulinresistenz wird der normalerweise hemmende Effekt des Insulins auf die Lipolyse abgeschwächt, was in erhöhten Konzentrationen fFS im Blut

resultiert und eine verstärkte Synthese von VLDL- Partikeln und Apolipoprotein B (ApoB) in der Leber nach sich zieht. Zusätzlich zu dem erhöhten Substratangebot an fFS konkurrieren nach der Nahrungsaufnahme die Chylomikronen aus dem Darm mit den VLDL- Partikeln zunächst um die Hydrolyse durch die Lipoproteinlipase (LpL) und im Anschluss um die Aufnahme an dem gemeinsamen hepatischen Rezeptor. Die Triglyzerid- reichen Remnants- Partikel verweilen dadurch länger in der Zirkulation und werden währenddessen mit Cholesterin, ApoE, ApoC- III und ApoC- I angereichert (Bjorkegren, Hamsten et al. 1997; Bjorkegren, Karpe et al. 1998). Zusätzlich verschlechtert wird die Situation durch ein Überangebot an Nahrung, insbesondere wenn der Fettgehalt der Nahrung die aktuellen Bedürfnisse überschreitet und dadurch der Aufnahmemechanismus der Nahrungsfette ineffektiv wird. Aus der physiologischen postprandialen Lipämie entwickelt sich eine exzessive postprandiale Lipämie, die mit der Entstehung von potentiell atherogenen Remnants- Partikeln aus Triglyzerid- reichen Lipoproteinen in Verbindung gebracht wird (Zilversmit 1979; Karpe, Hellenius et al. 1999). Während die grossen Chylomikronen auf Grund ihrer Grösse und kurzen Verweildauer im Plasma als nicht besonders atherogen eingestuft werden (Karpe, Hellenius et al. 1999), sind die Chylomikronen- Remnants (CR) in der Lage in das Endothel einzudringen, und haben eine vergleichbare Verweildauer im Plasma wie VLDL- Remnants der gleichen Grösse (Karpe 1997). Bei ansonsten ähnlicher Lipid- und Apolipoprotein- Zusammensetzung kennzeichnet ApoB₄₈ die intestinale Herkunft der Triglyzerid- reichen Lipoproteine (Bjorkegren, Karpe et al. 1998). Die exzessive postprandiale Lipämie ist charakteristisch für die diabetische Dyslipidämie, selbst bei diabetischen Patienten mit normalen Triglyzeridkonzentrationen im Hungerzustand (Taskinen and Smith 1998). Schlüsselkomponenten der diabetische Dyslipidämie sind jedoch erhöhte VLDL- Triglyzerid- Spiegel, erniedrigtes HDL- Cholesterin, bei normal bis leicht erhöhten Konzentrationen des LDL- Cholesterins. Dennoch sind selbst leichte Erhöhungen des LDL- Cholesterins bei Typ II Diabetikern assoziiert mit einer deutlichen Zunahme des Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen. Auf Grund einer veränderten Zusammensetzung der Lipidpartikel bei der diabetischen Dyslipidämie haben diese ein höheres atherogenes Potential als bei Dyslipidämien im allgemeinen (Taskinen 2002). Bedingt durch erhöhte Triglyzeridspiegel, und der daraus verzögerten Clearance der Remnants- Partikel, werden sowohl LDL- als auch HDL- Partikel mittels dem Cholesterolestertransferprotein (CETP) mit Cholesterolestern

(CE) aus den Triglyzerid- reichen Lipoproteinen angereichert. Durch die im Anschluss folgende Hydrolyse durch die Hepatische Lipase (HL) entstehen kleine, dichte LDL- Partikel, sogenanntes LDL- Typ B, welches besonders leicht oxidierbar ist und frühzeitig an die Proteoglykane der Arterienwände bindet und stark atherogen wirkt. Demzufolge scheinen die kleinen dichten LDL- Partikel vor allem ein Marker für eine frühe vaskuläre Schädigung zu sein und sind eng an den Begriff der endothelialen Dysfunktion gekoppelt, insbesondere bei diabetischen Patienten (Makimattila, Liu et al. 1999). Bezüglich der HDL- Partikel zeigt sich zusätzlich zu den erniedrigten Plasmaspiegeln ebenfalls eine Zunahme kleiner HDL- Partikel und eine Abnahme der HDL₂- Fraktion. Neben den erhöhten Triglyzeridspiegeln scheint dabei eine verminderte Ratio von LpL und HL eine Rolle zu spielen, wobei letztlich die veränderte Zusammensetzung der HDL- Partikel zu einer beschleunigten Katabolisierung der HDL- Partikel führt und ein Absinken der HDL- Konzentration nach sich zieht. In Wirklichkeit sind an diesem Prozess viele weitere Faktoren beteiligt, beispielsweise das Apolipoprotein M, ApoA- I und ApoA- II, das Phospholipidtransferprotein (PLTP), die HL, das CETP, die LpL und die Lecithin- Cholesterol- Acyltransferase (LCAT), von denen wiederum mehrere durch die Insulinresistenz selbst verändert sind (Taskinen 2002). Insgesamt sind die Atherome durch drei Komponenten verursacht, die alle bei diabetischen Patienten erhöht sind: kleine dichte LDL, kleine dichte HDL und cholesterolreiche Remnants (Taskinen 2002). Trotz des Erfolges der Statine in der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen gibt es eine zunehmende Zahl an Patienten, bei denen die Senkung des LDL- Cholesterins nicht primäres, bzw. alleiniges Behandlungsziel sein sollte. Klinisch zeigt sich bei der ständig wachsenden Zahl von Adipositasfällen häufig eine Kombination von leichter bis mässiger Hypertriglyzeridämie, niedrigem HDL, bereits niedrigem LDL- Cholesterin und einer exzessiven postprandialen Lipämie (Couillard, Bergeron et al. 1998; Mekki, Christofilis et al. 1999). Dennoch fehlen bislang prospektive Studien, die zeigen, dass eine exzessive postprandiale Lipämie mit zukünftigen kardiovaskulären Ereignissen verknüpft ist (Karpe 2002). Die Brisanz dieser Thematik wird durch epidemische Studien verdeutlicht: die Zahl der Typ II Diabetiker wird im Jahr 2025 weltweit mehr als 300 Millionen betragen, woraufhin einer Welle kardiovaskulärer Erkrankungen folgen wird (Taskinen 2002).

2.8 Ziel der Arbeit

Bei Patienten mit Insulinresistenz konnte eine verzögerte Remnant- Clearance beschrieben werden (Ai, Tanaka et al. 2001). Ähnlich der Funktionsweise des Glucosetransporters Glut4 (Shepherd and Kahn 1999), konnte in Adipozyten gezeigt werden, dass die Translokation von LRP1 durch Insulin induziert wird (Descamps, Bilheimer et al. 1993; Zhang, Links et al. 2004). Da das Fettgewebe im Gegensatz zur Leber quantitativ für die Aufnahme postprandialer Chylomikronen- Remnants (CR) jedoch eine untergeordnete Rolle spielt, soll in dieser Arbeit untersucht werden ob Insulin eine Translokation von LRP1 aus intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran von Hepatozyten induziert, und ob dieser Prozess quantitativ an der Aufnahme Triglyzerid- reicher Lipoproteine beteiligt ist. Diese Fragestellung soll mit verschiedenen Ansätzen anhand bereits etablierter zellbiologischer Methoden bearbeitet werden. Dazu werden zunächst Triglyzerid- reiche Chylomikronen aus dem Plasma von Patienten mit einer Hyperchylomikronämie mittels Ultrazentrifugation isoliert. Die Chylomikronen werden in vitro hydrolysiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen bzw. radioaktiv markiert. Im ersten Teil der Arbeit soll mit Hilfe der Immunfluoreszenz qualitativ die Insulin- induzierte LRP1- Translokation in Insulin- sensitiven FAO- Zellen (Rattenhepatomazellen) und Huh7- Zellen (humane Hepatomazellen) untersucht werden. Als Kontrolle für diese Experimente dienen dabei Insulin- sensitive humane mesenchymale Stammzellen, bei denen eine Insulin- abhängige Translokation bereits gezeigt werden konnte. Weiterhin soll die Bindung und Aufnahme der CR und des LRP1- spezifischen, Rezeptor- assoziierten Proteins (RAP), untersucht werden. Im zweitem Teil der Arbeit soll in den selben Zellmodellen die Bedeutung von Insulin auf die LRP1- abhängige CR- und Lactoferrin (Lf)- Aufnahme quantitativ in Aufnahmeexperimenten mit radioaktiv markierten Liganden untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Zellkultur Brutschrank	Binder
Zellkultur Werkbank Hera Safe	Heraeus
Wasserbad GFL 1083	
Absaugpumpe Zellkultur	
Neubauer Zählkammer	
Lichtmikroskop,	
Objektive Sp Plan 10 x, CD Plan 20 x und 40 x	Olympus
Waage 1406 MP	Sartorius
Thermomixer Copact	Eppendorf
Laborzentrifuge 1- 15K	Sigma
Ultrazentrifuge L7- 55 mit Swing out Rotor SW 41 und passenden Zentrifugationsröhrchen	Beckman
Laborzentrifuge Rotanta RP	Hettich
Gammacounter Cinigamma	LKB
Mikroskop Axiovert 100, mit Fluoreszenzeinrichtung, Objektiv Ph 3 Planapochromat 63 x, n. A. 1, 25 Öl	Zeiss
Konfokales Mikroskop Axiovert 200 M	Zeiss
Vortexer IKA- Vibor- Fix VF2	Jahnke & Kunkel
Bio Photometer	Eppendorf
Schüttler GFL3020	
Tischabsaugpumpe Ecom- P 4153	
Präzisionspipetten	Eppendorf
ELISA Reader	Dynatech Laboratories

3.2 Verbrauchsmittel

Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc und Falcon bezogen. Die Objektträger (Superfrost/ Plus, 75 x 25mm), sowie die Coverslips für die Immunfluoreszenz waren von Assistent. Die Pinzette (Inox 5/ 45) von A. Dumont & Fils. Das verwendete Filterpapier war von der Firma Schleicher und Schuell.

Sterilfilter der Porengrösse 0,45 μm lieferte die Firma Sarstedt. Dialyseschläuche mit 10 kDa waren von Serva, PD- 10- Gelchromatographiesäulen Sephadex G- 25 von der Firma Amersham Biosciences. Parafilm M wurde von National Can bezogen, alle Plastikwaren zur Inkubation stammten von der Firma Nunc. Für die Messungen der radioaktiven Proben wurden γ - Counter Röhren von Packard BioScience benutzt.

3.3 Chemikalien

Es wurden Chemikalien mit grösstem Reinheitsgrad benutzt (p. a.), bzw. in HPLC-Reinheit verwendet. Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma Chemie (Steinheim) bezogen.

3.4 Zellen

- Tert4, adulte mesenchymale Stammzellen (Simonsen, Rosada et al. 2002)
- FAO, Rattenhepatomazellen (Deschatrette and Weiss 1974)
- Huh7, humane Hepatomazelllinie aus dem UKE, Hamburg (Nakabayashi, Taketa et al. 1982)

3.5 Zellkultur

a) Material

- Zellkulturmaterialien aus Kunststoff (Nunc)
- Komplettmedium:
 - Dulbeco`s Modified Eagle Medium (DMEM), (GIBCO)
 - 10% Fötale Kälberserum (FCS), (GIBCO)
 - 1% Penicillin/ Streptomycin (GIBCO)
- Serumfreie Medien:
 - DMEM (GIBCO) als Hungermedium
 - DMEM (GIBCO) + 2% BSA (Bovines Serum Albumin Fraktion V, PAA)
für Inkubation mit Antikörpern/ Liganden
- PBS (Phosphate Buffer Saline) (GIBCO)
 - 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 8,1 mM Na_2HPO_4 , pH=7,4
- Trypsin/ EDTA- Lösung (GIBCO)

→ 10 x Trypanblaulösung (GIBCO)

→ DMSO (Sigma)

b) Methoden

Ausgangspunkt zentraler Experimente dieser Arbeit ist die Zellkultur. Deshalb sollen im folgenden die allgemeinen Arbeitsregeln, welche für die unterschiedlichen Zelllinien ähnlich sind, vorab erläutert werden. Voraussetzung für ein gutes Gelingen ist das Arbeiten unter sterilen Bedingungen, erzeugt durch eine spezielle Werkbank (Hood). Die Zellen lagern in flüssigem Stickstoff bei -196°C und werden dem Tank vorsichtig entnommen und bei 37°C aufgetaut. Sie werden unter Zugabe von 10 ml Komplettmedium in ein 12 ml Falcon- Röhrchen überführt und 5 min. bei $400 \times g$ zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wird das Zellpellet in einer adäquaten Menge Komplettmedium resuspendiert und auf die entsprechenden Zellkulturflaschen verteilt. Mit dem selben Medium wird die Zellkulturflasche auf das vorgegebene Volumen aufgefüllt. Die Zellen wachsen ca. 48 h bis zur Konfluenz. Um die dicht gewachsenen Zellen aus der Flasche lösen zu können, werden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschliessend mit einer 1%igen Trypsinlösung für ca. 3 min. bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wird unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und bei Bedarf durch seitliches Klopfen gegen die Zellkulturflasche unterstützt. Die Wirkung des Trypsins wird durch Zugabe von ca. 5 ml Medium inhibiert und die Zellsuspension wird in ein Röhrchen überführt, dem ein $20 \mu\text{l}$ Aliquot für die Zellzählung entnommen wird. Diesem Aliquot werden $20 \mu\text{l}$ Trypanblaulösung zugegeben, welches in abgestorbene Zellen einzudringen vermag. Die genaue Zellzahl lebender Zellen wird durch das Auszählen der 16 Kleinquadrate der Neubauer- Zählkammer bestimmt und errechnet ($\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnung} \times 10^4$). Für die unterschiedlichen Experimente kann nun die Zellsuspension auf die gewünschte Zellzahl eingestellt werden und die Zellen können in den geeigneten Zellkulturgefässen ausgesät werden.

3.6 Präparation von humanen Chylomikronen- Remnants

a) Material

- Plasma von ApoC- II, bzw. Lipoproteinlipase (LpL) defizienten Patienten
- PBS (GIBCO)
- 60%ige Sucrose- Lösung (Sigma)
- Protease- Inhibitor- Lösung (PIC):
 - 1 mM Pepstatin (Calbiochem)
 - 10 mM Chymostatin (Calbiochem)
 - 10 mM Leupeptin (Calbiochem)
 - 10 mM Antipain (Calbiochem)
- Na- Azid (Sigma)
- LpL (zur Verfügung gestellt von T. Olivecrona, Umea, Schweden)

b) Methoden

Für die Präparation von humanen Chylomikronen- Remnants (CR) wurde das Plasma von Patienten mit einer Hypertriglyzeridämie Typ I verwendet. Auf Grund des kongenitalen Fehlens von ApoC- II und einer Verminderung der LpL- Aktivität kommt es zu einer erheblichen Akkumulation der Chylomikronen im Plasma dieser Patienten. Durch Ultrazentrifugation des Plasmas, 60 min bei 4° C, sammeln sich die Chylomikronen, bedingt durch ihre geringe Dichte, am oberen Rand des Zentrifugenröhrchens. Nach Abnahme dieser Schicht und Resuspension in 3 ml PBS, wurde die Lösung mit Sucrose beschwert, unter PBS geschichtet und im Anschluss wurde 3 weitere Male zentrifugiert. Die Zugabe von PIC und Na- Azid zu den gereinigten Chylomikronen ermöglichte die Lagerung bei 4° C. Für die Isolierung von CR wurde das Plasma der Patienten jeweils direkt mit boviner LpL inkubiert (Heeren, Niemeier et al. 2002; Niemeier, Gafvels et al. 1996), die von Frau Prof. Olivecrona zur Verfügung gestellt wurde (Egelrud and Olivecrona 1972). Die Aufreinigung der CR erfolgt im Anschluss durch erneute Ultrazentrifugation. Nach Anreicherung mit ApoE konnten die CR für die funktionellen Experimente eingesetzt werden.

3.7 Markierung von Liganden

3.7.1 Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Markierung des Rezeptor- assoziierten Proteins (RAP) und der Chylomikronen- Remnants (CR) ist von Dr. A. Laatsch durchgeführt worden und die markierten Liganden wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Markierung wurden 0,5- 1,0 mg RAP in 0.9 ml PBS in ein Röhrchen mit dem getrocknetem, aktivierten Farbstoff Alexa Fluor 488 gegeben. Nach vollständiger Auflösung des Farbstoffes wurden 100 μ l 1 M NaHCO_3 zugegeben und für 30 min. im Dunkeln bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 100 μ l 1M TRIS/ HCL, ph 7,4, wurde die Reaktion gestoppt. Die Abtrennung des markierten Liganden von überschüssigem, freiem Farbstoff erfolgte durch Ausschlusschromatographie mit einer PD10- Säule. Die Markierung der CR erfolgte mit derselben Methode, wobei zur Markierung Cy 3- Monoreactive Dye Pack (Amersham Biosciences) benutzt wurde.

3.7.2 Radioaktive Markierung

a) Material

- Lactoferrin (Lf)- Lösung
- Chylomikronen (CM)- Lösung
- Na^{125} Jodid (Amersham, Braunschweig)
- Glycinpuffer (1 M Glycin, mit 1 N NaOH auf pH 10 eingestellt)
- Jodmonochlorid- Lösung (3,3 mM JCl, 2 M NaCl in 0,1 N HCl)

b) Methoden

Die radioaktive Markierung von Lactoferrin (Lf) und der mit ApoE angereicherten Chylomikronen- Remnants (CR) wurde aus Sicherheitsgründen von Dr. J. Heeren nach der Jodmonochlorid- Methode durchgeführt (Mc Farlane, 1958). Es wurden 5 mg Lf, bzw. 1 mg CR mit PBS auf ein Volumen von 1ml gebracht. Dazu wurden 800 μ l Glycinpuffer gegeben. In 200 μ l des Glycinpuffers wurden 6 μ l Na^{125} Jodid (22 MBq) pipettiert, und der jeweiligen Ligandenlösung beigefügt. Mit der Zugabe von 40 μ l Jodmonochlorid- Lösung wurde für zwei Minuten bei RT inkubiert.

Im Anschluss wurde das freie Jod über eine PD- 10 Säule (Sephadex G- 25) entfernt. Die Säule wurde mit 2 ml PBS äquibriert und mit je 2 ml der Ligandenlösungen und 1 ml PBS zum Waschen beladen. Die mit ¹²⁵J- markierten Liganden wurden mit 2 ml PBS eluiert, der radiaktive Müll wurde in gesonderten Behältern gelagert.

3.8 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

a) Material

→ DMEM (GIBCO)

→ Assaypuffer:

DMEM mit 2% BSA (FraktionV) (Sigma)

→ Insulin (Sigma):

Stock 10 mg/ ml in 25 mM Hepes pH= 8, 5, bei 4⁰ C

Verdünnung 1:100 in DMEM (GIBCO)

→ Puffer:

A: 0,5% Glycin (ROTH) in PBS

B: 0,5% Glycin (ROTH) mit 0,05% Saponin (Sigma) in PBS

→ Blockinglösung:

Puffer A/ B mit 2% BSA

→ Primäre Antikörper:

Bezeichnung	Firma	Herkunft	Antigen/ Grösse	Verdünnung
αLRP1- 8G1	Pro Gen, 61065	Maus/ Monoklonal	anti 515 kDa- LRP1- Fragment	1:20- 100
αLRP1- 5A6	Pro Gen, 61066	Maus/ Monoklonal	anti 85 kDa- LRP1- Fragment	1:50
αLRP1- 8B8	Pro Gen	Maus/ Monoklonal	anti 85 kDa- LRP1- Fragment	1:50

Tab.1: Primäre Antikörper

Aufgeführt sind die verwendeten primären Antikörper (siehe Abb. 3, 4, 5; S. 47- 49).

→ Sekundärer Antikörper:

Antigen	Firma	Verdünnung
Esel anti Maus F(ab') Fragment	Jackson Immuno Research	1:500- 1000
Konjugiertes Fluorochrom	Max. Absorption	Max. Emission
Cy 3 (Indocarbocyanin)	550 nm	570 nm

Tab. 2: Sekundärer Antikörper

Dargestellt ist der eingesetzte sekundäre Antikörper, der mit dem Fluorochrom Cy 3 konjugiert ist (siehe Abb. 3, 4, 5; S. 47- 49).

→ Fixationslösung:

4% PFA (Paraformaldehyd) (Sigma) in PBS

→ 4',6- Diamidino- 2- Phenyl- Indole, (DAPI) (Sigma)

→ 0,1% PPD (1,2 Phenylendiamin) (Merck) in Mowiol (Calbiochem)

→ Nagellack

b) Methoden

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Coverslips in 6- well Platten kultiviert und 24 h später wurde das Kompletmedium durch Serum- freies Medium ersetzt. Nach dem 12- stündigen Aushungern sollen die Zellen eine nicht zu hohe Dichte erreicht haben, um eine optimale mikroskopische Auswertung zu ermöglichen. Die bewachsenen Coverslips wurden mit 80 µl einer 100 nM konzentrierten Insulin/ DMEM- Lösung für 15 min bei 37° C inkubiert. Für den späteren Vergleich hinsichtlich eines Insulineffektes wurden parallel Coverslips ohne Zusatz von Insulin mit 80 µl DMEM inkubiert. Anschliessend wurden die Coverslips kurz in kaltes PBS getaucht und es folgten 15 min. Inkubation in 4% PFA/ PBS bei RT für die Fixierung. Danach wurde 5 x 5 min. in PBS gewaschen, einige Coverslips wurden im Anschluss 5 min. in PBS/ Glycin/ Saponin getaucht, um die Zellen zu permeabilisieren. Blockiert wurde für 30 min. bei 37° C mit je 80 µl 2% BSA in PBS/ Glycin oder 2% BSA in PBS/ Glycin/ Saponin für die permeabilisierten Zellen. Für die Immundetektion gegen LRP1 wurde der erste Antikörper der Blockinglösung zugegeben und mit 80 µl für eine Stunde bei 37° C inkubiert, 2 x 5 min. mit PBS/ Glycin oder entsprechend mit PBS/ Glycin/ Saponin gewaschen und weitere 45 min. mit dem zweiten

fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert. Wiederholt wurde 5 x 5 min. in PBS gewaschen und für die Kernfärbung wurden die Coverslips für 3 min. mit DAPI in PBS inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Coverslips mit 7 µl PPD/Mowiol (25 µl 1% PPD + 225 µl Mowiol) eingedeckelt und 30 min. später mit Nagellack luftdicht abgeschlossen. Die Auswertung erfolgte je nach verwendetem Antikörper und Wellenlänge des Lichts am Fluoreszenzmikroskop bzw. am konfokalen Mikroskop.

3.9 Zelluläre Aufnahme/ Bindung mit Hilfe der Immunfluoreszenz

a) Material

→ siehe 3.8. indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

→ Lipoproteinlipase (LpL) (2 µg/ ml)

→ Tetrahydrolipstatinstammlösung (THL) 50 mg/ ml EtOh (Orlistat)

→ Liganden

Rezeptor- assoziiertes Protein (RAP), fluoreszenzmarkiert mit Alexa Fluor 488, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. A. Laatsch, Hamburg
Chylomikronen (CM)- Cy 3, markiert mit Monoreactive Dye Pack (Amersham Biosciences)

→ Inkubationslösungen:

CM- Cy3		RAP- Alexa 488	
Aufnahme 37° C	Bindung 4° C	Aufnahme 37° C	Bindung 4° C
10 µg/ ml, 50 µg/ ml	50 µg/ ml	5 µg/ ml, 10 µg/ ml, 20 µg/ ml	500 µg/ ml
+/- LpL	LpL		
+/- THL	THL		
10% BSA		10% BSA	
DMEM		DMEM	

Tab. 3: Zusammensetzung der Inkubationslösung für die Bindungs/ Aufnahmeassays

Dargestellt sind die Inkubationslösungen, mit unterschiedlichen Konzentrationen der Liganden RAP-Alexa 488 und CM- Cy 3 für die Bindungs/ Aufnahmeassays (siehe Abb. 6, 7; S. 50- 51; Abb. 8- 10; S. 52- 54).

b) Methoden

Einschliesslich der 15 minütigen Inkubation der Zellen bei 37° C jeweils mit 80 µl der Insulin/ DMEM- Lösung, bzw. für den Vergleich ohne Insulinzusatz mit 80 µl DMEM erfolgt dieser Versuch analog dem Beginn der Immunfluoreszenz. Nach der Inkubation wurden diejenigen Coverslips mit den Zellen, an welchen die Bindung der Liganden demonstriert werden sollte sofort auf Eis gestellt und auf die Coverslips wurde 80 µl eiskaltes PBS pipettiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit der Inkubationslösung entsprechend der Tab. 3 (siehe S. 39), 30 min. weiterhin auf Eis gekühlt und bei 4° C Umgebungstemperatur inkubiert. Die Coverslips mit den Zellen für die Darstellung der Aufnahme der Liganden wurden mit 80 µl der auf 37° C erwärmten Inkubationslösung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Liganden für 10 min. inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Coverslips kurz in kaltes PBS getaucht und 30 min. in 4% PFA/ PBS bei RT fixiert. Nach 5 x 5 min. Waschen in PBS wurden die Coverslips 10 min. in PBS/ Glycin/ Saponin getaucht. Zum Abschluss erfolgte die Kernfärbung mit DAPI, das Eindeckeln der Coverslips mit Mowiol/ PPD und das luftdichte Abschliessen mit Nagellack, wie bereits unter 3.8 beschrieben wurde.

3.10 SDS- Page und Autoradiographie

a) Material

→ Trenngel aus je 10 ml:

1. Acrylamidlösung ($Y\% \times 4 = X \text{ g}$)
X g Acrylamid (M= 71,08; Roth)
0,4 g Bisacrylamid (M= 154,2; Serva) ad 100 ml Aqua bidest
2. Untergelpuffer:
1,7 M Tris- HCL (Roth), ph 9,18 mit 18%iger HCl
3. Temedlösung:
0,6 ml Tetramethylethylendiamin (TEMED; Serva)
4. AP- Lösung:
200 mg Ammoniumpersulfat ad 100 ml Aqua bidest

→ Sammelgel aus:

1. 5 ml Acrylamidlösung
12 g Acrylamid (Roth)

0,8 g Bisacrylamid (M=154,2; Serva) ad 100 ml Aqua bidest

2. 5 ml Obergelpuffer:

0,2 M Tris- HCl (Roth), ph 6,14 mit 1 N H₂SO₄

3. 2 ml AP- Lösung:

200 mg Ammoniumpersulfat ad 100 ml Aqua bidest

4. 8 ml Aqua bidest

5. 20 µl unverdünntes TEMED

→ unterer Elektrodenpuffer:

0,24 M Tris- HCL (Roth) mit 18% HCl, ph 9,5

→ oberer Elektrodenpuffer:

0,04 M Borsäure (Roth)

0,04 M Tris- HCL (Roth)

0,1% SDS (Serva), ph 8,64

→ Probenpuffer:

5% SDS in 50 mM Tris- HCL (Roth)

→ β- Mercaptoethanol (Serva)

→ Glycerin- Bromphenolblau- Lösung:

Bromphenolblau- Spatelspitze in Aqua bidest lösen

87% Glycerin mit Bromphenolblau- Lösung auf 80% verdünnen

→ Unspezifische Färbung:

1. Coomassie- Lösung:

0,1% Coomassie in Methanol/ Eisenessig/ Aqua bidest
(50:10:40)

→ Entfärberlösung:

Methanol/ Eisenessig/ Aqua bidest (50:10:40)

→ Spezifische Detektion:

Röntgenfilm (Kodak)

b) Methoden

Die gelelektrophoretische Auftrennung der mit ¹²⁵I radioaktiv markierten Liganden wurde nach der Methode der diskontinuierlichen Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page) nach Neville (Neville 1971) durchgeführt. Das Trenngel, mit welchem die Auftrennungsgenauigkeit bestimmt wird, wurde 10%ig gegossen, das Sammelgel enthielt 3% Acrylamid. Um eine genaue Darstellung der Proteine zu erzielen, wurde eine

definierte Menge der Probe 2 x mit 1 ml einer Methanol- Chloroform- Mischung (8:5) versetzt. Bei diesem sogenannten Delipidierungsprozess nach Folch, bilden die nicht löslichen, delipidierten Apolipoproteine nach einer Zentrifugation mit 13000 rpm das Zellpellet (Folch, Lees et al. 1957). Mit dem Zusatz einer 10% SDS- Lösung (Endkonzentration 1%) wurde das Pellet resuspendiert und mit Bromphenolblau und β - Mercaptoethanol entsprechend einer Endkonzentration von 1% vermischt. Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch Kochen der Proben für 10 min. bei 95° C. Jeweils 10.000 CPM der Proben wurden nach deren Abkühlung auf das Gel aufgetragen. Für die spätere Zuordnung der Molekulargewichte wurde parallel zu den Proben ein Proteinstandard aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei konstanten 30 mA für 2- 4 Stunden. Anschliessend wurde das Gel mit der unspezifischen Proteinfärbung Coomassie für 20 min. gefärbt und wiederum mit der Entfärbelösung über Nacht entfärbt, bis sich nur noch die Proteinbanden darstellten. Nach Trocknen des Gels wurde es gemeinsam mit einem Röntgenfilm in eine spezielle Kassette gelegt und für die autoradiographische Darstellung ca. 20 Stunden bei - 80° C belichtet und abschliessend entwickelt.

3.11 Quantifizierung der zellulären Aufnahme mit radioaktiv markierten Liganden

a) Material

→ DMEM (GIBCO)

→ Assaypuffer:

DMEM mit 2% BSA (Fraktion V)

→ Insulin (Sigma):

Stock 10 mg/ ml in 25 mM HEPES pH= 8,5, bei 4° C

Verdünnung 1:100 in DMEM (GIBCO)

→ ¹²⁵I- Lactoferrin (Lf)

→ ¹²⁵I- Chylomikronen- Remnants (CR)

→ Transferrin (Sigma)

→ PBS (GIBCO)

→ Heparinpuffer:

Heparin (Liquemin, N 25.000 I.E., Heparin- Natrium) (Roche)

200 U/ ml PBS (Liquemin 2000; Roche)

→ Lysispuffer:

0,1 N NaOH

Liganden	¹²⁵ I- Lf	¹²⁵ I- CR
Konzentration	2 µg/ µl	0,2 µg/ µl
Aktivität (CPM/ µl)	17.000	15.800
Zielmenge (CPM/ well)	100.000	

Tab.4: Radioaktive Liganden

Dargestellt sind die radioaktiv markierten Liganden, ¹²⁵I- Lactoferrin (Lf) und ¹²⁵I- Chylomikronen-Remnants (CR), ihre Konzentration, Aktivität in CPM/ µl und die vorgegebene Gesamtaktivität von 100.000 CPM pro well.

	¹²⁵ I- Lf		¹²⁵ I- CR	
Zielkonzentration	25 µg/ ml	100 µg/ ml	2,5 µg/ ml	10 µg/ ml
Eingestztes Volumen	40,7 µl	162,8 µl	40,7 µl	162,8 µl
Insulin (100 nM)	-/+ 32,5 µl		-/+ 32,5 µl	
Transferrin (10 mg/ ml)	325 µl			
2% BSA/ DMEM	ad Gesamtvolumen von 3,25 ml			
Inkubation mit 500 µl pro well				

Tab. 5: Radioaktive Inkubationslösungen

Dargestellt ist die Zusammensetzung der Inkubationslösungen, die für die radioaktiven Aufnahmeexperimente (siehe Abb. 12- 15; S. 57- 60) verwendet wurden.

b) Methoden

Die Zellen werden in 12- well Platten ausgesät und wachsen 24 h bis das Komplettmedium durch Serum- freies Medium ersetzt wird. Nach dem 12- stündigen aushungern der Zellen, zum Zeitpunkt des Experimentbeginns, zeigte sich für beide Zelllinien, FAO und Huh7, dass nach einer anfänglichen Dichte von 200.000 Zellen/ ml die Zellen nun konfluent gewachsen waren. Die Aufnahme soll in zwei unterschiedlichen Konzentrationen der radioaktiv markierten Liganden getestet werden, wobei jeweils die Zellen mit Zugabe gleicher Ligandenkonzentrationen in zwei Ansätzen, ohne und mit vorheriger Inkubation mit Insulin verglichen werden. Das Insulin wird mit DMEM auf eine Konzentration von 100 nM verdünnt und die Zellen werden zunächst mit 500 µl dieser Lösung bzw. parallel mit 500 µl DMEM ohne Insulinzusatz für 15 min. bei 37° C inkubiert. Anschliessend wird die Lösung gewechselt und die Zellen werden mit 500 µl von dem entsprechenden Ansatz der radioaktiven Inkubations- Lösung für 30 min. bei 37° C inkubiert. Die Lösungen

basieren auf 2% BSA/ DMEM und enthalten neben den Liganden in den zwei unterschiedlichen Konzentrationen, Insulin in den Ansätzen, welche auch zuvor mit Insulin inkubiert waren und zusätzlich Transferrin (Tf) in den ¹²⁵I- Lactoferrin (Lf)- Ansätzen in einer Konzentration von 10 mg/ ml. Sofort nach Beendigung dieser Inkubationszeit werden die Zellen mit je 1 ml kaltem PBS 2 x 2 min. gewaschen und in folge dessen 2 x 5 min. mit dem Heparinpuffer gewaschen, um möglichst nur die Menge der aufgenommenen, ohne die an der Zelloberfläche gebundenen Liganden über die Radioaktivität bestimmen zu können. Die Zellen werden für 30 min. auf dem Schüttler in 500 µl 0,1 N NaOH gelöst und abschliessend werden die CPM in dem γ-counter gemessen.

3.12 Proteinbestimmung

a) Material

- Albumin Standard (Pierce)
- BIO- RAD Farbstoffkonzentrat (Bio- Rad)
- 0,1 N NaOH

b) Methoden

Um die Aufnahme der radioaktiv markierten Liganden quantitativ zu bestimmen, werden die CPM auf die Gesamtproteinmenge bezogen. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford angewandt (Bradford 1976). Aus einer Albumin- Standardlösung (2 mg/ ml) wird durch Verdünnung eine Proteineichgerade im Bereich 2 bis 0,0625 mg/ ml erstellt. Jeweils 10 µl dieser Lösung werden 90 µl 0,1 N NaOH zugegeben. Für die Kalibrierung des Gerätes wurde 100 µl 0,1 N NaOH verwendet. Je 100 µl der zu messenden Proben werden im Anschluss mit 700 µl H₂O dd und 200 µl Bradford- Reagenz, bestehend aus Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure, gut vermischt. Die Inkubation erfolgt für 10 min. bei RT. Bei der Bindung des Farbstoffes Coomassie brilliant blue an die Proteine im nun sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsspektrum. Die Zunahme der Absorption ist ein Maas für die Proteinkonzentration und wird photometrisch gemessen. Nach Subtraktion des Leerwertes wird die Konzentration der Proben errechnet. Sowohl für die Eichkurve als auch für die Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

4 Ergebnisse

Die Rolle von Insulin auf die Rezeptor- vermittelte Aufnahme Triglyzerid- reicher Lipoproteine wurde im Rahmen dieser Arbeit auf verschiedenen Ebenen untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurde zunächst in unterschiedlichen Zelllinien mit Hilfe der Immunfluoreszenz die Wirkung von Insulin auf die Lokalisation von LRP1 in der Zelle untersucht. Dabei wurde insbesondere der Fragestellung nachgegangen, ob Insulin eine Translokation von LRP1 aus intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran von Hepatomazellen induziert. Ebenfalls mittels Immunfluoreszenz wurde im Anschluss daran der Einfluss von Insulin auf die Lipoprotein- Rezeptor- vermittelte Bindung und Aufnahme untersucht. Für die quantitative Analyse der LRP1- vermittelten Aufnahme von Liganden in Abhängigkeit von Insulin wurden im zweiten Teil der Arbeit Aufnahmeexperimente mit radioaktiv markierten Liganden durchgeführt.

4.1 Charakterisierung humaner Chylomikronen

Bei Patienten mit Typ I Hypertriglyzeridämie führt das kongenitale Fehlen des Faktors ApoC- II und dem damit verbundenen Verlust der Lipoproteinlipase (LpL)- Aktivität zu einer Akkumulation der Chylomikronen im Plasma (Beil, Fojo et al. 1992). Aus dem Plasma dieser Patienten konnten mittels Dichtegradientenultrazentrifugation die Chylomikronen für die Experimente dieser Arbeit isoliert werden, wie in Abschnitt 3.6 unter Material und Methoden beschrieben. Hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus Protein- und Lipidanteilen wurden die Chylomikronen mit standardisierten photometrischen Methoden untersucht. In der Abb. 2 ist die prozentuale und die absolute Zusammensetzung der Chylomikronen, die in zwei unterschiedlichen Präparationen ermittelt wurde, dargestellt.

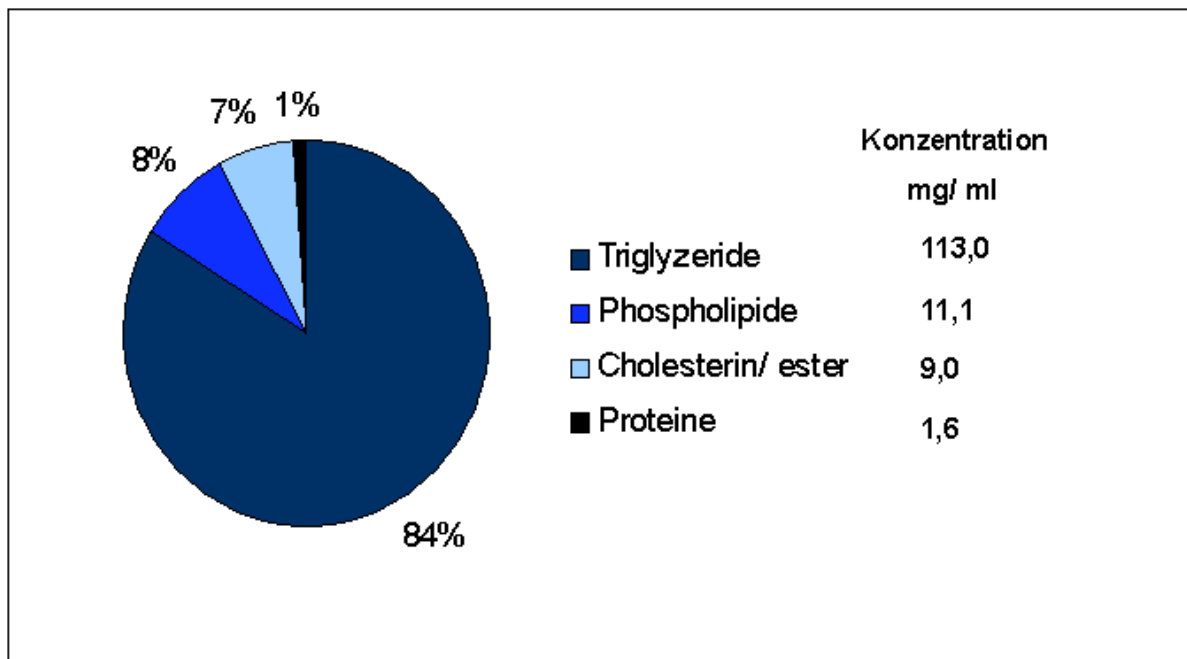


Abb. 2: Zusammensetzung humaner Chylomikronen

Dem Diagramm ist die prozentuale Zusammensetzung humaner Chylomikronen zu entnehmen, parallel dazu ist der Mittelwert für die absolute Konzentration der Lipoprotein- Bestandteile in mg/ ml angegeben. Die Werte wurden in zwei unabhängigen Präparationen ermittelt.

Den Hauptbestandteil humaner Chylomikronen stellen mit 84% die Triglyzeride dar, zu 8% bestehen sie aus Phospholipiden, 7% ist der Anteil an Cholesterin bzw. an Cholesterinestern an der Gesamtmasse. Damit setzen sich die humanen Chylomikronen zu 99% aus Lipiden und zu 1% aus Proteinen zusammen. Die ermittelten Werte stimmen dabei mit den Literaturangaben über die Zusammensetzung humaner Chylomikronen überein (Gotto, Pownall et al. 1986; Havel, Eder et al. 1955; Kane. 1996).

4.2 Translokation von LRP1 in Leberzellen

Zunächst wurden die Effekte von Insulin auf die Lokalisation von LRP1 in der Zelle mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Mit diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob Insulin eine Translokation von LRP1 an die Plasmamembran induziert und ob dies zu einer verstärkten Aufnahme von LRP1- spezifischen Liganden führt. Die Abb. 3 zeigt eine immunhistochemische Färbung von endogenem LRP1 ohne/ mit Insulinstimulation in humanen preadipozytären, mesenchymalen Stammzellen (Simonsen, Rosada et al. 2002), bei denen laut

Literatur eine Translokation von LRP1 detektierbar sein sollte (Descamps, Bilheimer et al. 1993).

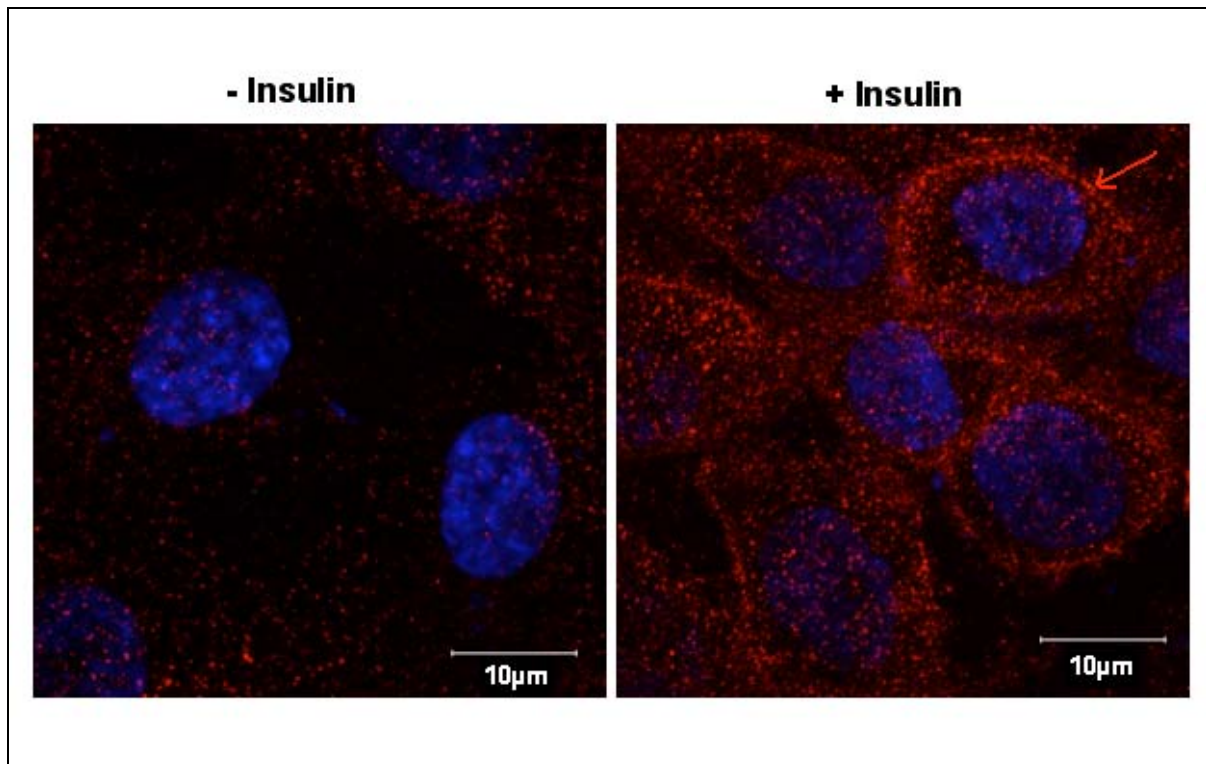


Abb. 3: Insulin- abhängige Lokalisation von LRP1 in nicht- permeabilisierten Tert- Zellen

Tert- Zellen wurden 12 Stunden mittles Serum- freien Medium kultiviert und im Anschluss mit und ohne 100 nM Insulin für 15 min. inkubiert. In nicht permeabilisierten Zellen bindet der verwendete primäre Antikörper 8G1 ausschliesslich an das extrazelluläre 515 kDa- Fragment von LRP1. Durch den Cy 3- konjugierten sekundären Antikörper wird dieses Fragment detektiert und visualisiert. Die Kernfärbung DAPI stellt die Zellkerne blau dar. Nach Insulinstimulation der Zellen wird eine deutliche LRP1- Oberflächenfärbung an den Zellen sichtbar, welche im konfokalem Mikroskop als ringförmige Strukturen sichtbar werden (Pfeil).

Skalierungsbalken: 10 µm

Aus der Abb. 3 wird ersichtlich, dass LRP1 unter dem Einfluss von Insulin in die Plasmamembran transloziert, da der verwendete Antikörper 8G1 ausschliesslich die extrazelluläre Domäne des Rezeptors färbt. Die für murine Zellen beschriebene Translokation von LRP1 in die Plasmamembran konnte somit auch in humanen preadipozytären Stammzellen gezeigt werden, und somit das experimentelle System etabliert werden.

Ähnliche Versuche wurden dann mit einer Hepatoma- Zelllinie aus Ratten (FAO) und der humanen Hepatomazelllinie Huh7 durchgeführt.

Abb. 4 zeigt bei exakt gleichem Versuchsaufbau die Lokalisation von LRP1 ohne und mit Insulinstimulation in der humanen Hepatomazelllinie Huh7.

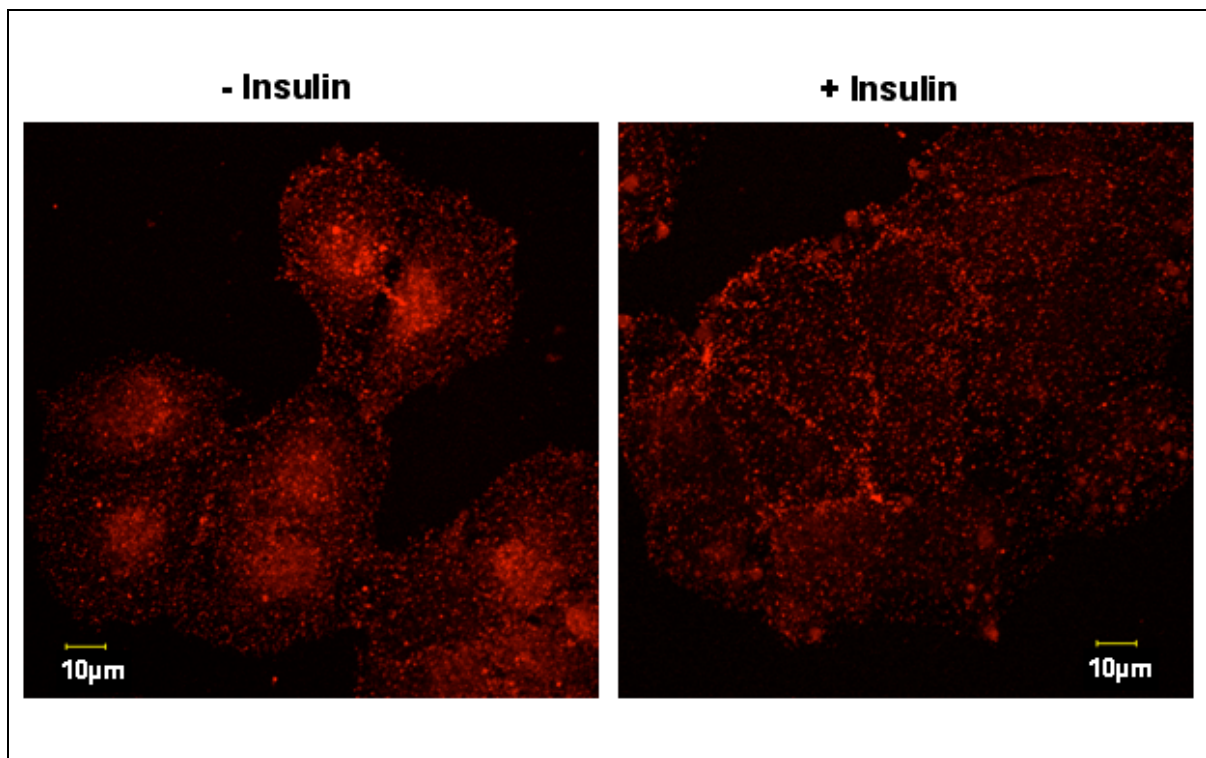


Abb. 4: Insulin- abhängige Lokalisation von LRP1 in nicht- permeabilisierten Huh7- Zellen

Huh7- Zellen wurden über Nacht in Serum- freien Medium kultiviert, für 15 min. mit und ohne Insulin stimuliert, und das extrazelluläre 515 kDa- Fragment des endogen synthetisierten LRP1 wurde in den nicht permeabilisierten Zellen durch den primären Antikörper 8G1 und den sekundären Cy 3- konjugierten Antikörper rot gefärbt. Betrachtet man insbesondere den Bereich der Plasmamembran, so ist im Vergleich ohne und nach Insulinstimulation auf dem rechten Bild eine Verlagerung der Partikel aus dem Zellinneren in die Plasmamembran durch eine Verstärkung der Zellkonturen erkennbar.

Skalierungsbalken: 10 µm

Im Vergleich zu Abb. 3, vor allem bei Betrachtung des linken Bildes, der Zellen ohne vorheriger Insulinstimulation, fällt zunächst eine intensivere Färbung von Strukturen im Zellinneren auf, was auf eine weniger gut gelungene Fixierung der Zellen deutet, bei welcher der Antikörper durch Defekte in der Plasmamembran diffundiert und bereits dort die funktionell extrazelluläre Domäne markiert. Insgesamt erwies sich die humane Hepatomazelllinie Huh7, neben den Tert- und FAO- Zellen, unter identischen Zellkultur- und Versuchsbedingungen stets als empfindlicher, weshalb sich eine Plasmamembran- erhaltende Fixierung schwierig gestaltete. Dennoch ist bei Betrachtung des Bereiches der Plasmamembran eine Verstärkung der Konturen der Zellen nach Insulinstimulation sichtbar. Diese entspricht der gesteigerten Translokation von LRP1 unter Einfluss von Insulin in die Zellmembran der Hepatozyten und zeigt somit zum einen die Insulinsensitivität der Huh7- Zellen an, als auch den selben Effekt von Insulin wie in den Tert- Zellen. In den folgenden

Abbildungen wurden die Experimente in Ratten- Hepatomazellen (FAO) durchgeführt. Da keine Antikörper zur Detektion der extrazellulären Domäne von Ratten- LRP1 zur Verfügung standen, mussten die Zellen nach Insulin- Inkubation permeabilisiert werden. Demzufolge wurde in diesem Experiment gleichzeitig LRP1 in intrazellulären Vesikeln und an der Plasmamembran detektiert.

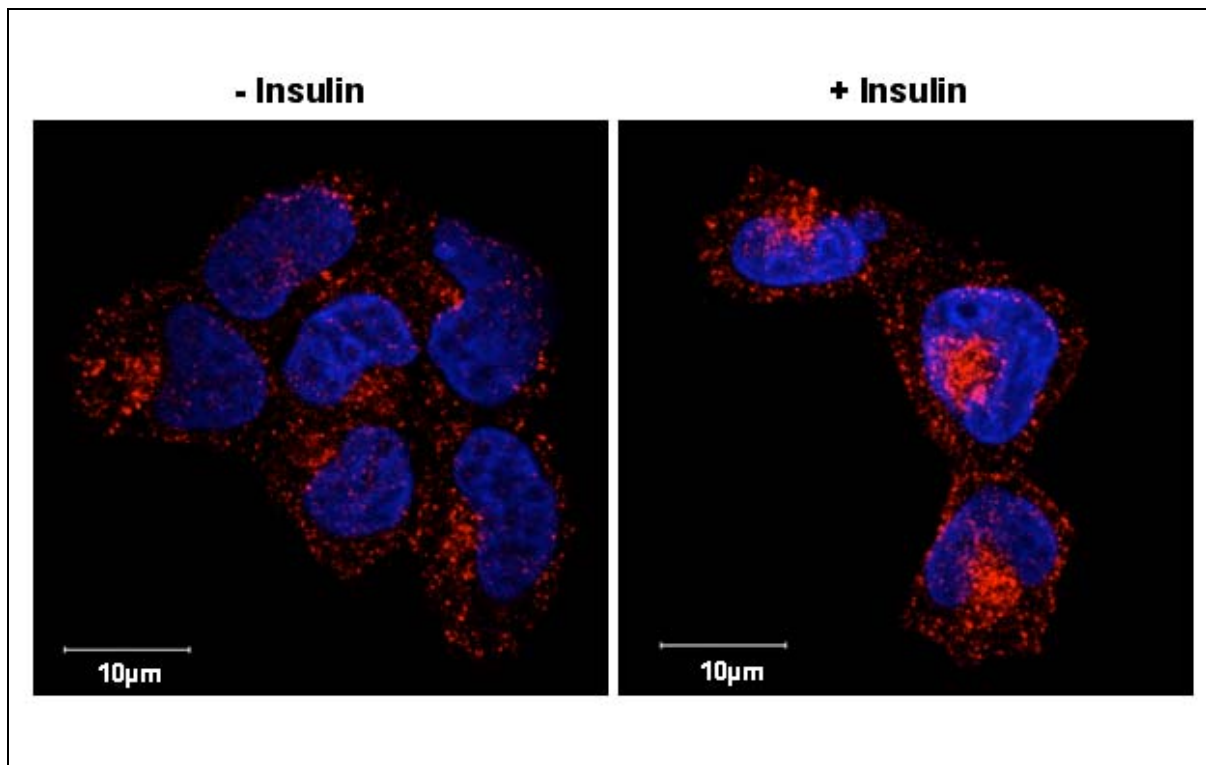


Abb. 5: Insulin- abhängige Lokalisation von LRP1 in permeabilisierten FAO- Zellen

FAO- Zellen wuchsen 24 h bis zur Subkonfluenz und wurden im Anschluss 12 h in Serum- freien Medium kultiviert. Bei 37° C wurden die Zellen für 10 min. ohne und mit 100 nM Insulin inkubiert und fixiert. Zur Detektion von LRP1 wurde ein Antikörpermix aus 8B8 und 5A6 verwendet, beides monoklonale Antikörper aus der Maus, die gemeinsam an das intrazelluläre 85 kDa- Fragment binden. Durch den Cy 3- konjugierten sekundären Antikörper wird dieser Bereich, mit welchem der Rezeptor in der Plasmamembran verankert ist, rot angefärbt. DAPI stellt die Zellkerne blau dar. Bei den Insulin- inkubierten Zellen ist auf dem rechten Bild eine verstärkte LRP1- Färbung an der Plasmamembran erkennbar.

Skalierungsbalken: 10 µm

Trotz dieser methodischen Einschränkungen ist in Abb. 5 eine Translokation von LRP1 im Bereich der Plasmamembran erkennbar, wobei die LRP1- Rezeptoren perlschnurartig die Zellgrenzen markieren. Ferner ist die überwiegend endosomale Verteilung von LRP1 sowohl vor, als auch nach Insulinstimulation deutlich zu erkennen. Zusammenfassend konnte eine Insulin- stimulierte Translokation von LRP1 sowohl in preadipozytären Tert-, als auch in den Hepatomazellen Huh7 und den FAO- Zellen nachgewiesen werden.

4.3 Insulin- abhängige Bindung und Aufnahme von Liganden in Leberzellen

Um zu untersuchen, ob die Insulin- abhängige Translokation zu einer gesteigerten LRP1- abhängigen Endozytose führt, wurden zunächst Bindungs- und Aufnahmeexperimente mit Fluoreszenz- markierten Liganden durchgeführt. Analog zu den Studien zur LRP1- Translokation wurde die Bindung- bzw. Aufnahme in An- und Abwesenheit von Insulin untersucht. Abb. 6 zeigt einen Bindungsassay, bei welchem nach erfolgter Inkubation der Zellen ohne und mit Insulin, die Zellen 30 min. bei 4° C mit Cy 3- konjugierten Chylomikronen- Remnants (CR) inkubiert wurden. Bei dieser Temperatur werden zellbiologische Vorgänge wie die Endozytose der CR über den LRP1- Rezeptor gestoppt und der Moment der Liganden- spezifischen Bindung kann festgehalten werden. Alle weiteren Schritte dieses Versuches sind analog der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Experimente erfolgt (siehe Material und Methoden 3.9).

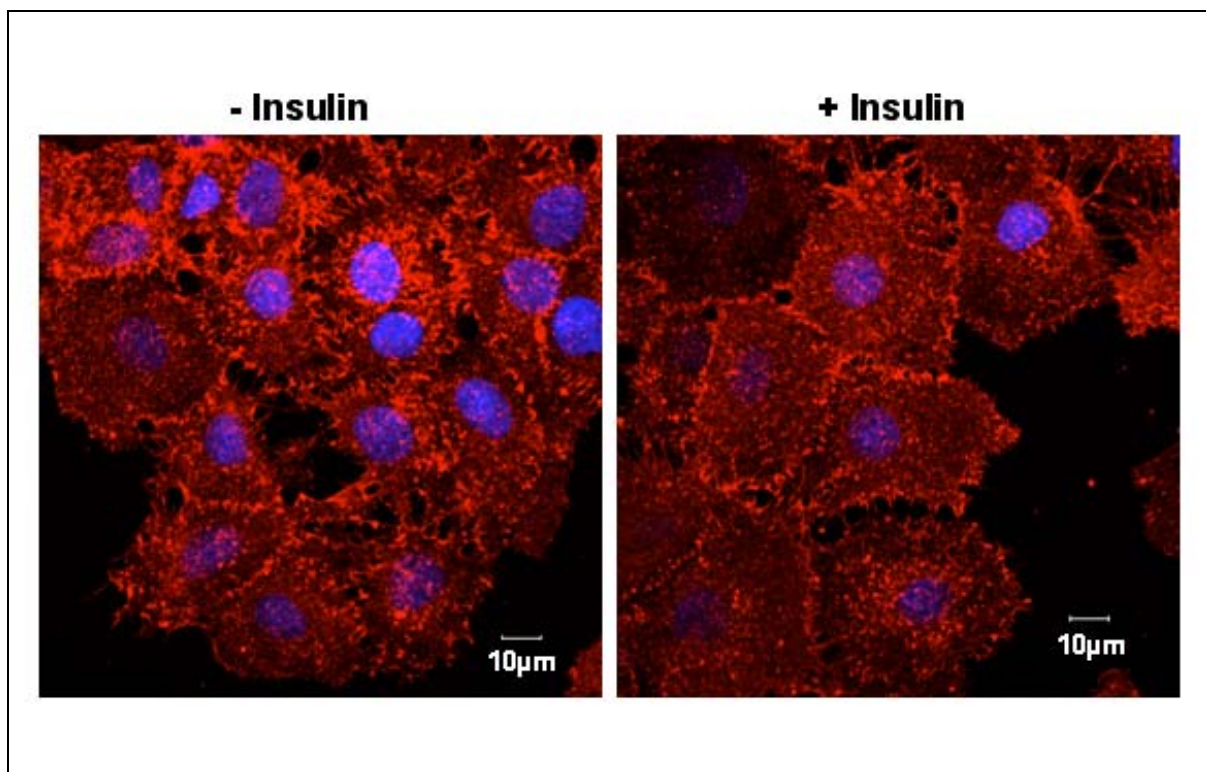


Abb. 6: Insulin- abhängige Bindung von Cy 3- Chylomikronen- Remnants (CR) an FAO- Zellen
FAO- Zellen wurden über Nacht mit Serum- freien Medium kultiviert, für 15 min. mit und ohne 100 nM Insulin bei 37° C stimuliert, und im Anschluss für 30 min. mit einer 50 µg/ ml konzentrierten Cy 3- CR- Lösung bei 4° C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und fixiert. Mit DAPI sind die Zellkerne blau angefärbt. Wie im rechten Bild erkennbar, scheint die Bindungskapazität nach Insulinstimulation leicht erhöht.
Skalierungsbalken: 10 µm

In Abb. 6 ist durch die Insulinstimulation eine leicht erhöhte Bindung zu verzeichnen, die auf eine vermehrte LRP1 Translokation zurückzuführen ist. Primär werden durch CR fransige Strukturen an der Oberfläche der Rattenhepatomazellen (FAO) angefärbt, bei denen es sich um die Heparansulfat- Proteoglykane (HSPG) handelt. Diese ragen in der Leber mit ihren Ausläufern in den Disse- Raum hinein und binden die mit der Lipoproteinlipase (LpL)- assoziierten CR, bevor diese, nach erfolgter Anreicherung mit von den Leberzellen sekretiertem ApoE, von dem LDL- bzw. dem LRP1- Rezeptor endozytiert werden.

Ob die dargestellte erhöhte Insulin- abhängige Translokation von LRP1 in die Plasmamembran zu einer gesteigerten Endozytose für LRP1- spezifische Liganden führt, ist in Form von Aufnahmeexperimenten untersucht worden. Anstatt der 30 min. Inkubation bei 4°C wurden die Zellen nach erfolgter Insulinstimulation 15 min. bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen einer Cy 3- CR- Lösung inkubiert, wie Abb. 7 zeigt.

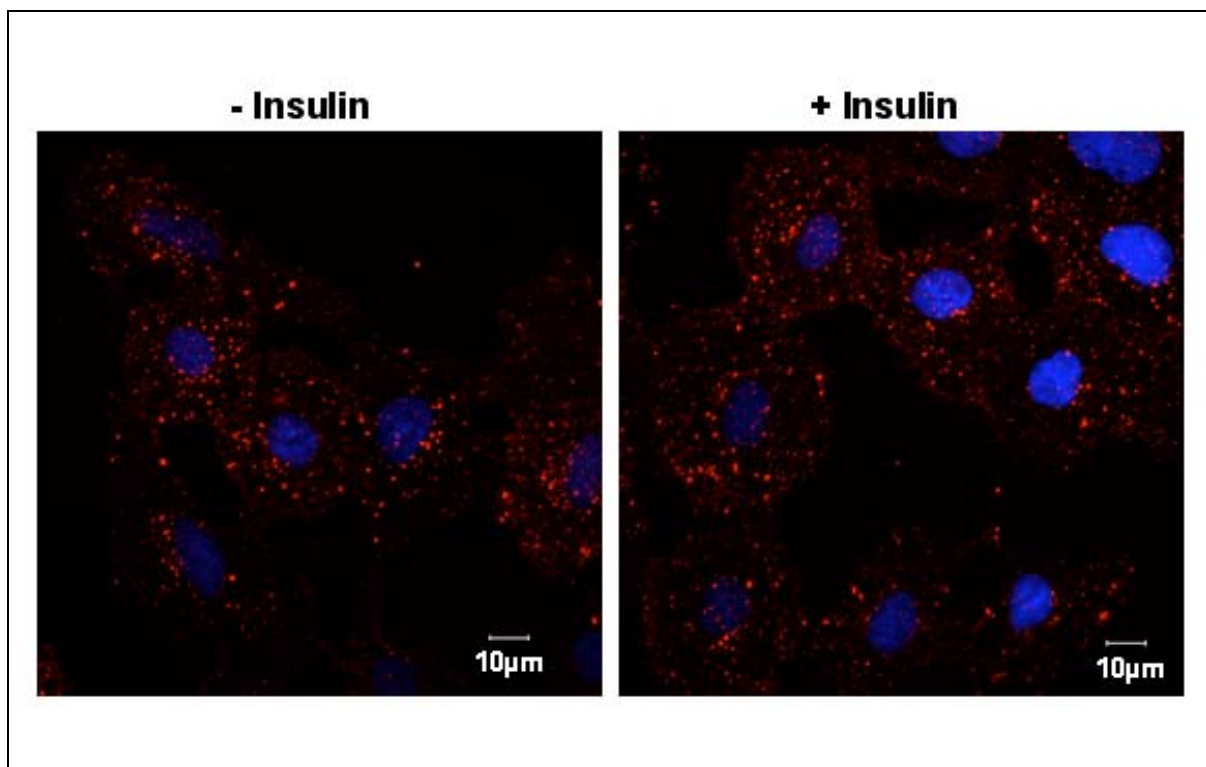


Abb. 7: Insulin- abhängige Aufnahme von Cy 3- Chylomikronen- Remnants (CR) in FAO- Zellen
FAO- Zellen wurden bis zur Subkonfluenz für 12 h in Serum- freien Medium kultiviert und ohne und mit 100 nM Insulinstimulation behandelt. Die Zellen wurden 15 min mit der 50 µg/ ml konzentrierten Cy 3- CR- Lösung inkubiert. In rot sind auf der Abbildung Cy 3- gefärbte CR erkennbar, eine geringfügig gesteigerte intrazelluläre Anreicherung ist dabei auf dem rechten Bild nach Insulinstimulation zu vermerken. Die Zellkerne stellen sich mit DAPI angefärbt blau dar.
Skalierungsbalken: 10 µm

Tendenziell entsteht in der obigen Abbildung der Eindruck einer vermehrten Anreicherung der CR, eine eindeutige Beurteilung ist jedoch mit dieser Methode nicht möglich. Deutliche Insulineffekte auf die LRP1- vermittelte Endozytose konnten hingegen mit RAP- Alexa 488 erstellt werden (siehe Abb. 8). RAP ist ein ER- ständiges Chaperon und bindet mit hoher Affinität an LRP1 und wird daher häufig als Marker für eine LRP1- abhängige Aufnahme genutzt.

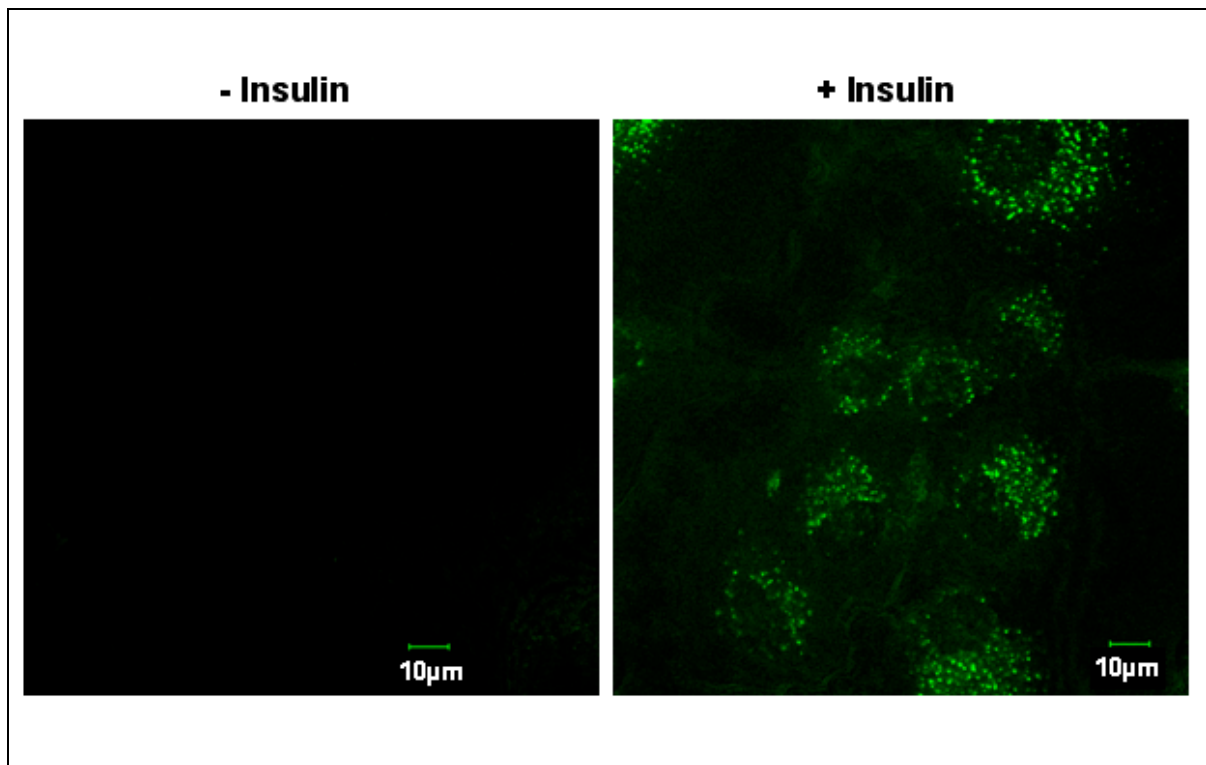


Abb. 8: Insulin- abhängige Aufnahme von RAP- Alexa 488 in humanen Tert- Zellen

Tert- Zellen wurde für 12 h Serum- haltiges Medium entzogen und nach einer 15 min. Inkubation ohne und mit Insulin folgte für 10 min. bei 37° C eine Inkubation mit 20 µg/ ml RAP- Alexa 488. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen fixiert. Eindeutig ist die gesteigerte Aufnahme von grün fluoreszierenden RAP in endosomalen Strukturen in dem rechten Bild nach Insulinstimulation zu erkennen.

Skalierungsbalken: 10 µm

Bei gesteigerter Aufnahme von RAP fällt in Abb. 8 die Anordnung der endozytierten Proteine auf. Intrazellulär sammelt sich das aufgenommene RAP vorzugsweise perinukleär und bildet dabei halbmondförmige Strukturen, die vermutlich lysosomale Kompartimente darstellen. Bei gleichbleibendem Versuchsaufbau wurden im Anschluss Huh7- Zellen auf eine gesteigerte RAP- Aufnahme nach Insulinstimulation der Zellen hin untersucht. Abb. 9 zeigt ein ähnliches Ergebniss wie zuvor in den Tert- Zellen beobachtet wurde.

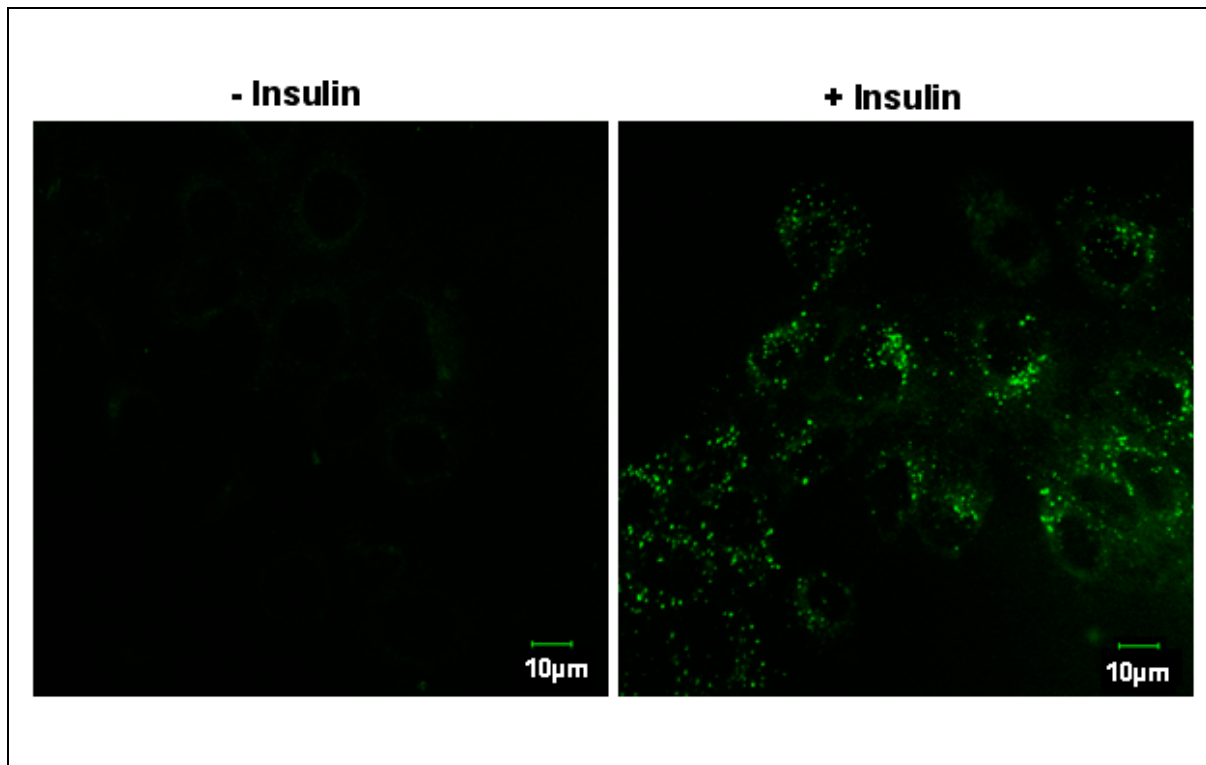


Abb. 9: Insulin- abhängige Aufnahme von RAP- Alexa 488 in Huh7- Zellen

Huh7- Zellen wurden nach 12- stündigem kultivieren in Serum- freiem Medium jeweils ohne und mit 100 nM Insulin inkubiert und für 10 min. bei 37° C mit 20 µg/ ml RAP- Alexa 488 inkubiert. Eindeutig ist auf dem rechten Bild eine gesteigerte Aufnahme von grün markiertem RAP zu erkennen.

Skalierungsbalken: 10 µm

Auch in Huh7- Zellen wird durch Insulinstimulation eine deutlich vermehrte RAP- Aufnahme in intrazelluläre, endosomale Kompartimente beobachtet.

Um diese Versuchsreihe zu komplettieren, wurden abschliessend in Abb. 10 FAO- Zellen wiederum mit und ohne Insulinstimulation, mit RAP- Alexa 488 inkubiert.

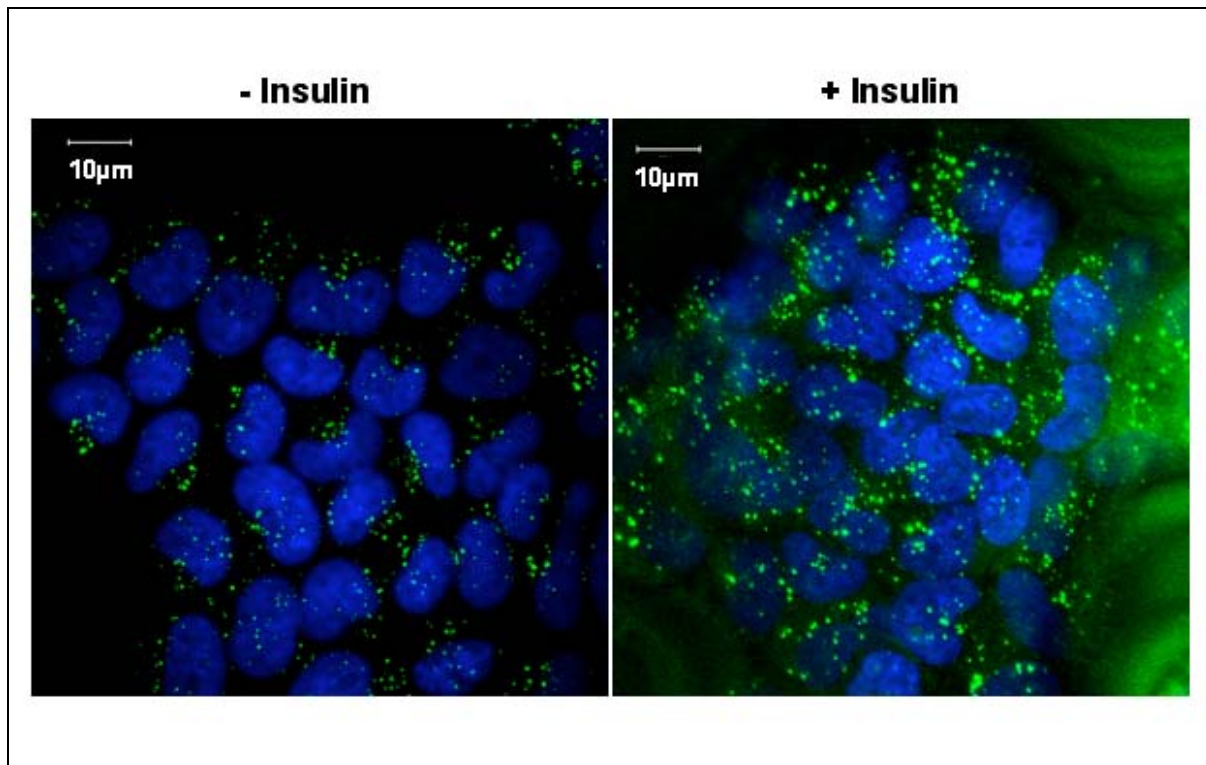


Abb. 10: Insulin- abhängige Aufnahme von RAP- Alexa 488 in FAO- Zellen

12 h wurde FAO- Zellen Serum- haltiges Medium entzogen, um anschliessend die Zellen ohne und mit 100 nM Insulin zu stimulieren. Die Aufnahme des grün gefärbten RAP ist nach einer 30 min. Inkubation mit 20 µg/ ml RAP- Alexa 488 in dem rechten Bild nach Insulinstimulation deutlich gesteigert. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau markiert.
Skalierungsbalken: 10 µm

Nach den vorherigen Versuchen zeigte sich wie erwartet auch in den Rattenhepatomazellen (FAO) eine eindeutig durch Insulin- induzierte, vermehrte Aufnahme von RAP in intrazelluläre Kompartimente.

Da aus den Ergebnissen der Immunfluoreszenzen vorwiegend qualitative und semiquantitative Aussagen getroffen werden können, sind als weiterer Schritt dieser Arbeit mit den selben Zelllinien radioaktive Aufnahmeexperimente ausgeführt worden. Zielsetzung dieser Versuchsreihe war dabei der quantitative Nachweis, in Übereinstimmung mit den in den Immunfluoreszenzen gezeigten Effekten, einer gesteigerten Aufnahme LRP1- spezifischer Liganden nach Insulinstimulation.

4.4 Aufnahmeexperimente von radioaktiv markierten Liganden des LRP1- Rezeptors

In Ergänzung zu den bisher beschriebenen Effekten von Insulin auf die Translokation und Aufnahme soll im folgenden Abschnitt der Arbeit in Aufnahmeexperimenten mit

radioaktiv markierten Liganden untersucht werden, ob die in den Immunfluoreszenzen zuletzt beobachtete gesteigerte Aufnahme von Liganden nach Insulinstimulation auf diese Weise quantifizierbar ist. Um einen späteren Vergleich zu ermöglichen, wurden die Versuche mit den Huh7- und FAO- Zellen durchgeführt. Die radioaktive Markierung von den eingesetzten Liganden, dem Rezeptor- assoziiertem Protein (RAP), den Chylomikronen- Remnants (CR) und dem ebenfalls LRP1- spezifischen Liganden Lactoferrin (Lf), wurde von Dr. J. Heeren nach der in Abschnitt 3.7.2 beschriebenen Jodmonochlorid- Methode durchgeführt. Die strukturelle Integrität der Liganden, sowie die Reinheit der Präparationen nach erfolgter Jodierung wurde im Vorfeld der Aufnahmeexperimente mittels Autoradiographie, nach Trennung der Moleküle durch SDS- Page (siehe Material und Methoden 3.10) abgeklärt und ist in Abb. 11 dargestellt.

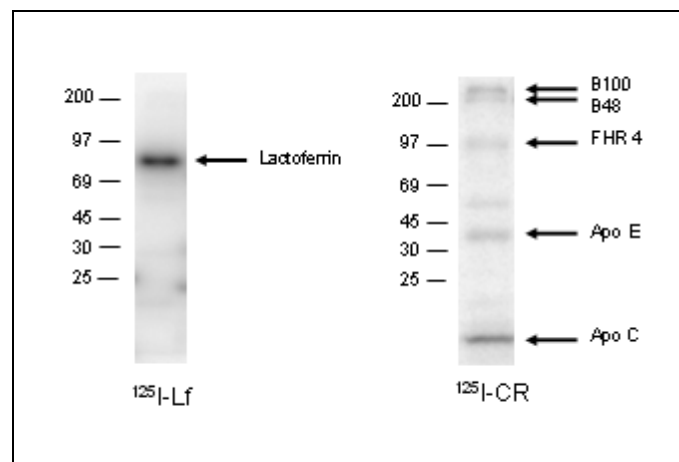


Abb. 11: Autoradiographie der jodierten Liganden nach Trennung mittels SDS- Page

Lactoferrin (Lf) und Chylomikronen- Remnants (CR) wurden mit ^{125}I radioaktiv markiert und durch eine 10% SDS- Page unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Durch Exposition des getrockneten Gels für 20 h bei 80°C wurden die Liganden auf einem Chronex, Dupont Röntgenfilm abgebildet. Auf der rechten Bildseite ist das Apolipoproteinmuster der CR mit Pfeilen gekennzeichnet. Auf der linken Bildseite sind die Molekulargewichte des Proteinmarkers in kDa angegeben.

Deutlich erkennbar auf der linken Bildseite ist ^{125}I - Lf, dessen Molekulargewicht etwa 80 kDa beträgt. Auf der rechten Bildseite konnten die mit ^{125}I - markierten Apolipoproteine der CR, mit dem für sie typischen Apolipoproteinmuster dargestellt werden. Im Bereich von 34 kDa ist ApoE zu erkennen, weiterhin charakteristisch für Chylomikronen sind die Banden von ApoB₄₈ und FHR- IV (Skerka, Hellwage et al. 1997) und ApoC. Die schwache Bande von ApoB₁₀₀ deutet auf Spuren von VLDL- Partikeln hin, die während der Präparation mittels Ultrazentrifugation nicht von den

Chylomikronen getrennt werden konnten. Leider gelang keine zufriedenstellende Jodierung bei gleichzeitigem strukturellen Erhalt des RAPs, weshalb auf ^{125}I -RAP in den im Anschluss durchgeführten Aufnahmeexperimenten verzichtet werden musste. Die Vorbereitung der Zellen in der Zellkultur, das 12-stündige Aushungern der Zellen in Serum-freien Medium, sowie die Insulinstimulation erfolgte analog dem Versuchaufbau in den vorherigen Abschnitten 4.2 und 4.3. In Abschnitt 3.11 ist weiterhin die Zusammensetzung der Inkubationslösungen, mit den unterschiedlichen Konzentrationen der jodierten Liganden beschrieben. Im Falle von ^{125}I -Lf wurde nicht-markiertes Transferrin (Tf) dem Inkubationsmedium zugesetzt, um eine unspezifische Aufnahme von Lf über den Transferrin-Rezeptor (TfR) zu vermeiden. Nach erfolgter Inkubation mit den markierten Liganden, wurden die Zellen mehrfach mit PBS zur Entfernung unspezifischer Bindungen gewaschen. Durch abschliessendes Waschen mit einem Heparinpuffer lösen sich die an der Oberfläche der Zellen gebundenen Liganden, so dass letztlich nach Lyse der Zellen in NaOH, nur die in die Zellen aufgenommenen Liganden über ihre radioaktive Markierung mit dem γ -Counter detektiert werden. Durch Bezug der im γ -Counter gemessenen CPM auf die Gesamtproteinmenge pro well, konnte die absolute Aufnahme der jodierten Liganden in ng/ mg Zellprotein ohne und mit Insulinstimulation berechnet werden. Insgesamt wurden sechs Experiment nach gleichem Versuchaufbau durchgeführt, so dass die aufgeführten Zahlen gemittelte Werte mit den entsprechenden Standardabweichungen entsprechen. Das Ergebnis für die Aufnahme von ^{125}I -Lf ohne und mit Insulinstimulation in Huh7- und FAO-Zellen ist in Abb. 12 dargestellt.

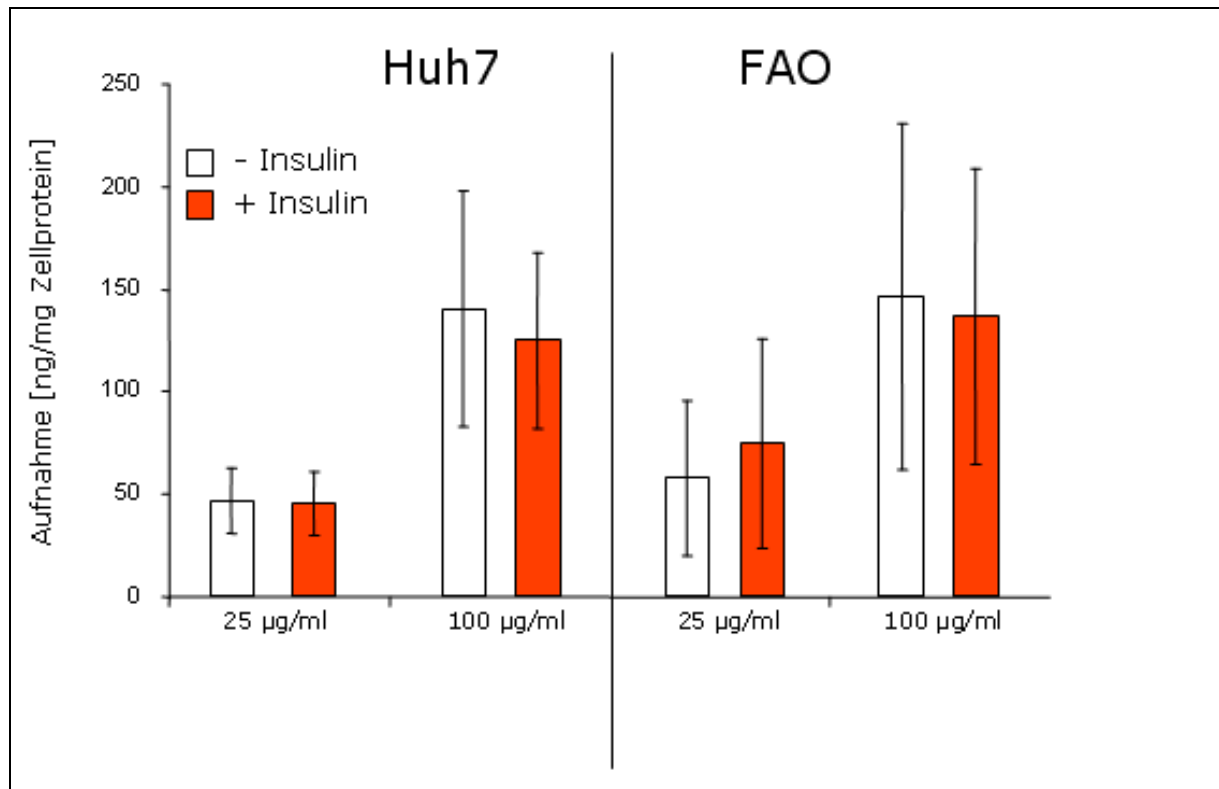


Abb. 12: Insulin- abhängige Aufnahme von ^{125}I - Lactoferrin (Lf) in Huh7- und FAO- Zellen

Huh7- und FAO- Zellen wurden über Nacht ausgehungert, bevor beide Zelllinien, jeweils in einem Versuchansatz, ohne (weiss) und mit 100 nM Insulinzusatz (rot) für 15 min. inkubiert wurden. Anschliessend erfolgte eine 30 min. Inkubation bei 37° C mit zwei unterschiedlich konzentrierten Lösungen von ^{125}I - Lf, 25 und 100 µg/ ml. Nach Waschen mit kaltem PBS und einem Heparinpuffer wurden die Zellen in 0,1 N NaOH gelöst. Die spätere Bestimmung der absoluten Aufnahme von ^{125}I - Lf in ng/ mg Zellprotein erfolgte über Berechnung des Verhältnisses von den im γ - Counter gemessenen CPM und der nach Bradford ermittelten Gesamtproteinmenge pro Probenröhrchen. Gezeigt sind Mittelwerte aus sechs Experimenten mit den sich daraus ergebenden Standardabweichungen.

Aus Abb. 12 geht hervor, dass sowohl in den Huh7-, als auch in den FAO- Zellen bei Verwendung der 100 µg/ ml konzentrierten ^{125}I - Lf- Lösung, im Vergleich, nicht bei den insulinstimulierten, sondern im Gegensatz, bei den Zellen ohne vorherige Insulinstimulation mehr ^{125}I - Lf in die Zellen aufgenommen wurde. Anders verhält es sich in den FAO- Zellen, nach Inkubation mit der geringer konzentrierten ^{125}I - Lf- Lösung, bei der sich nach Insulinstimulation tatsächlich eine vermehrte Aufnahme von ^{125}I - Lf gegenüber der Kontrolllinie ohne Insulinstimulation abzeichnet. Dieser Effekt ist in den Huh7- Zellen, wiederum bei Verwendung der 25 µg/ ml konzentrierten ^{125}I - Lf- Lösung, nicht nachzuvollziehen. Ohne oder mit Insulinstimulation der Zellen scheint in dieser Konstellation keinen Unterschied zu bewirken.

Trotz standardisierter Bedingungen können zahlreiche Einflüsse, wie die Verwendung von Zellen mit unterschiedlichen Passagezeiten, sowie unterschiedliche

Lagerungszeiten der Liganden etc. zu Abweichungen zwischen den absoluten Werten der einzelnen Experimente führen. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurde daher auf der nächsten Abbildung die Aufnahme von ^{125}I - Lf ohne Insulinstimulation gleich 100% gesetzt, die Stimulation der Aufnahme mit Insulin wird im Verhältnis dazu angegeben und setzt sich aus den gemittelten prozentualen Werten aller sechs Experimente zusammen.

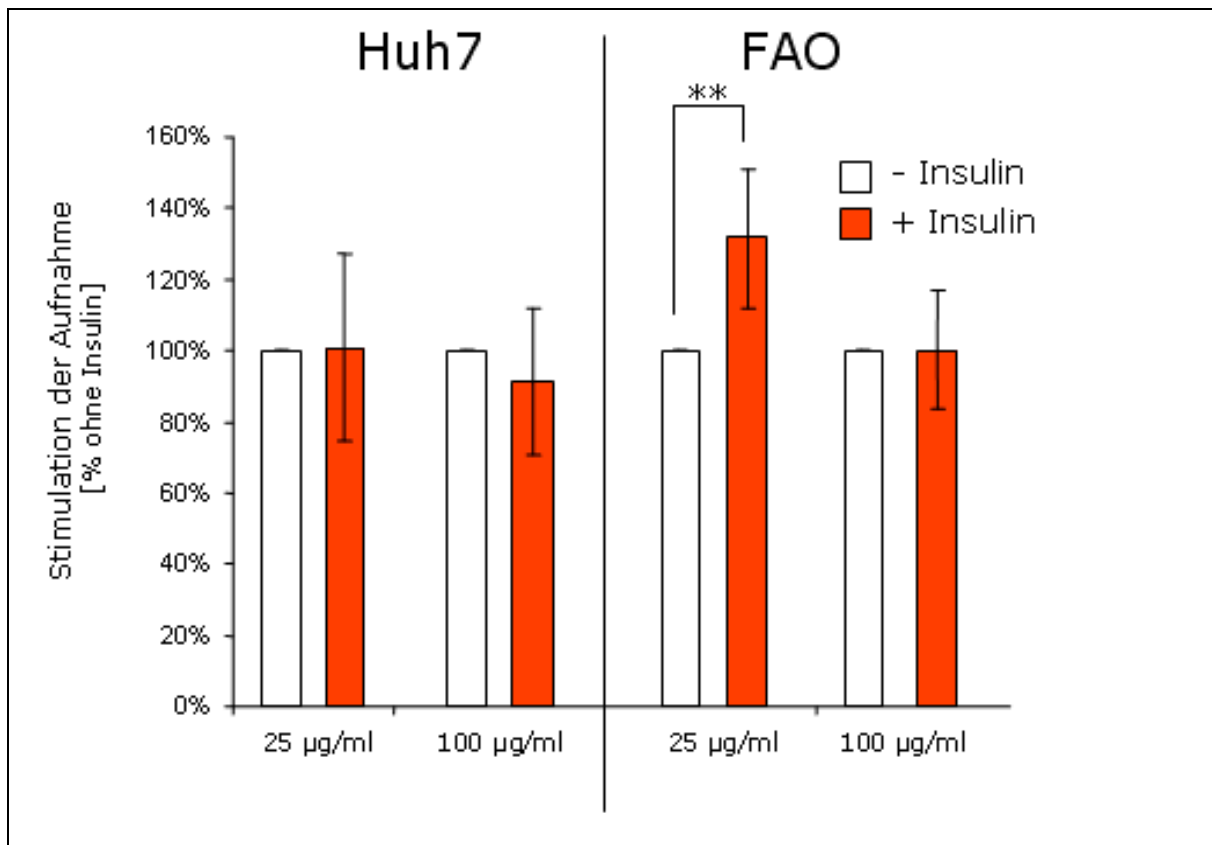


Abb. 13: Insulin- abhängige Aufnahme von ^{125}I - Lactoferrin (Lf) in Huh7- und FAO- Zellen

Die Aufnahme von ^{125}I - Lf aus den in Abb. 12 gezeigten Experimenten ohne Insulinstimulation wurde gleich 100% gesetzt. Die Aufnahme nach Insulinstimulation wird im Verhältnis dazu angegeben und setzt sich aus den gemittelten prozentualen Werten von sechs Experimenten zusammen, bei denen zunächst die absolute Aufnahme in ng/ mg Zellprotein ermittelt wurde. Mit Sternchen gekennzeichnet, ist auf der rechten Bildseite die statistisch signifikant gesteigerte Aufnahme von ^{125}I - Lf nach Insulinstimulation und Inkubation der FAO- Zellen mit der 25 µg/ ml konzentrierten ^{125}I - Lf- Lösung dargestellt.

Tatsächlich zeigt sich bei dieser Darstellung der Ergebnisse eine statistisch signifikant gesteigerte Aufnahme von ^{125}I - Lf in die Rattenhepatomazellen (FAO) nach Insulinstimulation und Inkubation der Zellen mit der niedrig konzentrierten Liganden- Lösung.

Nach exakt dem selben Versuchsschema wurden im Anschluss ^{125}I - Chylomikronen- Remnants (CR) eingesetzt. Analog zur Abb. 12 ist wiederum zunächst die absolute

Aufnahme der jodierten CR in ng/ mg Zellprotein ohne und mit vorheriger Insulinstimulation von Huh7- und FAO- Zellen untersucht worden. Die aufgeführten Zahlen sind ebenfalls gemittelte Werte aus sechs Experimenten mit den entsprechenden Standardabweichungen.

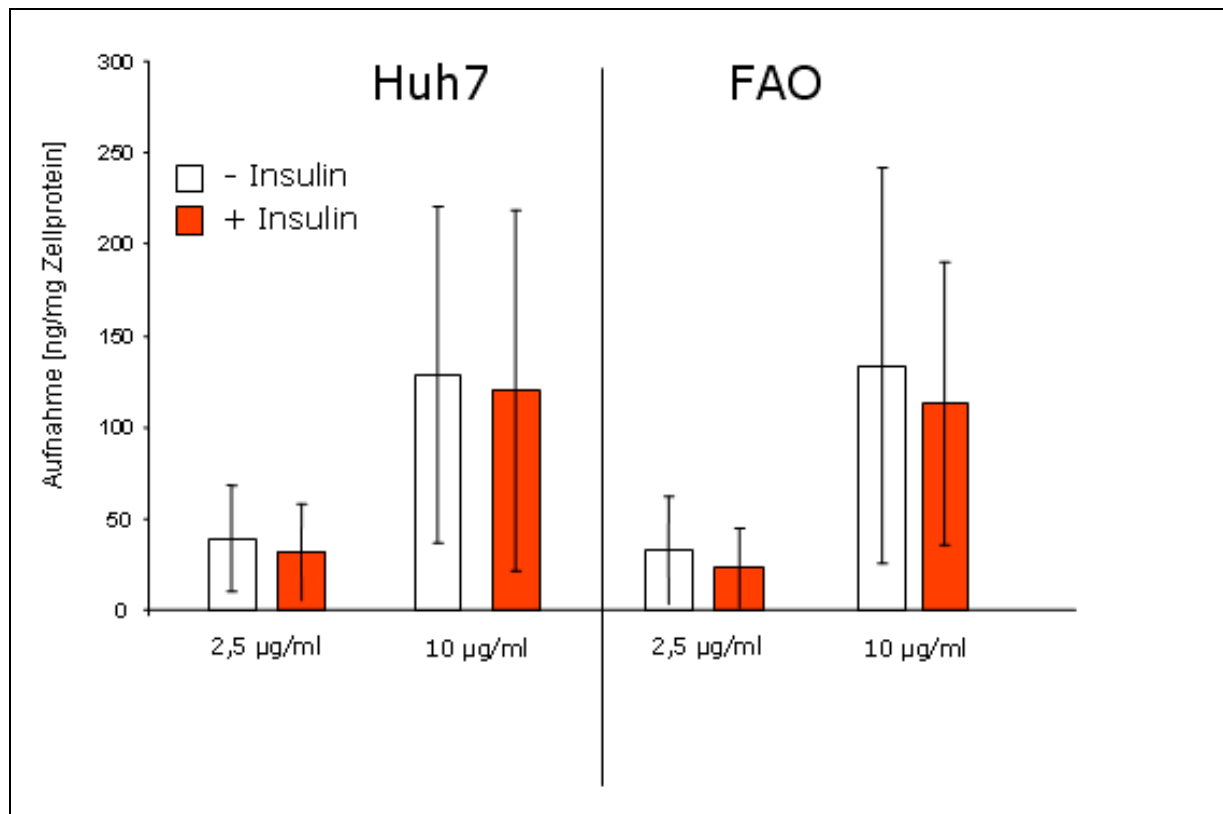


Abb. 14: Insulin- abhängige Aufnahme von ¹²⁵I- Chylomikronen- Remnants (CR) in Huh7- und FAO- Zellen

Huh7- und FAO- Zellen wurden über Nacht Serum-frei kultiviert, bevor beide Zelllinien, jeweils in einem Versuchsansatz, ohne (weiss) und mit 100 nM Insulinzusatz (rot) für 15 min. inkubiert wurden. Anschliessend erfolgte eine 30 min. Inkubation bei 37° C mit zwei unterschiedlich konzentrierten Lösungen von ¹²⁵I- CR, 2,5 und 10 µg/ ml. Nach Waschen mit kaltem PBS und einem Heparinpuffer wurden die Zellen in 0,1 N NaOH gelöst. Die spätere Bestimmung der absoluten Aufnahme von ¹²⁵I- CR in ng/ mg Zellprotein erfolgte über Berechnung des Verhältnisses von den im γ - Counter gemessenen CPM und der nach Bradford ermittelten Gesamtproteinmenge pro Probenröhrchen. Gezeigt sind Mittelwerte aus sechs Experimenten mit den sich daraus ergebenden Standardabweichungen.

Sowohl in den Huh7-, als auch in den FAO- Zellen war die absolute Aufnahme von ¹²⁵I- CR jeweils in der Versuchsreihe ohne vorherige Insulinstimulation geringfügig höher als die Aufnahme nach Insulinstimulation der Zellen. Dieser Effekt verhält sich gleich, auch nach Inkubation der Zellen mit zwei unterschiedlich konzentrierten Lösungen von ¹²⁵I- CR, mit 2,5 und 10 µg/ ml. Aus Übersichtsgründen sind diese Ergebnisse in Abb. 15 zusammengefasst. Erneut wurde dazu die Aufnahme von ¹²⁵I-

CR ohne Insulinstimulation gleich 100% gesetzt, und die Aufnahme nach Insulinstimulation wird im Verhältnis dazu angegeben und setzt sich aus den gemittelten prozentualen Werten aller sechs Experimente zusammen.

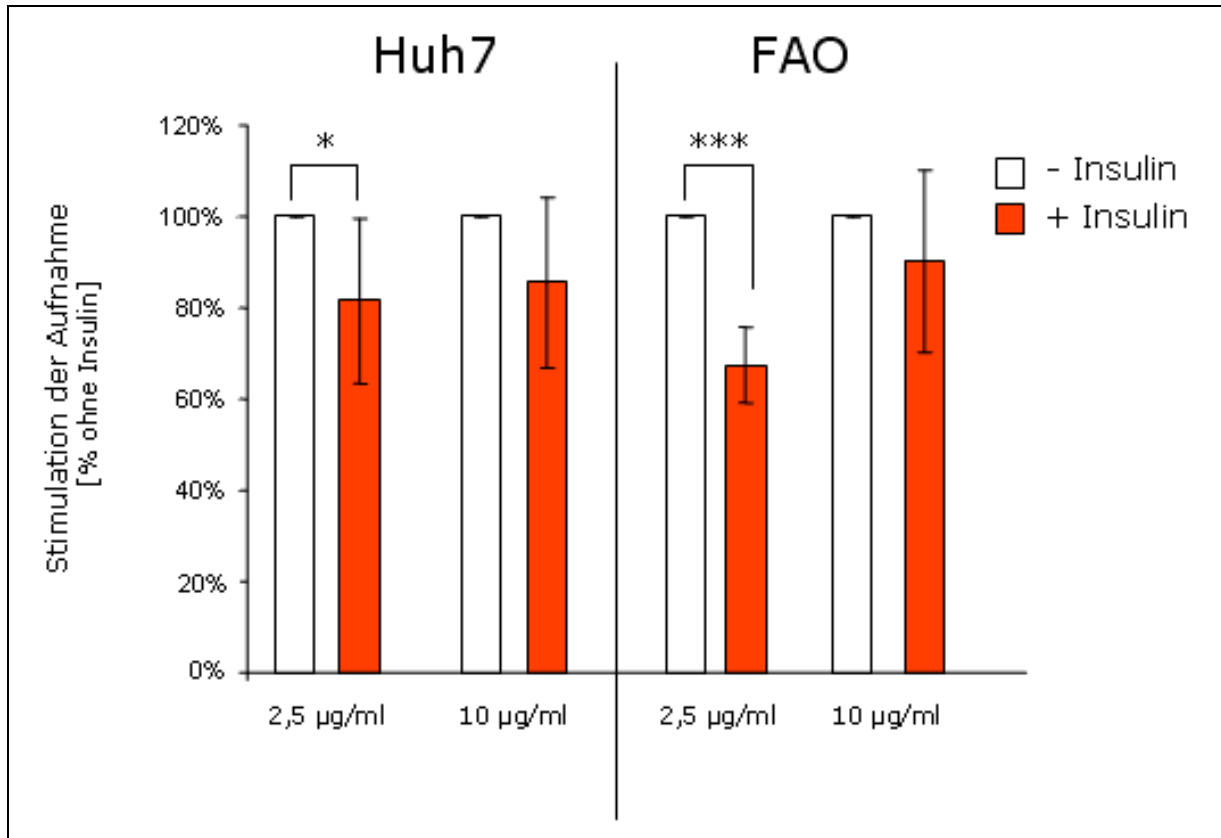


Abb. 15: Insulin- abhängige Aufnahme von ¹²⁵I- Chylomikronen- Remnants (CR) in Huh7- und FAO- Zellen

Die Aufnahme von ¹²⁵I- CR aus den in Abb. 14 gezeigten Ergebnissen ohne Insulinstimulation wurde gleich 100% gesetzt. Die Aufnahme nach Insulinstimulation wird im Verhältnis dazu angegeben und setzt sich aus den gemittelten prozentualen Werten von sechs Experimenten zusammen, bei denen zunächst die absolute Aufnahme in ng/ mg Zellprotein ermittelt wurde. Mit Sternchen gekennzeichnet, ist auf der linken Bildseite die statistisch signifikant reduzierte Aufnahme von ¹²⁵I- CR in Huh7- Zellen mit Insulinstimulation und nach Inkubation der Zellen mit der 2,5 µg/ ml konzentrierten ¹²⁵I- CR- Lösung dargestellt. Auf der rechten Bildseite ist die ohne Insulinstimulation signifikant gesteigerte Aufnahme von ¹²⁵I- CR in FAO- Zellen gekennzeichnet, ebenfalls nach Inkubation mit der niedrig konzentrierten ¹²⁵I- CR- Lösung.

Abb. 15 zeigt, dass die Aufnahme von ¹²⁵I- CR in Huh7- Zellen nach Insulinstimulation der Zellen vermindert ist, signifikant vermindert nach Inkubation der Zellen mit der 2,5 µg/ ml konzentrierten ¹²⁵I- CR- Lösung. Ebenso verhält es sich in den FAO- Zellen: in den mit Insulin stimulierten Zellen, in rot dargestellt, wurden weniger ¹²⁵I- CR endozytiert als dies der Fall in der Kontrolllinie war, den Zellen ohne Insulinstimulation. Drastisch herabgesetzt war dabei die Aufnahme der ¹²⁵I- CR nach Insulinstimulation, bei einer Liganden- Konzentration von 2,5 µg/ ml.

Zusammenfassend konnte keine Insulin- abhängige Aufnahme über LRP1 in den Aufnahmeexperimenten gezeigt werden.

5 Diskussion

5.1 Biochemische Charakteristika von Chylomikronen

In der postprandialen Phase gelangen die mit Nahrungsfetten beladenen Chylomikronen aus dem Dünndarm über das Lymphsystem in den Blutkreislauf und werden hydrolytisch von der an den Heparansulfat- Proteoglykanen (HSPG) der Endothelzellen haftenden Lipoproteinlipase (LpL) gespalten (Eisenberg, Sehayek et al. 1992; Olivecrona, Liu et al. 1993). Während der intravaskulären Hydrolyse wird auf die entstehenden Chylomikronen- Remnants (CR) ApoE von den HDL übertragen (Imaizumi, Fainaru et al. 1978; Imaizumi, Havel et al. 1978). ApoE vermittelt erfolgt die Aufnahme der CR durch die Bindung an die hepatischen Lipoprotein- Rezeptoren, insbesondere an LRP1 und an dem LDL- Rezeptor (LDLR) (Beisiegel, Weber et al. 1991; Beisiegel and Heeren 1997; Beisiegel 1998; Rohmann, Gotthardt et al. 1998). Auf Grund der physiologisch kurzen Verweildauer der Chylomikronen im Blutkreislauf vor der Internalisierung ist die Isolierung der Partikel unter diesen Umständen schwierig. Bei Patienten mit Typ I Hypertriglyzeridämie führt ein genetischer Defekt zu einer Inaktivierung des für die Hydrolyse essentiellen Kofaktors ApoC- II und der LpL, weshalb diese Reaktion verhindert ist (Merkel, Eckel et al. 2002; Olivecrona and Beisiegel 1997). Bei ausbleibender Hydrolyse durch die LpL, die Voraussetzung für die Rezeptor- vermittelte Aufnahme der Chylomikronen ist, akkumulieren diese im Plasma der Patienten (Mahley and Ji 1999; Merkel, Eckel et al. 2002; Olivecrona and Beisiegel 1997). Diese Begebenheit ermöglicht die Isolierung der Chylomikronen aus dem Plasma mittels Ultrazentrifugation und anschliessend die biochemische Charakterisierung ihrer Zusammensetzung. Die aus Typ I- Patienten isolierten Chylomikronen können somit in ausreichender Menge gewonnen werden, um den Chylomikronen- Stoffwechsel in vitro und in vivo zu untersuchen (Heeren, Niemeier et al. 2002). In Abb. 2 (siehe S. 46) ist dargestellt, dass sich die Chylomikronen, isoliert von den in Hamburg zur Verfügung stehenden Typ I- Patienten (Beil, Fojo et al. 1992), zu 99% aus Lipiden und zu 1% aus Proteinen zusammensetzen. Den Hauptanteil in der Lipidfraktion bilden mit 84% die Triglyzeride, 8% ist der Anteil an Phospholipiden, gefolgt von 7% Cholesterin bzw. Cholesterinester- Molekülen. Abgesehen von geringen physiologischen Schwankungen, sowie geringfügigen

Verunreinigungen mit ApoB₁₀₀ (siehe Abb. 11, S. 55) entsprechen die ermittelten Werte den Angaben in der Literatur (Havel, Eder et al. 1955; Gotto, Pownall et al. 1986; Kane. 1996). Verunreinigungen entstehen durch auf Grund physikalisch ähnlichen Eigenschaften und damit in der Ultrazentrifugation schwer abtrennbaren Fraktionen von VLDL und Chylomikronen. Abb. 11 (siehe S. 55) zeigt eine Autoradiographie der ¹²⁵I- Chylomikronen mit ihrem charakteristischen Apolipoproteinmuster, bei dem typischerweise ApoE im Bereich von 34 kDa hervorsteht. Weiterhin enthielten die Chylomikronen das charakteristische ApoB₄₈ und FHR- IV (Skerka, Hellwege et al. 1997) und ApoC. Die schwache Bande von ApoB₁₀₀ deutet auf eine Verunreinigung der Präparationen mit VLDL- Partikeln hin, welche insgesamt bei konstanter prozentualer Zusammensetzung der Chylomikronen in den unterschiedlichen Präparationen zu detektieren war. In wieweit die Verunreinigung mit ApoB₁₀₀ die Aufnahme über die Lipoprotein- Rezeptoren beeinflusst, kann nicht direkt abgeschätzt werden. Für die Herstellung von CR wurden die humanen Chylomikronen in vitro mit boviner LpL hydrolysiert (Heeren, Niemeier et al. 2002), die freundlicherweise von Frau Prof. Olivecrona (Umea, Schweden) zur Verfügung gestellt wurde (Egelrud and Olivecrona 1972). Nach erfolgter Hydrolyse wurden die CR durch erneute Ultrazentrifugation reisoliert und nach Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, bzw. ¹²⁵Iod für die funktionellen Experimente eingesetzt.

5.2 Experimenteller Aufbau

Die Fragestellungen dieser Arbeit sollten anhand zwei unterschiedlicher experimenteller, im Labor etablierter Methoden, die sich in ihrer Aussagekraft ergänzen, untersucht werden. Zunächst erfolgten die Studien in qualitativer und semiquantitativer Hinsicht mittels Immunfluoreszenzen. Später sollten die Experimente mittels radioaktiver Aufnahmeexperimente quantitativ beurteilt werden. Die Rahmenbedingungen, sowie das zugrunde liegende Prinzip der Versuche wurde in beiden Methoden, um einen späteren Vergleich zu ermöglichen, während der gesamten Arbeit beibehalten. Drei verschiedene Zelllinien, die zu Adipozyten differenzierbaren humanen, mesenchymalen Stammzellen Tert4 (Crettaz, Jialal et al. 1984; Simonsen, Rosada et al. 2002), Insulin- sensitive Hepatoma- Zellen (FAO) aus der Ratte (*Rattus norvegicus*) und die humane Leberzelllinie Huh7 wurden für die

einzelnen Experimente parallel in Zellkultur gehalten. Bei jedem Versuch wurden die Zellen 24- 48 h in lipoproteininhaltigem Nährmedium bis zur Subkonfluenz inkubiert, dem ein 12- stündiges Kultivieren der Zellen in Serum- freiem Medium folgte. Auch die Art der Insulinstimulation wurde bezüglich der Konzentration und der Inkubationsdauer (siehe Material und Methoden 3.8 und 3.11) nach anfänglicher Definierung eines Optimums konstant beibehalten. Trotzdem existieren bei Arbeiten mit biologischem Material, auch bei standardisierten Versuchsabläufen unterschiedlichste Faktoren, welche die Ergebnisse beeinflussen können. Dazu zählen die unterschiedlichen Passagezeiten der Zelllinien, die sich möglicherweise in veränderten physiologischen Eigenschaften der Zellen widerspiegeln. Weiterhin sind trotz einheitlicher Methode bei der Aussat der Zellen Abweichungen in Zellzahl und Dichte, sowie die Verwendung unterschiedlicher Reihen von Inkubationsmedien kaum zu vermeidende Faktoren, die wiederum zu Schwankungen in den Ergebnissen führen können. Auch die Zusammensetzung humaner Chylomikronen unterliegt physiologischen Schwankungen, in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme des Spenders. Weiterhin können bei der Isolierung der Chylomikronen, der Art und Dauer der Lagerung, sowie bei der Markierung Veränderungen der Partikel auftreten, die zu Unterschieden in den Ergebnissen der Einzelexperimente führen. Hierzu zählt auch der oben erwähnte Grad der Verunreinigung der einzelnen Präparationen mit VLDL- Partikeln, die durch Ultrazentrifugation nicht von den Chylomikronen zu trennen waren. Um diese Einflussgrößen möglichst gering zu halten, wurden die frisch präparierten Chylomikronen bei 4° C gelagert und möglichst zügig für mehrere, parallel durchgeführte Experimente genutzt.

Leider gelang im Rahmen der radioaktiven Aufnahmeexperimente dieser Arbeit nicht die Iodierung des Rezeptor- assoziierten Proteins (RAP), was für einen Vergleich mit den Ergebnissen von den Immunfluoreszenzen wünschenswert gewesen wäre. Im übrigen führt auch die Iodierung der Liganden immer zu Differenzen in den verschiedenen Präparationen, was zu unterschiedlichen Werten in den Ergebnissen führt. Aus diesem Grunde wurden die radioaktiven Experimente immer auch prozentual ausgewertet, um eine Vergleichsmöglichkeit für Einzelexperimente zu schaffen.

5.3 Einfluss von Insulin auf die Rolle von LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die Untersuchungen zu dem Einfluss von Insulin, als vorherrschendes postprandiales Hormon, auf den LRP1- Rezeptor bezüglich seiner Lokalisation in der Zelle, der Bindung und in der Aufnahmerate seiner spezifischen Liganden. Die zu Beginn formulierte These basiert auf mehreren wissenschaftlichen Erkenntnissen aus den letzten Jahren, beginnend mit dem Nachweis der ApoE- vermittelten Aufnahme der Chylomikronen- Remnants (CR) durch die Bindung an hepatische Lipoprotein- Rezeptoren, insbesondere an dem LRP1- Rezeptor und dem LDL- Rezeptor (LDLR) (Beisiegel, Weber et al. 1989; Rohlmann, Gotthardt et al. 1998; Zhang and Liu 1992). Veniant et al. haben gezeigt, dass LRP1 primär postprandial auftretende ApoB₄₈- enthaltende CR effizient aus dem Blut entfernen kann (Veniant, Zlot et al. 1998). Die Insulinstimulierbarkeit von LRP1 wurde zunächst in Adipozyten gezeigt (Descamps, Bilheimer et al. 1993; Zhang, Links et al. 2004). In Adipozyten konnte in der Folge die Translokation von LRP1 in die Plasmamembran nach Insulinstimulation gezeigt werden (Zhang, Links et al. 2004). Dies passiert somit analog zu der Funktionsweise des Insulin-stimulierten Glucosetransporters Glut4 (Scherer, Lisanti et al. 1994), über den postprandial die Glucosekonzentration im Blut durch Aufnahme der Glucose in Fett und Muskelzellen rasch gesenkt wird. Dennoch spielt das Fettgewebe quantitativ für die Aufnahme der CR eine untergeordnete Rolle, weshalb sich die Untersuchungen der LRP1- vermittelten CR- Aufnahme in dieser Arbeit auf Leberzellen konzentrieren. Einen weiteren Hinweis auf die Insulinstimulierbarkeit des LRP1- Rezeptors liefern klinische Daten, die eine verzögerte Remnants- Clearance bei Patienten mit Insulinresistenz beschreiben (Ai, Tanaka et al. 2001). Ist im Rahmen einer diabetischen Insulinresistenz die Weiterleitung des Insulinsignals in die Zelle unterbrochen, unterbleibt die Translokation von LRP1, was letztlich zur Akkumulation von CR im Plasma führt (Eto, Watanabe et al. 1989). Auf Grund der möglichen Parallelität zwischen dem Glucosetransporter Glut4 und LRP1 liegt nahe, dass LRP1 eine zu Glut4 im Glucosestoffwechsel vergleichbare Rolle im Lipoproteinstoffwechsel einnimmt und die hoch atherogenen CR postprandial sehr effizient aus dem Blutkreislauf entfernt. Die These dieser Arbeit, die sich aus vorstehend beschriebenen Erkenntnissen ableitet ist in Abb. 16 dargestellt.

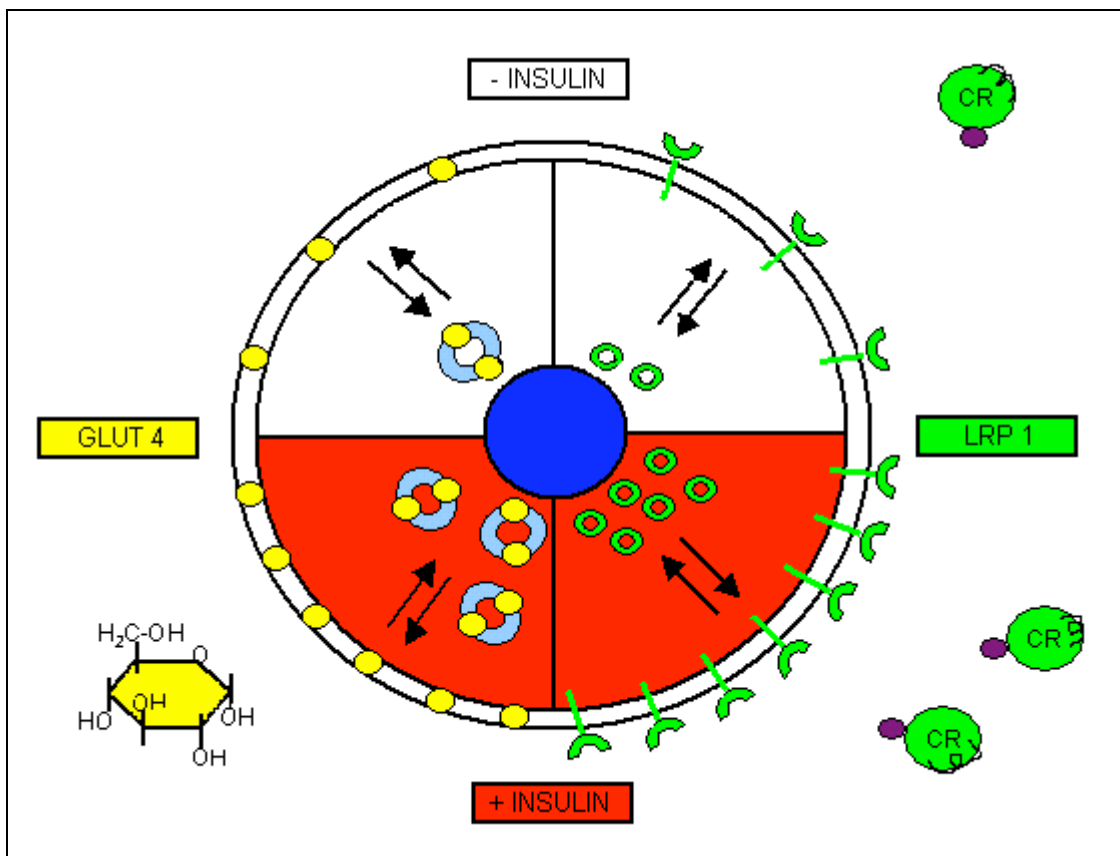


Abb. 16: Translokation von Glut4 und LRP1 aus dem Zytoplasma in die Zellmembran unter Insulineinfluss

Schematisch ist auf der linken Bildseite der Glucosetransporter Glut4 (gelb) dargestellt, welcher unter Insulineinwirkung (rot) in Fett- und Muskelzellen aus intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran transloziert. Postprandial können so durch Verlagerung der Glucose nach intrazellulär erhöhte Glucosespiegel effizient gesenkt werden. Rechts im Bild ist LRP1 (grün) abgebildet, der vermutlich eine analoge Rolle zu Glut4 im Lipidstoffwechsel verkörpert und Chylomikronen- Remnants (CR) in Hepatozyten aufnimmt, möglicherweise ebenfalls durch Insulin stimuliert (modifiziert nach Löffler, 1999).

In Übereinstimmung mit der These konnte gezeigt werden, dass eine Translokation von LRP1 in die Plasmamembran von Tert-, Huh7- und FAO- Zellen durch Insulinstimulation tatsächlich möglich ist (siehe Abb. 3, 4, 5; S. 47- 49). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die unter Insulin gesteigerte Expression des LRP1-Rezeptors in der Plasmamembran eine erhöhte Bindung von CR an FAO- Zellen nach sich zieht (siehe Abb. 6; S. 50). In der Folge gelang ebenfalls der Nachweis einer gesteigerten Aufnahme von RAP, in Tert-, Huh7- und FAO- Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz (siehe Abb. 8, 9, 10; S. 52-54). Die Ergebnisse bestätigen somit Befunde für die Leber, welche bisher nur an Fettgewebe von Nagern demonstriert werden konnten (Corvera, Graver et al. 1989; Descamps, Bilheimer et al. 1993).

In der quantitativen Analyse der LRP1- vermittelten Aufnahme spezifischer Liganden in Abhängigkeit von Insulin im Rahmen der oben beschriebenen Aufnahmeexperimente mit ^{125}I - Lactoferrin (Lf) bzw. ^{125}I - CR in Huh7- und FAO- Zellen erhielten wir überraschenderweise von den Ergebnissen der Immunfluoreszenzen abweichende Daten. Dabei zeigte sich nach Stimulation der Huh7- Zellen mit 100 nM Insulin und Inkubation der Zellen mit der 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konzentrierten ^{125}I - Lf- Lösung, dass entgegen unserer Annahme, mehr ^{125}I - Lf in die Zellen aufgenommen wurde, ohne vorherige Insulinstimulation. Selbiges Ergebnis stellte sich in den FAO- Zellen nach Inkubation der Zellen mit der 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konzentrierten ^{125}I - Lf- Lösung dar (siehe Abb. 12; S. 57). Statistisch signifikant gesteigert hingegen war die Aufnahme von ^{125}I - Lf nach Insulinstimulation der FAO- Zellen bei Inkubation mit der niedrig konzentrierten Liganden- Lösung (siehe Abb. 13; S. 58). Auch bei Inkubation der Huh7- und FAO- Zellen mit ^{125}I - CR war die Aufnahme ohne Insulinstimulation höher als in den Zellen mit Insulinstimulation, signifikant höher wiederum nach Inkubation mit der 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konzentrierten ^{125}I - CR- Lösung (siehe Abb. 15, S. 60). Somit konnte mit diesem Versuchsaufbau die eingangs formulierte Hypothese lediglich in Einklang mit den qualitativen Ergebnissen aus den Immunfluoreszenzen erbracht werden. Der Nachweis einer quantitativ gesteigerten Aufnahme gelang von ^{125}I - Lf in der niedrig konzentrierten Liganden- Lösung. Einen Hinweis und möglicherweise eine Erklärung für die teils widersprüchlichen Ergebnisse lieferten in diesem Zusammenhang weitere Studien mit den hepatischen FAO- Zellen, die zeigten, dass Insulin eine komplette Signalkaskade in den Rattenleberzellen auslöst (Dr. J. Heeren, unpublizierte Daten). Ist die Insulinstimulation der Zellen mit nachfolgender Translokation des LRP1- Rezeptors in die Zellmembran und der gesteigerten Aufnahme spezifischer Liganden des Rezeptors im Zusammenhang mit der Fortleitung einer Insulin-induzierten Signalkaskade ins Zellinnere zu sehen, wird möglicherweise ebenfalls die weitere Metabolisierung, sowie die Exkretion der aufgenommenen Partikel durch das Insulinsignal gesteuert. (Dr. J. Heeren, persönliche Kommunikation). In murinen Adipozyten konnte gezeigt werden, dass Insulin bei der Translokation von LRP1 den Rezeptor in bestimmte Bereiche der Plasmamembran steuert (Zhang, Links et al. 2004), den Caveolae, in denen sich neben vielen Signalrezeptoren auch der Insulinrezeptor befindet (Cohen, Hnasko et al. 2004), sowie ein grosser Anteil des translozierten Glut4 Transporters (Scherer, Lisanti et al. 1994). Für die radioaktiven

Aufnahmeexperimente in dieser Arbeit würde dies bedeuten, dass bei möglicherweise zu starker Insulinstimulation die spezifischen Liganden nach ihrer Aufnahme ebenso schnell wiederum aus der Zelle ausgeschleust werden. Da mit diesem Versuchsaufbau nur die sich letztlich bei der Messung intrazellulär befindlichen Liganden erfasst werden, könnte der Effekt der quantitativ gesteigerten Aufnahme der Liganden durch die ebenfalls gesteigerte Ausschleusung überlagert sein. Das Ergebnis wäre eine zu den im Vergleich nicht insulinstimulierten Zellen verminderte Aufnahme der Liganden nach Insulinstimulation, wie im vorliegenden Fall. Natürlich werfen die Differenzen in den radioaktiven Aufnahmeexperimenten zu den eindeutigen Ergebnissen in den Immunfluoreszenzen viele Fragen hinsichtlich der Spezifität des Versuchsaufbaus und der Durchführung der Experimente auf, die nach eingehender Analyse und Modulation einzelner Parameter hoffentlich zukünftig beantwortet werden können. Weiterhin eröffnen sich viele neue Fragen über den genauen Mechanismus der Insulin- induzierten Translokation von LRP1 und insbesondere über das quantitative Ausmass des Einflusses von Insulin auf die Aufnahme LRP1 spezifischer Liganden.

Ein weiteres grosses Ziel wäre die Übertragung der Ergebnisse auf das humane System, der definitive Nachweis einer Insulin- sensitiven humanen Leberzelllinie als Voraussetzung dafür steht jedoch noch aus. Auf Grund der zentralen Bedeutung von LRP1 im Lipoproteinstoffwechsel, sowie durch die gezeigte Insulinstimulierbarkeit von LRP1 und der damit einhergehenden Vernetzung mit dem Glucosestoffwechsel, wird LRP1 in der biomedizinischen Forschung auch in Zukunft in diesem Zusammenhang untersucht werden. Möglicherweise könnten molekularbiologische und metabolisch- endokrinologische Erkenntnisse auf diesem Gebiet gerade hinsichtlich der Pathogenese der besonders schwer ausgeprägten frühen Arteriosklerosebildung bei Typ II Diabetikern zukünftig neue pharmakologische Therapieansätze in Aussicht stellen. Bei der auf Grund unserer veränderten Lebensgewohnheiten drastisch zunehmenden Zahlen der Volkskrankheit Diabetes stehen wir in erster Linie in medizinischer Hinsicht, aber auch sekundär gesellschaftspolitisch, mit dieser Problematik vor einer grossen Herausforderung.

6 Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war in erster Linie den Einfluss von Insulin auf die Rezeptor- vermittelte Endozytose von LRP1- spezifischen Liganden in verschiedenen Leberzelllinien zu untersuchen. Im Mittelpunkt steht dabei LRP1, der heute als einer der wichtigsten hepatischen Remnants- Rezeptoren angesehen werden muss, der möglicherweise durch Insulin stimuliert in der postprandialen Phase Chylomikronen- Remnants (CR) aus dem Blut entfernen kann. Zunächst konnte mittels Immunocytochemie und konfokaler Mikroskopie die Lokalisation, bzw. die Translokation von LRP1 unter Insulinstimulation aus perinukleären Bereichen in die Plasmamembran von preadipozytär differenzierten bzw. humanen- und Ratten- Hepatomazellen gezeigt werden. Diese, durch den Glucosetransporter Glut4 bekannte Insulin- induzierte Translokation, wurde in Adipozyten bereits beschrieben (Descamps, Bilheimer et al. 1993; Zhang, Links et al. 2004) und konnte somit erstmalig auch für Leberzellen gezeigt werden.

Nach Markierung der CR, sowie des LRP1- spezifischen Liganden, das Rezeptor- assoziierte- Protein (RAP), mit Fluoreszenzfarbstoffen konnte ebenfalls mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie gezeigt werden, dass Insulin die Aufnahme von RAP in den oben genannten Zelllinien steigert. Zur quantitativen Analyse der LRP1 vermittelten Aufnahme unter Insulinstimulation wurden CR und Lactoferrin (Lf) mit ¹²⁵Iod markiert und quantitative Aufnahmeexperimente durchgeführt. In den Aufnahmeexperimenten mit den radioaktiv markierten Liganden konnte im Einklang mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzen unter dem Einfluss von Insulin eine vermehrte Aufnahme von Lf in FAO- Zellen nachgewiesen werden. Die Aufnahme von CR in Huh7- und in FAO- Zellen war unter dem Einfluss von Insulin allerdings vermindert. Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse konnten somit zeigen, dass Insulin die Lokalisation und Funktion des hepatischen Lipoprotein- Rezeptors LRP1 massgeblich beeinflusst. In weiteren Studien wird in Zukunft geklärt werden müssen, ob dieser Prozess in vivo den postprandialen Lipoprotein- stoffwechsel beeinflusst, und ob gegebenenfalls bei Störungen des Insulin- Signallings wie beim Typ II Diabetes mellitus, dies die Funktion von LRP1 beeinträchtigt.

7 Literaturverzeichnis

- Acton, S., A. Rigotti, et al. (1996). "Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor." *Science* **271**(5248): 518-20.
- Aggerbeck, L. P., J. R. Wetterau, et al. (1988). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the amino-terminal (receptor-binding) domain of human apolipoprotein E3 from serum very low density lipoproteins." *J Mol Biol* **202**(1): 179-81.
- Ahle, S., A. Mann, et al. (1988). "Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane." *Embo J* **7**(4): 919-29.
- Ai, M., A. Tanaka, et al. (2001). "Triglyceride-rich lipoprotein cholesterol exceeds low-density lipoprotein cholesterol in hypertriglyceridemia patients." *Horm Metab Res* **33**(10): 612-7.
- Alam, R., F. M. Yatsu, et al. (1989). "Receptor-mediated uptake and 'retroendocytosis' of high-density lipoproteins by cholesterol-loaded human monocyte-derived macrophages: possible role in enhancing reverse cholesterol transport." *Biochim Biophys Acta* **1004**(3): 292-9.
- Altmann, S. W., H. R. Davis, Jr., et al. (2004). "Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption." *Science* **303**(5661): 1201-4.
- Anderson, R. G. (1986). "Methods for visualization of the LDL pathway in cultured human fibroblasts." *Methods Enzymol* **129**: 201-16.
- Anderson, R. G., J. L. Goldstein, et al. (1977). "A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts." *Nature* **270**(5639): 695-9.
- Ashcom, J. D., S. E. Tiller, et al. (1990). "The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin." *J Cell Biol* **110**(4): 1041-8.
- Bacsikai, B. J., M. Q. Xia, et al. (2000). "The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11551-6.
- Beck-Nielsen, H. (1999). "General characteristics of the insulin resistance syndrome: prevalence and heritability. European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR)." *Drugs* **58 Suppl 1**: 7-10; discussion 75-82.
- Beil, F. U., S. S. Fojo, et al. (1992). "Apolipoprotein C-II deficiency syndrome due to apo C-II Hamburg: clinical and biochemical features and HphI restriction enzyme polymorphism." *Eur J Clin Invest* **22**(2): 88-95.
- Beisiegel, U. (1995). "Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism." *Curr Opin Lipidol* **6**(3): 117-22.
- Beisiegel, U. (1998). "Lipoprotein metabolism." *Eur Heart J* **19 Suppl A**: A20-3.
- Beisiegel, U. and J. Heeren (1997). "Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors." *Proc Nutr Soc* **56**(2): 731-7.
- Beisiegel, U., W. Weber, et al. (1991). "Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(19): 8342-6.
- Beisiegel, U., W. Weber, et al. (1989). "The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein." *Nature* **341**(6238): 162-4.
- Bergeron, N. and R. J. Havel (1996). "Prolonged postprandial responses of lipids and apolipoproteins in triglyceride-rich lipoproteins of individuals expressing an apolipoprotein epsilon 4 allele." *J Clin Invest* **97**(1): 65-72.
- Bjorkegren, J., A. Hamsten, et al. (1997). "Alterations of VLDL composition during alimentary lipemia." *J Lipid Res* **38**(2): 301-14.
- Bjorkegren, J., F. Karpe, et al. (1998). "Differences in apolipoprotein and lipid composition between human chylomicron remnants and very low density lipoproteins isolated from fasting and postprandial plasma." *J Lipid Res* **39**(7): 1412-20.
- Bloomgarden, Z. T. (1998). "Insulin resistance: current concepts." *Clin Ther* **20**(2): 216-31; discussion 215.
- Bonora, E., S. Kiechl, et al. (1998). "Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study." *Diabetes* **47**(10): 1643-9.
- Bonora, E., J. Willeit, et al. (1997). "Relationship between insulin and carotid atherosclerosis in the general population. The Bruneck Study." *Stroke* **28**(6): 1147-52.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.

- Bradley, W. A. and S. H. Gianturco (1986). "ApoE is necessary and sufficient for the binding of large triglyceride-rich lipoproteins to the LDL receptor; apoB is unnecessary." *J Lipid Res* **27**(1): 40-8.
- Brady, R. O., M. R. Filling-Katz, et al. (1989). "Niemann-Pick disease types C and D." *Neurol Clin* **7**(1): 75-88.
- Braell, W. A., D. M. Schlossman, et al. (1984). "Dissociation of clathrin coats coupled to the hydrolysis of ATP: role of an uncoating ATPase." *J Cell Biol* **99**(2): 734-41.
- Breslow, J. L., V. I. Zannis, et al. (1982). "Studies of familial type III hyperlipoproteinemia using as a genetic marker the apoE phenotype E2/2." *J Lipid Res* **23**(8): 1224-35.
- Brock, J. H. (2002). "The physiology of lactoferrin." *Biochem Cell Biol* **80**(1): 1-6.
- Brodsky, F. M. (1988). "Analysis of coated vesicle structure and function using anti-clathrin monoclonal antibodies." *Prog Clin Biol Res* **270**: 141-52.
- Brown, M. S., R. G. Anderson, et al. (1983). "Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins." *Cell* **32**(3): 663-7.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1974). "Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man." *Science* **185**(4145): 61-3.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." *Science* **232**(4746): 34-47.
- Brown, M. S., J. Herz, et al. (1997). "LDL-receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors." *Nature* **388**(6643): 629-30.
- Chappell, D. A., G. L. Fry, et al. (1992). "The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor binds and mediates catabolism of bovine milk lipoprotein lipase." *J Biol Chem* **267**(36): 25764-7.
- Chappell, D. A., I. Inoue, et al. (1994). "The carboxy-terminal domain of lipoprotein lipase induces cellular catabolism of normal very low density lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor." *Ann N Y Acad Sci* **737**: 434-8.
- Chen, W. J., J. L. Goldstein, et al. (1990). "NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor." *J Biol Chem* **265**(6): 3116-23.
- Choi, B. G., G. Vilahur, et al. (2006). "The role of high-density lipoprotein cholesterol in the prevention and possible treatment of cardiovascular diseases." *Curr Mol Med* **6**(5): 571-87.
- Choi, S. Y. and A. D. Cooper (1993). "A comparison of the roles of the low density lipoprotein (LDL) receptor and the LDL receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in chylomicron remnant removal in the mouse in vivo." *J Biol Chem* **268**(21): 15804-11.
- Cohen, A. W., R. Hnasko, et al. (2004). "Role of caveolae and caveolins in health and disease." *Physiol Rev* **84**(4): 1341-79.
- Corvera, S., D. F. Graver, et al. (1989). "Insulin increases the cell surface concentration of alpha 2-macroglobulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. Altered transit of the receptor among intracellular endocytic compartments." *J Biol Chem* **264**(17): 10133-8.
- Couillard, C., N. Bergeron, et al. (1998). "Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men." *Diabetes* **47**(6): 953-60.
- Crettaz, M., I. Jialal, et al. (1984). "Insulin receptor regulation and desensitization in rat hepatoma cells. The loss of the oligomeric forms of the receptor correlates with the change in receptor affinity." *J Biol Chem* **259**(18): 11543-9.
- Cummings, R. D., S. Kornfeld, et al. (1983). "Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor." *J Biol Chem* **258**(24): 15261-73.
- Davignon, J., R. E. Gregg, et al. (1988). "Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis." *Arteriosclerosis* **8**(1): 1-21.
- Davis, C. G., I. R. van Driel, et al. (1987). "The low density lipoprotein receptor. Identification of amino acids in cytoplasmic domain required for rapid endocytosis." *J Biol Chem* **262**(9): 4075-82.
- De Duve, C. and R. Wattiaux (1966). "Functions of lysosomes." *Annu Rev Physiol* **28**: 435-92.
- Descamps, O., D. Bilheimer, et al. (1993). "Insulin stimulates receptor-mediated uptake of apoE-enriched lipoproteins and activated alpha 2-macroglobulin in adipocytes." *J Biol Chem* **268**(2): 974-81.
- Deschatrette, J. and M. C. Weiss (1974). "Characterization of differentiated and dedifferentiated clones from a rat hepatoma." *Biochimie* **56**(11-12): 1603-11.
- Dickson, R. B., J. C. Nicolas, et al. (1981). "Internalization of alpha 2 macroglobulin in receptosomes. Studies with monovalent electron microscopic markers." *Exp Cell Res* **132**(2): 488-93.
- Dunn, W. A. and A. L. Hubbard (1984). "Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics." *J Cell Biol* **98**(6): 2148-59.

- Eccles, S. A., G. M. Box, et al. (1996). "Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94)." Cancer Res **56**(12): 2815-22.
- Egelrud, T. and T. Olivecrona (1972). "The purification of a lipoprotein lipase from bovine skim milk." J Biol Chem **247**(19): 6212-7.
- Eisenberg, S., E. Sehayek, et al. (1992). "Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix." J Clin Invest **90**(5): 2013-21.
- Eriksson, J., A. Franssila-Kallunki, et al. (1989). "Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus." N Engl J Med **321**(6): 337-43.
- Espirito Santo, S. M., N. M. Pires, et al. (2004). "Hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency in mice increases atherosclerosis independent of plasma cholesterol." Blood **103**(10): 3777-82.
- Eto, M., K. Watanabe, et al. (1989). "Apolipoprotein-E2 and hyperlipoproteinemia in noninsulin-dependent diabetes mellitus." J Clin Endocrinol Metab **69**(6): 1207-12.
- Everson, G. T. and E. L. Krawitt (1991). "Trial of S-adenosylmethionine in patients in two families with cholestatic syndromes." Gastroenterology **100**(6): 1784.
- Farkas, M. H., L. L. Swift, et al. (2003). "The recycling of apolipoprotein E in primary cultures of mouse hepatocytes. Evidence for a physiologic connection to high density lipoprotein metabolism." J Biol Chem **278**(11): 9412-7.
- Fazio, S., M. F. Linton, et al. (1999). "Recycling of apolipoprotein E in mouse liver." J Biol Chem **274**(12): 8247-53.
- Fazio, S., M. F. Linton, et al. (2000). "The cell biology and physiologic relevance of ApoE recycling." Trends Cardiovasc Med **10**(1): 23-30.
- Felts, J. M., H. Itakura, et al. (1975). "The mechanism of assimilation of constituents of chylomicrons, very low density lipoproteins and remnants - a new theory." Biochem Biophys Res Commun **66**(4): 1467-75.
- Fernandez-Borja, M., D. Bellido, et al. (1996). "Lipoprotein lipase-mediated uptake of lipoprotein in human fibroblasts: evidence for an LDL receptor-independent internalization pathway." J Lipid Res **37**(3): 464-81.
- Fielding, P. E. and C. J. Fielding (1980). "A cholesteryl ester transfer complex in human plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(6): 3327-30.
- Folch, J., M. Lees, et al. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.
- Gafvels, M. E., M. Caird, et al. (1993). "Cloning of a cDNA encoding a putative human very low density lipoprotein/apolipoprotein E receptor and assignment of the gene to chromosome 9pter-p23." Somat Cell Mol Genet **19**(6): 557-69.
- Geuze, H. J., J. W. Slot, et al. (1983). "Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis." Cell **32**(1): 277-87.
- Ghosh, R. N. and F. R. Maxfield (1995). "Evidence for nonvectorial, retrograde transferrin trafficking in the early endosomes of HEp2 cells." J Cell Biol **128**(4): 549-61.
- Goldberg, I. J., J. J. Kandel, et al. (1986). "Association of plasma lipoproteins with postheparin lipase activities." J Clin Invest **78**(6): 1523-8.
- Goldstein, J., Hobbs, H., and Brown, M. 2001. Familial hypercholesterolemia. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, and D. Valle, editors. McGraw-Hill. New York, New York, USA. 2863-2913.
- Gotthardt, M., M. Trommsdorff, et al. (2000). "Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction." J Biol Chem **275**(33): 25616-24.
- Gotto, A. M., Jr., H. J. Pownall, et al. (1986). "Introduction to the plasma lipoproteins." Methods Enzymol **128**: 3-41.
- Greenspan, P. and R. W. St Clair (1984). "Retroendocytosis of low density lipoprotein. Effect of lysosomal inhibitors on the release of undegraded 125I-low density lipoprotein of altered composition from skin fibroblasts in culture." J Biol Chem **259**(3): 1703-13.
- Gregg, R. E., L. A. Zech, et al. (1986). "Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans." J Clin Invest **78**(3): 815-21.
- Griffin, B. A. and C. J. Packard (1994). "Metabolism of VLDL and LDL subclasses." Curr Opin Lipidol **5**(3): 200-6.
- Häring, H. U. (1999). In: Mehnert H., Standl E., Usadel K.H., Häring H.U. *Diabetologie in Klinik und Praxis*. 4. Auflage, Thieme, Stuttgart 1999.
- Havel, R. J., H. A. Eder, et al. (1955). "The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum." J Clin Invest **34**(9): 1345-53.

- Havel, R. J. and R. L. Hamilton (1988). "Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism." *Hepatology* **8**(6): 1689-704.
- Havel, R. J., and J. P. Kane. 2001. Structure and metabolism of plasma lipoproteins. *In* The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol. 2. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, D. Valle, and W. S. Sly, editors. Mc Graw- Hill, New York. 2705- 2716.
- Hedblad, B., P. Nilsson, et al. (2000). "Relation between insulin resistance and carotid intima-media thickness and stenosis in non-diabetic subjects. Results from a cross-sectional study in Malmo, Sweden." *Diabet Med* **17**(4): 299-307.
- Heeren, J. and U. Beisiegel (2001). "Intracellular metabolism of triglyceride-rich lipoproteins." *Curr Opin Lipidol* **12**(3): 255-60.
- Heeren, J., U. Beisiegel, et al. (2006). "Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(3): 442-8.
- Heeren, J., T. Grewal, et al. (2001). "Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo." *J Biol Chem* **276**(45): 42333-8.
- Heeren, J., T. Grewal, et al. (2003). "Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization." *J Biol Chem* **278**(16): 14370-8.
- Heeren, J., A. Niemeier, et al. (2002). "Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo." *J Mol Med* **80**(9): 576-84.
- Heeren, J., W. Weber, et al. (1999). "Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation." *J Cell Sci* **112** (Pt 3): 349-59.
- Heller, D. A., U. de Faire, et al. (1993). "Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins." *N Engl J Med* **328**(16): 1150-6.
- Herz, J., J. L. Goldstein, et al. (1991). "39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor." *J Biol Chem* **266**(31): 21232-8.
- Herz, J., U. Hamann, et al. (1988). "Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor." *Embo J* **7**(13): 4119-27.
- Herz, J., R. C. Kowal, et al. (1990). "Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment." *Embo J* **9**(6): 1769-76.
- Herz, J. and D. K. Strickland (2001). "LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor." *J Clin Invest* **108**(6): 779-84.
- Heuser, J. (1980). "Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts." *J Cell Biol* **84**(3): 560-83.
- Hinshaw, J. E. and S. L. Schmid (1995). "Dynamain self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding." *Nature* **374**(6518): 190-2.
- Hobbs, H. H., M. S. Brown, et al. (1992). "Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia." *Hum Mutat* **1**(6): 445-66.
- Hobbs, H. H., D. W. Russell, et al. (1990). "The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein." *Annu Rev Genet* **24**: 133-70.
- Hofer, F., M. Gruenberger, et al. (1994). "Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(5): 1839-42.
- Hopkins, C. R., A. Gibson, et al. (1990). "Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum." *Nature* **346**(6282): 335-9.
- Hopkins, C. R., K. Miller, et al. (1985). "Receptor-mediated endocytosis of transferrin and epidermal growth factor receptors: a comparison of constitutive and ligand-induced uptake." *J Cell Sci Suppl* **3**: 173-86.
- Hospattankar, A. V., S. W. Law, et al. (1986). "Identification of low density lipoprotein receptor binding domains of human apolipoprotein B-100: a proposed consensus LDL receptor binding sequence of apoB-100." *Biochem Biophys Res Commun* **139**(3): 1078-85.
- Hotamisligil, G. S. and B. M. Spiegelman (1994). "Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link." *Diabetes* **43**(11): 1271-8.
- Hussain, M. M., R. W. Mahley, et al. (1989). "Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animal species." *J Biol Chem* **264**(30): 17931-8.
- Hussain, M. M., D. K. Strickland, et al. (1999). "The mammalian low-density lipoprotein receptor family." *Annu Rev Nutr* **19**: 141-72.
- Imaizumi, K., M. Fainaru, et al. (1978). "Composition of proteins of mesenteric lymph chylomicrons in the rat and alterations produced upon exposure of chylomicrons to blood serum and serum proteins." *J Lipid Res* **19**(6): 712-22.

- Imaizumi, K., R. J. Havel, et al. (1978). "Origin and transport of the A-I and arginine-rich apolipoproteins in mesenteric lymph of rats." *J Lipid Res* **19**(8): 1038-46.
- Innerarity, T. L., T. P. Bersot, et al. (1984). "Receptor binding activity of high-density lipoproteins containing apoprotein E from abetalipoproteinemic and normal neonate plasma." *Metabolism* **33**(2): 186-95.
- Innerarity, T. L., R. W. Mahley, et al. (1978). "Apoprotein (E--A-II) complex of human plasma lipoproteins. II. Receptor binding activity of a high density lipoprotein subfraction modulated by the apo(E--A-II) complex." *J Biol Chem* **253**(17): 6289-95.
- Isomaa, B., P. Almgren, et al. (2001). "Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome." *Diabetes Care* **24**(4): 683-9.
- Jackle, S., C. Huber, et al. (1993). "In vivo removal of beta-VLDL, chylomicron remnants, and alpha 2-macroglobulin in the rat." *J Lipid Res* **34**(2): 309-15.
- Jensen, P. H., S. K. Moestrup, et al. (1988). "Receptors for alpha 2-macroglobulin- and pregnancy zone protein-proteinase complexes in the human placental syncytiotrophoblast." *Placenta* **9**(5): 463-77.
- Ji, Z. S., W. J. Brecht, et al. (1993). "Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells." *J Biol Chem* **268**(14): 10160-7.
- Ji, Z. S., S. J. Lauer, et al. (1994). "Enhanced binding and uptake of remnant lipoproteins by hepatic lipase-secreting hepatoma cells in culture." *J Biol Chem* **269**(18): 13429-36.
- Ji, Z. S., D. A. Sanan, et al. (1995). "Intravenous heparinase inhibits remnant lipoprotein clearance from the plasma and uptake by the liver: in vivo role of heparan sulfate proteoglycans." *J Lipid Res* **36**(3): 583-92.
- Johansson, B. G. (1969). "Isolation of crystalline lactoferrin from human milk." *Acta Chem Scand* **23**(2): 683-4.
- Juhan-Vague, I. and M. C. Alessi (1993). "Plasminogen activator inhibitor 1 and atherothrombosis." *Thromb Haemost* **70**(1): 138-43.
- Kahn, S. E., R. L. Hull, et al. (2006). "Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." *Nature* **444**(7121): 840-6.
- Kane, J. P. (1996). Structure and Function of the Plasma Lipoproteins and Their Receptors. In: *Atherosclerosis and Coronary Disease*, 89-103. Edited by Fuster, V., Ross, R., and Topol, E. J., Philadelphia, Lippincott- Raven Publishers.
- Kambouris, A. M., P. D. Roach, et al. (1990). "Retroendocytosis of high density lipoproteins by the human hepatoma cell line, HepG2." *Arteriosclerosis* **10**(4): 582-90.
- Kancha, R. K., M. E. Stearns, et al. (1994). "Decreased expression of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in invasive cell clones derived from human prostate and breast tumor cells." *Oncol Res* **6**(8): 365-72.
- Karpe, F. (1997). "Mechanisms of postprandial hyperlipidaemia--remnants and coronary artery disease." *Diabet Med* **14 Suppl 3**: S60-6.
- Karpe, F. (2002). "Postprandial lipemia--effect of lipid-lowering drugs." *Atheroscler Suppl* **3**(1): 41-6.
- Karpe, F., M. L. Hellenius, et al. (1999). "Differences in postprandial concentrations of very-low-density lipoprotein and chylomicron remnants between normotriglyceridemic and hypertriglyceridemic men with and without coronary heart disease." *Metabolism* **48**(3): 301-7.
- Keen, J. H. and K. A. Beck (1989). "Identification of the clathrin-binding domain of assembly protein AP-2." *Biochem Biophys Res Commun* **158**(1): 17-23.
- Kellerer, M., R. Lammers, et al. (1999). "Insulin signal transduction: possible mechanisms for insulin resistance." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **107**(2): 97-106.
- Kim, D. H., H. Iijima, et al. (1996). "Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain." *J Biol Chem* **271**(14): 8373-80.
- Knouff, C., M. E. Hinsdale, et al. (1999). "ApoE structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice." *J Clin Invest* **103**(11): 1579-86.
- Kounnas, M. Z., R. E. Morris, et al. (1992). "The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A." *J Biol Chem* **267**(18): 12420-3.
- Kowal, R. C., J. Herz, et al. (1989). "Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(15): 5810-4.
- Kowal, R. C., J. Herz, et al. (1990). "Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein." *J Biol Chem* **265**(18): 10771-9.
- Krapp, A., S. Ahle, et al. (1996). "Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor-related protein (LRP)." *J Lipid Res* **37**(5): 926-36.

- Krapp, A., H. Zhang, et al. (1995). "Structural features in lipoprotein lipase necessary for the mediation of lipoprotein uptake into cells." *J Lipid Res* **36**(11): 2362-73.
- Krieger, M. and J. Herz (1994). "Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)." *Annu Rev Biochem* **63**: 601-37.
- Kristensen, T., S. K. Moestrup, et al. (1990). "Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor." *FEBS Lett* **276**(1-2): 151-5.
- Kunitake, S. T., C. M. Mendel, et al. (1992). "Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities." *J Lipid Res* **33**(12): 1807-16.
- Kwon, G., G. Xu, et al. (1999). "Tumor necrosis factor alpha-induced pancreatic beta-cell insulin resistance is mediated by nitric oxide and prevented by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and aminoguanidine. A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation and inos expression." *J Biol Chem* **274**(26): 18702-8.
- Lamon-Fava, S., J. A. Sadowski, et al. (1998). "Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K1) in humans." *Am J Clin Nutr* **67**(6): 1226-31.
- Leake, D. S. and T. J. Peters (1982). "Lipid accumulation in arterial smooth muscle cells in culture. Morphological and biochemical changes caused by low density lipoproteins and chloroquine." *Atherosclerosis* **44**(3): 275-91.
- Lewis, G. F. and D. J. Rader (2005). "New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport." *Circ Res* **96**(12): 1221-32.
- Liu, Y., M. Jones, et al. (2000). "Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands." *Nat Med* **6**(12): 1380-7.
- Löffler, G. (1999). *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 3., vollständig überarbeitete Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999.
- MacArthur, J. M., J. R. Bishop, et al. (2007). "Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members." *J Clin Invest* **117**(1): 153-64.
- Mahley, R. W. (1988). "Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology." *Science* **240**(4852): 622-30.
- Mahley, R. W., Y. Huang, et al. (1999). "Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes." *J Lipid Res* **40**(11): 1933-49.
- Mahley, R. W. and Z. S. Ji (1999). "Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E." *J Lipid Res* **40**(1): 1-16.
- Makimattila, S., M. L. Liu, et al. (1999). "Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes. Relation to LDL size, oxidized LDL, and antioxidants." *Diabetes Care* **22**(6): 973-81.
- Medh, J. D., S. L. Bowen, et al. (1996). "Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins in vitro." *J Biol Chem* **271**(29): 17073-80.
- Meilinger, M., M. Haumer, et al. (1995). "Removal of lactoferrin from plasma is mediated by binding to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor and transport to endosomes." *FEBS Lett* **360**(1): 70-4.
- Mekki, N., M. A. Christofilis, et al. (1999). "Influence of obesity and body fat distribution on postprandial lipemia and triglyceride-rich lipoproteins in adult women." *J Clin Endocrinol Metab* **84**(1): 184-91.
- Merkel, M., R. H. Eckel, et al. (2002). "Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation." *J Lipid Res* **43**(12): 1997-2006.
- Miller, N. E. and G. J. Miller (1975). "Letter: High-density lipoprotein and atherosclerosis." *Lancet* **1**(7914): 1033.
- Milne, R., R. Theolis, Jr., et al. (1989). "The use of monoclonal antibodies to localize the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B." *J Biol Chem* **264**(33): 19754-60.
- Moestrup, S. K. and J. Gliemann (1989). "Purification of the rat hepatic alpha 2-macroglobulin receptor as an approximately 440-kDa single chain protein." *J Biol Chem* **264**(26): 15574-7.
- Mukherjee, S., R. N. Ghosh, et al. (1997). "Endocytosis." *Physiol Rev* **77**(3): 759-803.
- Myers, J. N., I. Tabas, et al. (1993). "Beta-very low density lipoprotein is sequestered in surface-connected tubules in mouse peritoneal macrophages." *J Cell Biol* **123**(6 Pt 1): 1389-402.
- Nakabayashi, H., K. Taketa, et al. (1982). "Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium." *Cancer Res* **42**(9): 3858-63.
- Neville, D. M., Jr. (1971). "Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system." *J Biol Chem* **246**(20): 6328-34.

- Niemeier, A., M. Gafvels, et al. (1996). "VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro." *J Lipid Res* **37**(8): 1733-42.
- Niemeier, A., M. Kassem, et al. (2005). "Expression of LRP1 by human osteoblasts: a mechanism for the delivery of lipoproteins and vitamin K1 to bone." *J Bone Miner Res* **20**(2): 283-93.
- Norris, G. E., H. M. Baker, et al. (1989). "Preliminary crystallographic studies on human apo-lactoferrin in its native and deglycosylated forms." *J Mol Biol* **209**(2): 329-31.
- Novak, S., T. Hiesberger, et al. (1996). "A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse." *J Biol Chem* **271**(20): 11732-6.
- Nykjaer, A., G. Bengtsson-Olivecrona, et al. (1993). "The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta-migrating very low density lipoprotein associated with the lipase." *J Biol Chem* **268**(20): 15048-55.
- Octave, J. N., Y. J. Schneider, et al. (1983). "Iron mobilization from cultured hepatocytes: effect of desferrioxamine B." *Biochem Pharmacol* **32**(22): 3413-8.
- Olivecrona, G. and U. Beisiegel (1997). "Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(8): 1545-9.
- Olivecrona, T., G. Liu, et al. (1993). "Regulation of lipoprotein lipase." *Biochem Soc Trans* **21**(2): 509-13.
- Ossowski, L. and E. Reich (1983). "Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis." *Cell* **35**(3 Pt 2): 611-9.
- Pearse, B. M. (1988). "Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits." *Embo J* **7**(11): 3331-6.
- Rader, D. J. (2002). "High-density lipoproteins and atherosclerosis." *Am J Cardiol* **90**(8A): 62i-70i.
- Rader, D. J., J. Cohen, et al. (2003). "Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment." *J Clin Invest* **111**(12): 1795-803.
- Raychowdhury, R., J. L. Niles, et al. (1989). "Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor." *Science* **244**(4909): 1163-5.
- Reaven, G. M. (1988). "Dietary therapy for non-insulin-dependent diabetes mellitus." *N Engl J Med* **319**(13): 862-4.
- Rensen, P. C., M. C. Jong, et al. (2000). "Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis." *J Biol Chem* **275**(12): 8564-71.
- Rett, K. (1999). "The relation between insulin resistance and cardiovascular complications of the insulin resistance syndrome." *Diabetes Obes Metab* **1 Suppl 1**: S8-16.
- Robinson, M. S. (1994). "The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis." *Curr Opin Cell Biol* **6**(4): 538-44.
- Rogler, G., G. Herold, et al. (1991). "HDL3-retroendocytosis in cultured small intestinal crypt cells: a novel mechanism of cholesterol efflux." *Biochim Biophys Acta* **1095**(1): 30-8.
- Rohmann, A., M. Gotthardt, et al. (1998). "Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants." *J Clin Invest* **101**(3): 689-95.
- Roseanu, A., F. Chelu, et al. (2000). "Inhibition of binding of lactoferrin to the human promonocyte cell line THP-1 by heparin: the role of cell surface sulphated molecules." *Biochim Biophys Acta* **1475**(1): 35-8.
- Rosenberg, R. D., N. W. Shworak, et al. (1997). "Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated?" *J Clin Invest* **100**(11 Suppl): S67-75.
- Roses, A. D. (1996). "The Alzheimer diseases." *Curr Opin Neurobiol* **6**(5): 644-50.
- Rothman, J. E. and S. L. Schmid (1986). "Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles." *Cell* **46**(1): 5-9.
- Rubinstein, A., J. C. Gibson, et al. (1985). "Effect of heparin-induced lipolysis on the distribution of apolipoprotein e among lipoprotein subclasses. Studies with patients deficient in hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase." *J Clin Invest* **75**(2): 710-21.
- Ruiz, J., D. Kouivaskaia, et al. (2005). "The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor." *J Lipid Res* **46**(8): 1721-31.
- Ruoslahti, E. (1988). "Structure and biology of proteoglycans." *Annu Rev Cell Biol* **4**: 229-55.
- Russell, D. W., V. Esser, et al. (1989). "Molecular basis of familial hypercholesterolemia." *Arteriosclerosis* **9**(1 Suppl): I8-13.
- Saito, A., S. Pietromonaco, et al. (1994). "Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(21): 9725-9.
- Sandvig, K. and B. van Deurs (1996). "Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin." *Physiol Rev* **76**(4): 949-66.

- Scherer, P. E., M. P. Lisanti, et al. (1994). "Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles." *J Cell Biol* **127**(5): 1233-43.
- Schmid, S. L. and L. L. Carter (1990). "ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells." *J Cell Biol* **111**(6 Pt 1): 2307-18.
- Schneider, W. J., Kovanen, P. T., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Utermann, G., Weber, W., Havel, R. J., Kotite, L., Kane, J. P., Innerarity, T. L., and Mahley, R. W. (1981). Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. *J Clin. Invest* **68**, 1075-1085
- Schneider, W. J., U. Beisiegel, et al. (1982). "Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight." *J Biol Chem* **257**(5): 2664-73.
- Sehayek, E., X. X. Wang, et al. (1996). "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**(6): 449-54.
- Sevanian, A. and A. R. Peterson (1986). "The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products." *Food Chem Toxicol* **24**(10-11): 1103-10.
- Shafi, S., S. E. Brady, et al. (1994). "Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in rat liver." *J Lipid Res* **35**(4): 709-20.
- Shepherd, P. R. and B. B. Kahn (1999). "Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus." *N Engl J Med* **341**(4): 248-57.
- Shore, V. G. and B. Shore (1973). "Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components." *Biochemistry* **12**(3): 502-7.
- Simonsen, J. L., C. Rosada, et al. (2002). "Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells." *Nat Biotechnol* **20**(6): 592-6.
- Skerka, C., J. Hellwage, et al. (1997). "The human factor H-related protein 4 (FHR-4). A novel short consensus repeat-containing protein is associated with human triglyceride-rich lipoproteins." *J Biol Chem* **272**(9): 5627-34.
- Stefansson, S., D. A. Chappell, et al. (1995). "Glycoprotein 330/low density lipoprotein receptor-related protein-2 mediates endocytosis of low density lipoproteins via interaction with apolipoprotein B100." *J Biol Chem* **270**(33): 19417-21.
- Steijns, J. M. and A. C. van Hooijdonk (2000). "Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin." *Br J Nutr* **84 Suppl 1**: S11-7.
- Strickland, D. K., J. D. Ashcom, et al. (1990). "Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor." *J Biol Chem* **265**(29): 17401-4.
- Swift, L. L., K. Valyi-Nagy, et al. (2001). "Assembly of very low density lipoproteins in mouse liver: evidence of heterogeneity of particle density in the Golgi apparatus." *J Lipid Res* **42**(2): 218-24.
- Tabas, I., S. Lim, et al. (1990). "Endocytosed beta-VLDL and LDL are delivered to different intracellular vesicles in mouse peritoneal macrophages." *J Cell Biol* **111**(3): 929-40.
- Takahashi, S., Y. Kawarabayasi, et al. (1992). "Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(19): 9252-6.
- Takahashi, S., J. Suzuki, et al. (1995). "Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase." *J Biol Chem* **270**(26): 15747-54.
- Tall, A. R., P. Costet, et al. (2002). "Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux." *J Clin Invest* **110**(7): 899-904.
- Tall, A. R. and Y. Lange (1978). "Interaction of cholesterol, phospholipid and apoprotein in high density lipoprotein recombinants." *Biochim Biophys Acta* **513**(2): 185-97.
- Taskinen, M. R. (2002). "Controlling lipid levels in diabetes." *Acta Diabetol* **39 Suppl 2**: S29-34.
- Taskinen, M. R. (2002). "Diabetic dyslipidemia." *Atheroscler Suppl* **3**(1): 47-51.
- Taskinen, M. R. and U. Smith (1998). "Lipid disorders in NIDDM: implications for treatment." *J Intern Med* **244**(5): 361-70.
- Utermann, G., H. Canzler, et al. (1977). "Studies on the metabolic defect in Broad-beta disease (hyperlipoproteinaemia type III)." *Clin Genet* **12**(3): 139-54.
- Van Uden, E., G. Carlson, et al. (1999). "Aberrant presenilin-1 expression downregulates LDL receptor-related protein (LRP): is LRP central to Alzheimer's disease pathogenesis?" *Mol Cell Neurosci* **14**(2): 129-40.
- Veniant, M. M., C. H. Zlot, et al. (1998). "Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice." *J Clin Invest* **102**(8): 1559-68.

- Verges, M., A. Bensadoun, et al. (2004). "Endocytosis of hepatic lipase and lipoprotein lipase into rat liver hepatocytes in vivo is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein." J Biol Chem **279**(10): 9030-6.
- Warram, J. H., B. C. Martin, et al. (1990). "Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents." Ann Intern Med **113**(12): 909-15.
- Weinberg, E. D. (2001). "Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential." J Pharm Pharmacol **53**(10): 1303-10.
- Weiner, R. E. and S. Szuchet (1975). "The molecular weight of bovine lactoferrin." Biochim Biophys Acta **393**(1): 143-7.
- Weisgraber, K. H., T. L. Innerarity, et al. (1983). "The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Monoclonal antibody inhibition of binding." J Biol Chem **258**(20): 12348-54.
- Weisgraber, K. H., R. W. Mahley, et al. (1990). "Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein." J Biol Chem **265**(36): 22453-9.
- Weisgraber, K. H. and S. C. Rall, Jr. (1987). "Human apolipoprotein B-100 heparin-binding sites." J Biol Chem **262**(23): 11097-103.
- Wetterau, J. R., L. P. Aggerbeck, et al. (1988). "Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains." J Biol Chem **263**(13): 6240-8.
- Willnow, T. E., S. A. Armstrong, et al. (1995). "Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4537-41.
- Willnow, T. E., J. L. Goldstein, et al. (1992). "Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance." J Biol Chem **267**(36): 26172-80.
- Willnow, T. E. and J. Herz (1994). "Genetic deficiency in low density lipoprotein receptor-related protein confers cellular resistance to Pseudomonas exotoxin A. Evidence that this protein is required for uptake and degradation of multiple ligands." J Cell Sci **107 (Pt 3)**: 719-26.
- Willnow, T. E., J. Hilpert, et al. (1996). "Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8460-4.
- Willnow, T. E., J. M. Moehring, et al. (1996). "The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro." Biochem J **313 (Pt 1)**: 71-6.
- Willnow, T. E., K. Orth, et al. (1994). "Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein." J Biol Chem **269**(22): 15827-32.
- Willnow, T. E., Z. Sheng, et al. (1994). "Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist." Science **264**(5164): 1471-4.
- Wilson, C., M. R. Wardell, et al. (1991). "Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E." Science **252**(5014): 1817-22.
- Wolf, B. B., M. B. Lopes, et al. (1992). "Characterization and immunohistochemical localization of alpha 2-macroglobulin receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein) in human brain." Am J Pathol **141**(1): 37-42.
- Yamazaki, H., H. Bujo, et al. (1996). "Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member." J Biol Chem **271**(40): 24761-8.
- Yanagishita, M. and V. C. Hascall (1992). "Cell surface heparan sulfate proteoglycans." J Biol Chem **267**(14): 9451-4.
- Zambon, A., I. Schmidt, et al. (1996). "Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins." J Lipid Res **37**(11): 2394-404.
- Zannis, V. I., J. L. Breslow, et al. (1982). "Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes." J Lipid Res **23**(6): 911-4.
- Zhang, H., P. H. Links, et al. (2004). "Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment." J Biol Chem **279**(3): 2221-30.
- Zhang, L. and B. Liu (1992). "[Composition and distribution of lipid and apolipoprotein in plasma lipoproteins of endogenous hypertriglyceridemia]." Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao **23**(2): 117-21.
- Zhuo, M., D. M. Holtzman, et al. (2000). "Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation." J Neurosci **20**(2): 542-9.
- Zilversmit, D. B. (1979). "Atherogenesis: a postprandial phenomenon." Circulation **60**(3): 473-85.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

α	Anti
α_2M	alpha ₂ - Makroglobulin
Abb.	Abbildung
ACAT	Acyl- CoenzymA- Cholesterin- Acyltransferase
AK	Antikörper
AP	Adaptorproteine
Apo	Apolipoprotein
AS	Aminosäure
ATP	Adenylnukleotidtriphosphat
ATPase	ATP- spaltendes Enzym
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CE	Cholesterinester
CETP	Cholesterin- Ester- Transfer- Protein
CM	Chylomikronen
¹²⁵ I- CM	mit ¹²⁵ Iod radioaktiv markierte Chylomikronen
CPM	counts per minute
CR	Chylomikronen- Remnants
Cy	Cyanin- Farbstoff
δ	Dichte
DAPI	4',6- Diamidino- 2- phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Reticulum
etc.	et cetera
FAO	Rattenhepatomazellen

fC	freies Cholesterin
FCS	Fetal calf serum
fFS	freie Fettsäuren
FH	Familiäre Hyperlipoproteinämie
g	Erdbeschleunigung
Glut	Glucosetransporter
GP	Glykoprotein
GTP	Guanintriphosphat
GTPase	GTP- spaltendes Enzym
HDL	High Density Lipoprotein
HL	Hepatische Lipase
HLP	Hyperlipoproteinämie
hsMSC	humane, mesenchymale Stammzellen (adipozytär differenzierbar)
HSPG	Heparansulfat- Proteoglykane
Huh7	humane Hepatomazelllinie
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
KBr	Kaliumbromid
kDA	Kilodalton
KO	Knock out
LCAT	Lecithin- Cholesterin- Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	LDL- Rezeptor
Lf	Lactoferrin
¹²⁵ I- Lf	mit ¹²⁵ Iod radioaktiv markiertes Lactoferrin
LpL	Lipoproteinlipase
LRP1	LDL- Rezeptor Related Protein 1
MAP	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrixmetallproteinasen
NPC1L1	Niemann- Pick C1 Like 1 protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI- I	Plasminogen- Aktvator- Inhibitor I
PBS	Phosphate buffered saline

PFA	Paraformaldehyd
PI- 3- Kinase	Phosphatidylinositol- 3- Kinase
PKB	Proteinkinase B
PLTP	Phospholipidtransferprotein
PPD	1,4- Phenyldiamin
R	Rezeptor
RAP	Receptor associated protein
rER	rauhes Endoplasmatisches Reticulum
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SR- B1	Scavenger- Rezeptor Klasse B1
Tab.	Tabelle
Tert	durch stabile Telomerase- Expression immortalisierte hsMSC
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin- Rezeptor
TG	Triglyzeride
THL	Tetrahydrolipstatin
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
tPA	tissue- type Plasminogen- Activator
TRL	Triglycerid- reiche Lipoproteine
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
VLDLR	VLDL- Rezeptor
z.B.	zum Beispiel

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des LRP1- Rezeptors	15
Tab. 1:	Primäre Antikörper	37
Tab. 2:	Sekundärer Antikörper	38
Tab. 3:	Zusammensetzung der Inkubationslösung für die Bindungs/ Aufnahmeassays	39
Tab. 4:	Radioaktive Liganden	43
Tab. 5:	Radioaktive Inkubationslösungen	43
Abb. 2:	Zusammensetzung humaner Chylomikronen	46
Abb. 3:	Insulin- abhängige Lokalisation von LRP1 in nicht- permeabilisierten Tert- Zellen	47
Abb. 4:	Insulin- abhängige Lokalisation von LRP1 in nicht- permeabilisierten Huh7- Zellen	48
Abb. 5:	Insulin- abhängige Lokalisation von LRP1 in permeabilisierten FAO- Zellen	49
Abb. 6:	Insulin- abhängige Bindung von Cy 3- Chylomikronen- Remnants (CR) an FAO- Zellen	50
Abb. 7:	Insulin- abhängige Aufnahme von Cy 3- Chylomikronen- Remnants (CR) in FAO- Zellen	51
Abb. 8:	Insulin- abhängige Aufnahme von RAP- Alexa 488 in humanen Tert- Zellen	52

Abb. 9:	Insulin- abhängige Aufnahme von RAP- Alexa 488 in Huh7- Zellen	53
Abb. 10:	Insulin- abhängige Aufnahme von RAP- Alexa 488 in FAO- Zellen	54
Abb. 11:	Autoradiographie der jodierten Liganden nach Trennung mittels SDS- Page	55
Abb. 12:	Insulin- abhängige Aufnahme von ^{125}I - Lactoferrin (Lf) in Huh7- und FAO- Zellen	57
Abb. 13:	Insulin- abhängige Aufnahme von ^{125}I - Lactoferrin (Lf) in Huh7- und FAO- Zellen	58
Abb. 14:	Insulin- abhängige Aufnahme von ^{125}I - Chylomikronen-Remnants (CR) in Huh7- und FAO- Zellen	59
Abb. 15:	Insulin- abhängige Aufnahme von ^{125}I - Chylomikronen-Remnants (CR) in Huh7- und FAO- Zellen	60
Abb. 16:	Translokation von Glut4 und LRP1 aus dem Zytoplasma in die Zellmembran unter Insulineinfluss	66

8.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Beisiegel für Ihren Einsatz, Ihr Vertrauen in mich und der grosszügigen Bereitstellung des Themas dieser Doktorarbeit.

Ich danke Dr. Jörg Heeren für die exzellente wissenschaftliche Betreuung, sowie für die überaus schöne Zeit, die ich im Labor in seiner Arbeitsgruppe verbringen durfte.

Dr. Alexander Laatsch ebenfalls für seine hervorragende Anleitung, insbesondere für seine Arbeit am konfokalen Mikroskop.

Schliesslich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors bedanken, für Ihre grosse Hilfsbereitschaft und Unterstützung, in einer absolut tollen Atmosphäre.

Vielen Dank an meine Freunde, Daniel, Simon, Breiti und Ulla.

Anton und Julius meinen beiden Brüdern, für Ihre Hilfe in allen Computerfragen, Ihrer Beratung, Unterstützung, Motivation, Kritik und Aufmunterung in allen Lagen.

Meinen Eltern, für Ihre unglaublich grosse und liebevolle Unterstützung.

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anna Caterina Steinbeck
Geburtsdatum	16.04.1979
Geburtsort	München
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1985- 1989	Grundschule, Planegg
1989- 1998	Karls- Gymnasium, Pasing
05/ 98	Abitur

Studium

WS 1999	1./ 2. Semester Humanmedizin Simmelweiss- Universität Budapest, Ungarn
SS 2000	2. Semester Humanmedizin Universität Hamburg
9/ 2001	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
8/ 2002	1. Staatsexamen
3/ 2005	2. Staatsexamen
11/ 2006	3. Staatsexamen und Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr

1. Tertial Innere Medizin	The Heart Hospital, London
2. Tertial Chirurgie	Univeritätsklinikum Eppendorf, Hamburg
3. Tertial Anaesthesiologie	Marienkrankenhaus, Hamburg

8.5 Eidesstattliche Erklärung

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

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

Anna Steinbeck