

Untersuchungen zur bifunktionellen Rolle von HDL

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Gunnar Höbbel

aus Dortmund

Hamburg 1999

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Bisping

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Assmann, Westfälische-Wilhelms-Universität Münster

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 29. November 1999

Für Anja,
meine Eltern,
und Holger, Eva und Hendrik.

und für alle gebeutelten Doktoranden in den Laboren dieser Welt:

Der Gelkönig

Wer steht da so spät im Abzugswind ?
Der Doktorand pipettiert dort geschwind.
Er hält das Eppi, er hält es warm,
Darin die Bakterien, E. coli vom Darm.
„Oh Probe, was pelletierst Du so schlecht ?
Es ist schon halb eins, das ist nicht gerecht.
Ich muß doch nach Hause, dort wartet die Frau,
Sie wird sich beschweren, ich weiß es genau.“
Da plötzlich die Stimme im leeren Labor,
Sie kommt aus dem Nichts, sie dringt an sein Ohr:
„Du Knecht des Versuches so gehe nicht fehl,
Beeil‘ Dich mal lieber und gieße das Gel !“
„Professor, Professor, bist Du’s den ich hör‘ ?
Doch nein, Du hast Urlaub, Du bist ja auf Föhr.“
„Sei ruhig mein Sohn und fürchte Dich nicht,
Ich bin der Gelkönig... komm‘ wieder an’s Licht.
Na, soll ich Dir helfen bei Deinem Versuch ?
Du brauchst meine Hilfe, so steht’s nicht im Buch.“
„Ja, Gelkönig, ja, ich gieße das Gel,
Für’n gutes Ergebnis geb‘ ich Dir mein Seel‘ !“
„So machst Du es richtig, ja so ist es fein,
Nun lade und schalte das Netzgerät ein !“
„Oh König, oh König, ich seh es genau,
Der Marker ist falsch, er ist gar nicht blau.“
„Egal jetzt mein Sohn, nun spute Dich bald,
Und bist Du nicht willig, so kürz‘ ich’s Gehalt !“
„Mein König, mein König, das Gel läuft ganz schief,
Und all‘ diese Puffer, die sorgen für Mief.“
Dem Doktorand grauset’s, er sucht RNA,
Doch auch nach zwei Stunden ist einfach nichts da.
Er grübelt, er zweifelt, er hat’s nicht kapiert.
Die RNA: ist komplett degradiert !

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1995 bis November 1999 im Institut für Arterioskleroseforschung an der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Abkürzungsverzeichnis	4
2. I. Zusammenfassung.....	6
2. II. Summary.....	8
3. Einleitung.....	10
3.1. High Density Lipoproteine und Arteriosklerose	10
3.2. Definition, Struktur und Metabolismus der HDL.....	12
3.3. Einfluß von HDL auf die zelluläre Cholesterinhomöostase	15
3.4. HDL-Bindungsproteine.....	19
3.5. Mögliche andere Funktionen der HDL	20
3.6. HDL und Signaltransduktion	21
3.6.1. Phosphatasen	23
3.7. HDL und Zellwachstum.....	24
3.8. Tangier-Krankheit.....	26
3.9. Aufgabenstellung	30
4. Material und Methoden.....	31
4.1. Materialien	31
4.1.1. Geräte	31
4.1.2. Chemikalien und Enzyme.....	32
4.1.3. Lösungen und Medien	32
4.2. Methoden	34
4.2.1. Kultivierung humaner Hautfibroblasten [208]	34
4.2.1.1. Biopsie und Kultivierung humaner Hautfibroblasten	34
4.2.1.2. Subkultivierung von Monolayerkulturen.....	34
4.2.1.3. Kryokonservierung von Zellen	35
4.2.1.4. Auftauen kryokonservierter Zellen.....	35
4.2.1.5. Ausplattieren der Zellen für Experimente.....	36
4.2.1.6. Zellzahlbestimmung	36
4.2.2. Lipoproteinpräparation.....	36
4.2.2.1. Protein-Konzentrationsbestimmung	37
4.2.2.2. Modifizierung der HDL ₃	38
4.2.2.2.1. Nitrierung von HDL ₃	38
4.2.2.2.2. Modifizierung von HDL ₃ mit Dimethylsuberimidat.....	39
4.2.2.3. Delipidierung von Lipoproteinen [284].....	39
4.2.2.4. Isolierung von Apolipoprotein A-I	39
4.2.2.5. Präparation von Apo-A-I-Proteoliposomen.....	40
4.2.2.6. Isolation von Apolipoprotein A-II und Herstellung von Apo-A-II-Proteoliposomen.....	41
4.2.2.7. Herstellung von Liposomen mit Lipiden aus HDL.....	41
4.2.3. Vorinkubation der Zellen zur Beladung mit Cholesterin.....	42

4.2.4. Methoden zur Cholesterinbestimmung	42
4.2.4.1. Lipidextraktion des Mediums	42
4.2.4.2. Lipidextraktion der Zellen	43
4.2.4.3. Fluorimetrisch-enzymatische Cholesterinbestimmung	43
4.2.4.4. Bestimmung von Cholesterin mittels HPLC	45
4.2.4.5. Gaschromatographische Bestimmung von Cholesterin	45
4.2.4.6. Nachweis von Cholesterin mittels DC	46
4.2.4.6.1. Detektion nichtradioaktiver Lipide durch Anfärbung der DC-Folien [301].....	47
4.2.4.7. Messung des Cholesterin-Masseneffluxes bei kurzen Inkubationszeiten	48
4.2.5. Phosphatase-Assay	50
4.2.6. Bestimmung der Phosphataseaktivität	52
4.2.7. Polyacrylamidgelelektrophorese	52
4.2.8. Durchführung der Versuche zum Zellwachstum	53
5. Ergebnisse	55
5.1. Etablierung einer Methode zur Bestimmung des Cholesterineffluxes.....	55
5.2. Einfluß verschiedener Beladungsmethoden	57
5.3. Cholesterinefflux aus Kontrollfibroblasten: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit.....	60
5.3.1. HDL-induzierter Cholesterinefflux.....	60
5.3.1.1. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Inkubationszeit	60
5.3.1.2. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Konzentration	62
5.3.2. Apo-A-I-induzierter Cholesterinefflux	64
5.3.2.1. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Inkubationszeit	64
5.3.2.2. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Konzentration	66
5.3.3. Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterinefflux.....	68
5.3.3.1. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Inkubationszeit	68
5.3.3.2. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Konzentration	70
5.3.4. Cholesterinefflux: Vergleich von HDL, Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen.....	72
5.4. Cholesterinefflux aus Tangierfibroblasten	77
5.4.1. HDL-induzierter Cholesterinefflux.....	77
5.4.1.1. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Inkubationszeit	77
5.4.1.2. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Konzentration	79
5.4.2. Apo-A-I-induzierter Cholesterinefflux	81
5.4.2.1. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Inkubationszeit	81
5.4.2.2. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Konzentration	83
5.4.3. Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterinefflux.....	85
5.4.3.1. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Inkubationszeit	85
5.4.3.2. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Konzentration	87
5.4.4. Cholesterinefflux bei Tangierfibroblasten: Vergleich von HDL, Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen.....	89
5.4.5. Cholesterinefflux: Vergleich von Tangierzellen und Kontrollzellen.....	93
5.5. Cholesterin-Massenefflux: HDL-induzierte Signaltransduktionswege	97
5.5.1. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung der Proteinkinase C.....	98

5.5.2. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung der PI-PLC.....	101
5.5.3. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung der PC-PLC	103
5.5.4. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung der PC-PLD	105
5.5.5. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung von Lysosulphatiden	107
5.5.5. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung weiterer Proteinkinasen	108
5.5.6. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung von Guanylat-Cyclasen.....	110
5.5.7. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Ca ²⁺	112
5.5.8. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Proteinphosphatasen der PPP- und PPM-Familie	115
5.5.8.1. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Okadasäure	115
5.5.8.2. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Calyculin A.....	117
5.5.8.3. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Cantharidin	119
5.5.8.4. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Endothal	121
5.5.9. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Proteinphosphatasen der PTP-Familie	123
5.6. Phosphataseaktivität in Fibroblasten	125
5.6.1. Phosphataseaktivität: Phosphorylierung zellulärer Proteine.....	127
5.6.1.1. Phosphataseaktivität: HDL-abhängige Proteinphosphorylierung	127
5.6.1.2. Phosphataseaktivität: TNM-HDL-abhängige Proteinphosphorylierung	130
5.6.1.3. Phosphataseaktivität: Apo-A-I-abhängige Proteinphosphorylierung.....	133
5.6.1.4. Phosphataseaktivität: Calyculin A-abhängige Proteinphosphorylierung	137
5.6.1.5. Phosphataseaktivität: Okadasäure-abhängige Proteinphosphorylierung	140
5.6.1.6. Phosphataseaktivität: Cantharidin-abhängige Proteinphosphorylierung	143
5.7. Mitogene Aktivität der HDL.....	146
5.7.1. Mitogene Aktivität der HDL: Konzentrationsabhängigkeit	146
5.7.1.1. Mitogene Aktivität der HDL: Vergleich von Tangier- und Kontrollzellen	152
5.8. Mitogene Aktivität der HDL: Einfluß von Inhibitoren	154
5.8.1. Mitogene Aktivität der HDL: Inhibition der Proteinkinase C	154
5.8.2. Mitogene Aktivität der HDL: Inhibition von Proteinphosphatasen.....	156
5.8.3. Mitogene Aktivität der HDL: Beteiligung von PI-PLC, PC-PLC und PC-PLD	159
5.8.4. Mitogene Aktivität der HDL: Nähere Charakterisierung des Phospholipidstoffwechsels	161
5.8.5. Mitogene Aktivität der HDL: Beteiligung von Proteinkinasen	163
5.8.6. Mitogene Aktivität der HDL: Einfluß von Ca ²⁺	165
6. Diskussion	168
6.1. HDL-induzierter Cholesterinefflux	168
6.1.1. Etablierung der Methodik.....	168
6.1.2. Untersuchung des HDL-induzierten Cholesterin-Masseneffluxes	170
6.1.2.1 HDL-induzierter Cholesterinefflux an Zellen von Tangier-Patienten	172
6.2. Mitogene Wirkung von HDL	173
6.3. Nähere Charakterisierung der HDL-induzierten Signaltransduktion	176
7. Literaturverzeichnis	186
8. Lebenslauf.....	192
9. Danksagung	193

1. Abkürzungsverzeichnis

A	ACAT	AcetylCoA:Cholesterin-Acyltransferase
	ADP	Adenosindiphosphat
	ATP	Adenosintriphosphat
	Apo	Apolipoprotein
B	BAPTA-AM	1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetat-(acetomethyl)ester
	BrdU	Bromdeoxyuridin
C	cAMP	Zyklisches Adenosin-monophosphat
	CETP	Cholesterin Ester Transfer Protein
	cGMP	Zyklisches Guanosin-monophosphat
D	DAG	Diacylglycerin
	DC	Dünnschichtchromatographie
	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
	DMS	Dimethylsuberimidat
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	Dpm	Zerfälle pro Minute (Departures per minute)
	DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
E	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal growth factor)
	ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	FCS	Fetales Kälber-Serum (Fetal calve serum)
	FPLC	Fast-Protein-Liquid-Chromatographie
G	GC	Gaschromatographie
	GDP	Guanosindiphosphat
	GTP	Guanosintriphosphat
H	HDL	Lipoproteine hoher Dichte (High-density lipoproteins)
	HDL ₃	HDL-Subfraktion 3 (mit einer Dichte von 1,125 bis 1,21 kg/l)
	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethanschwefelsäure
	HPLC	High-Pressure- bzw. High-Performance-Liquid Chromatographie
I	IDL	Lipoproteine mittlerer Dichte (Intermediate-density lipoproteins)
	IP ₃	Inositoltriphosphat
K	KHK	Koronare Herzkrankheit

L	LCAT	Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase
	LDL	Lipoproteine niedriger Dichte (Low-density lipoproteins)
	LOX	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor
	Lyso-PC	Lyso-Phosphatidylcholin
M	MAP-Kinase	Mitogen-Activated-Proteinkinase
P	PA	Phosphatidsäure (Phosphatidic Acid)
	PA-PPH	Phosphatidic Acid-Phosphohydrolase
	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered saline)
	PC	Phosphatidylcholin
	PC-PLC	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C
	PC-PLD	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase D
	PDGF	Plättchen-Wachstumsfaktor (Platelet-derived growth factor)
	PI	Phosphatidylinositol
	PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
	PIP	Phosphatidylinositolmonophosphat
	PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
	PKA	Proteinkinase A
	PKC	Proteinkinase C
	PLC	Phospholipase C
	PLD	Phospholipase D
	PLTP	Phospholipid Transfer Protein
	PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
	PP1	Proteinphosphatase der Gruppe 1
	PP2A	Proteinphosphatase der Gruppe 2A
	PP2B	Proteinphosphatase der Gruppe 2B
	PSL	Photostimulated Luminescence
S	SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
	SCAP	Sterol Regulatory Element-Binding Protein Cleavage Protein
T	TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethyldiamin
	TNM	Tetranitromethan
U	upm	Umdrehungen pro Minute
V	(v/v)	Volumenverhältnis (Volume over volume)
	VLDL	Lipoproteine sehr niedriger Dichte (Very-low-density lipoproteins)
	Vol.	Volumen
Z	z.A.	„zur Analyse“, Reinheitsgrad der benutzten Chemikalien

2. I. Zusammenfassung

Es besteht ein inverser Zusammenhang zwischen der HDL-Konzentration im Blut und der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen. HDL haben verschiedene potentiell antiatherogene Funktionen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden: die über zelluläre Signaltransduktionswege vermittelte Induktion von Cholesterinefflux und die Beeinflussung des Zellwachstums. Ziel der Arbeit war es, die durch HDL induzierten Signaltransduktionswege diesen beiden Funktionen durch *in vitro* Versuche an kultivierten menschlichen Fibroblasten zuzuordnen.

Zellwachstum wurde mit einem fluorimetrischen Test mittels Inkorporation von Bromdeoxyuridin in die DNA der Zellen gemessen. Zur Untersuchung des Cholesterineffluxes wurde die im Zellüberstand akkumulierende Cholesterinmasse mit Hilfe einer ultrasensitiven gaschromatographischen Methode ermittelt. HDL induzierten in humanen Hautfibroblasten konzentrationsabhängig Netto-Cholesterin-Massenefflux und Zellwachstum. Der Cholesterinefflux war im HDL-Konzentrationsbereich bis 100 µg/ml bis zu 6 mal effektiver als der Cholesterinefflux nur in Anwesenheit eines unspezifischen Cholesterinakzeptors (1000 µg/ml Albumin). Die durch HDL induzierte DNA-Synthese erreichte etwa 80 % des durch Vollmedium induzierten Wertes.

Mit Hilfe verschiedener Inhibitoren wurde gezeigt, daß der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux über eine G-Protein-abhängige Aktivierung der PC-spezifischen Phospholipasen C und D induziert wird. Die bei der PC-Hydrolyse entstehenden Second Messenger Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidsäure (PA) waren an der Induktion von Cholesterin-Massenefflux beteiligt: DAG über eine Aktivierung von PKC und die nachfolgende Phosphorylierung zellulärer Proteine, die unter der Kontrolle Serin- / Threonin-spezifischer Phosphatasen stehen; PA über die Umwandlung in DAG und möglicherweise auch direkt über nicht identifizierte Mechanismen. Für die bei der PC-Hydrolyse gebildeten wasserlöslichen Produkte Cholin und Phosphorylcholin konnte keine Beteiligung an der Induktion von Cholesterin-Massenefflux gezeigt werden. Die mit der PC-Hydrolyse assoziierte Cholesterinefflux-Signalkaskade konnte durch das Hauptstrukturprotein der HDL, Apo-A-I, induziert werden und war mit der Phosphorylierung von Proteinen mit den molekularen Massen von 14, 65 und 71 kDa assoziiert.

Die durch HDL ebenfalls induzierte Aktivierung von PI-PLC war nicht an der Induktion von Cholesterin-Massenefflux beteiligt. Die Aktivierung von PI-PLC war – zusammen mit der Aktivierung von PC-PLC – an der Induktion der mitogenen Wirkung der HDL beteiligt. Der bei der PI-Hydrolyse gebildete Second Messenger Inositoltriphosphat (IP₃) induzierte die

Mobilisierung zellulären Calciums. Durch Ca^{2+} aktivierte Effektoren sind Phospholipase A_2 (PLA_2) und MAP-Kinase. Für das bei der PC-Hydrolyse mittels PC-PLC entstehende Phosphorylcholin konnte ebenfalls eine Beteiligung an der Induktion von Zellwachstum gezeigt werden. Die für die mitogene Wirkung der HDL phosphorylierten Proteine werden sowohl durch Serin- / Threonin-spezifische Phosphatasen als auch durch Tyrosin-spezifische Phosphatasen reguliert; die Phosphorylierung dieser Proteine mit Molekulargewichten zwischen 14 und 81 kDa wurde nicht durch Apo-A-I induziert. Mit HDL assoziierte Lysosulphatide konnten als mögliche Induktoren der mitogenen Wirkung aufgezeigt werden. Der durch HDL induzierte Cholesterin-Massenefflux und das durch HDL induzierte Wachstumsverhalten werden somit in kultivierten Fibroblasten durch unterschiedliche Liganden und Signaltransduktionswege getriggert, wobei die PC-PLC in beide Signalwege, die PI-PLC ausschließlich in den mitogenen Signalweg involviert ist. Die Regulation (und *in vitro* Verstärkung) des Cholesterin-Masseneffluxes durch Phosphatase-Inhibitoren zeigt einen neuen möglichen Ansatz einer antiateriosklerotischen Therapie auf.

2. II. Summary

Epidemiological studies revealed a strong inverse correlation between high density lipoprotein (HDL) cholesterol plasma levels and the incidence of cardiovascular disease. This finding is usually explained by the ability of HDL to remove cholesterol from peripheral cells for delivery in the liver. An additional proposed function of HDL which may influence atherogenesis is the modulation of cell growth.

In this study, the influence of HDL-induced cell signalling on cholesterol excretion and mitogenesis was examined. DNA synthesis was assessed by measuring bromdeoxyuridine (BrdU) incorporation into DNA using a commercially available ELISA. Cholesterol efflux was measured by gas-liquid-chromatography. In cholesterol-loaded human skin fibroblasts, low concentrations of HDL (< 100 µg/ml) induced cholesterol mass efflux in a non-linear concentration-dependent manner. A strong proliferative effect of HDL (upto 80 % of the effect induced by foetal calf serum) reached saturation at concentrations of 500 – 750 µg/ml.

By use of different inhibitors it was shown that HDL-induced cholesterol mass efflux in cultivated human skin fibroblasts occurs via a G-protein-dependent activation of phosphatidylcholine (PC)-specific phospholipases C and D. The produced lipid second messengers diacylglycerol (DAG) and phosphatidic acid (PA) were found to be involved in this process. DAG (via activation of protein kinase C) induced the phosphorylation of proteins with apparent molecular masses of 14 to 81 kDa. These phosphoproteins were regulated by serine- /threonine-, but not by tyrosine-specific phosphatases. The water-soluble products of PC-hydrolysis (cholin and phosphorylcholin) were not directly involved in cholesterol mass efflux *in vitro*. The HDL-induced effects on PC-hydrolysis and cholesterol efflux could be mimicked by apolipoprotein A-I (apo-A-I), the main protein constituent of HDL. Apo-A-I induced the phosphorylation of proteins with apparent molecular weights of 14, 65 and 71 kDa.

HDL induced activation of phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) was not involved in the activation of cholesterol efflux in cholesterol loaded cells. PI-PLC activation, however, was involved in the mitogenic effect of HDL. The second messenger inositoltrisphosphate (IP₃) initiated the release of cellular Ca²⁺. Ca²⁺-dependent downstream effectors activated by HDL are phospholipase A₂ (PLA₂) and MAP-kinase. The HDL-dependent mitogenic response was regulated by both serine- /threonine- and tyrosine-specific phosphatases. Lysosulphatides were found at least partly responsible for the described mitogenic effects.

In conclusion, HDL-induced cholesterol efflux and mitogenesis are induced by different ligands and are regulated by different cell signalling pathways in cultivated human skin fibroblasts. The cell signalling molecules involved in these pathways (kinases, phosphatases and phosphoproteins) might be potential targets for an antiatherogenic therapy.

3. Einleitung

Herz- Kreislauferkrankungen sind in den Industrienationen die Haupttodesursache [337]. Neben Risikofaktoren wie Rauchen und Bluthochdruck zählen Lipidstoffwechselstörungen zu den Hauptursachen arteriosklerotischer Erkrankungen.

3.1. High Density Lipoproteine und Arteriosklerose

Cholesterin ist ein für die Zellen höherer Lebewesen essentielles Lipidmolekül. Es ist eine wichtige Komponente zur Regulation der allgemeinen und lokalen physikochemischen Eigenschaften der Membran und Vorläufer für die Steroidhormon- und Gallensäurebiosynthese. Die Zellen höherer Lebewesen können Cholesterin synthetisieren und sind in der Regel nicht auf eine externe Zuführung von Cholesterin angewiesen, mit Ausnahme starker Wachstumsphasen, wie z.B. bei Zellen des in der Entwicklung begriffenen zentralen Nervensystems.

Der menschliche Organismus produziert täglich etwa 10 mg Cholesterins pro kg Körpergewicht, davon nur 5 – 10 % in der Leber. Da in peripheren Zellen keine Möglichkeit besteht Cholesterin abzubauen, müssen täglich ca. 9 mg Cholesterin pro kg Körpergewicht zur Leber transportiert und dort zu Gallensäuren umgewandelt werden. Diesen Prozeß des Transportes von Cholesterin aus peripheren Geweben zur Leber bezeichnet man als reversen Cholesterintransport [94]. High Density Lipoproteine (HDL) spielen eine zentrale Rolle in diesem reversen Cholesterin-Transport. Zahlreiche epidemiologische Studien der letzten Jahre wie z. B. die Framingham-Studie [134], die Tromsø-Studie [230], die PROCAM-Studie [17, 19] und der Multiple Risk Factor Intervention Trial [136, 334] zeigten, daß eine von anderen Risikofaktoren unabhängige, inverse Korrelation zwischen der HDL-Cholesterinkonzentration und der Inzidenz der koronaren Herzkrankheit (KHK) besteht. Eine Verringerung der Konzentration der HDL sowie des Apolipoproteins A-I als deren wesentlichem Proteinbestandteil gilt als einer der wichtigsten Risikofaktoren für Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems [123, 135, 254, 268]. Untersuchungen an Tiermodellen zeigten, daß durch eine Erhöhung des HDL-Spiegels im Plasma die Zahl arteriosklerotischer Plaques stark

verringert werden kann [308]. Aus klinischen Studien mit Lipidsenkern ging hervor, daß auch eine medikamentöse Erhöhung des HDL-Spiegels in Kombination mit anderen Veränderungen des Lipidstoffwechsels mit einer Reduktion sowohl der Inzidenz als auch der Progression der KHK assoziiert ist [24, 58, 124, 135, 136, 216, 232]. Jedoch ist bis heute nicht eindeutig geklärt, ob die offenkundige Schutzfunktion hoher HDL-Cholesterinwerte allein durch das Modell des reversen Cholesterin-Transportes erklärt wird, welches den Cholesterin-Transport von extrahepatischen Zellen zur Leber beschreibt [102, 169, 231, 308]. Der erste Schritt des reversen Cholesterin-Transportes ist der Efflux zellulären Cholesterins und die Aufnahme dieses Cholesterins durch HDL. Es existieren zwei Hypothesen für die Mechanismen der Aufnahme zellulären Cholesterins durch HDL. Das erste Konzept basiert auf der Tatsache, daß Cholesterin zwischen Lipoproteinen und zellulären Membranen aufgrund eines physikochemischen Gradienten austauschbar ist. Dies geschieht vermutlich durch Diffusion in die umgebende wäßrige Phase [169, 259]. Der Cholesterin-Nettoefflux entsteht somit durch ein Konzentrationsgefälle für Cholesterin zwischen der Plasmamembran und der extrazellulären Lipoproteinoberfläche [83, 170, 171]. Er wird durch die Aktivität der Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), die freies Cholesterin auf der äußeren Hülle der HDL verestert, verstärkt und aufrechterhalten [81, 113, 162, 182], da die veresterten Cholesterinmoleküle im Inneren des HDL-Moleküls gespeichert werden. Andere strukturelle Faktoren wie die Lipid- und Proteinzusammensetzung der Membran und die Form des Akzeptormoleküls könnten bei dem Cholesterinefflux durch dieses Modell ebenfalls noch eine Rolle spielen [86, 87, 88, 130, 132, 180, 192, 276]. Die spezifische Rolle der HDL beschränkt sich in diesem Modell somit auf ihre Affinität zur LCAT.

Die physiologische Relevanz dieses Modells wird jedoch dadurch relativiert, daß HDL an spezifische Bindungsstellen der Zelloberfläche binden, und daß diese Interaktion zwischen den HDL und der Zelle eine spezifische Rolle beim Cholesterinefflux spielen könnte [55, 98, 223, 251].

Auch wenn bisher nur indirekte Anzeichen für eine Beteiligung der HDL-Bindungsproteine an dem spezifischen, durch HDL induzierten Cholesterinefflux gefunden wurden, wird in dem zweiten Modell davon ausgegangen, daß neben dem unspezifischen, nur durch den Konzentrationsgradienten bedingten Cholesterinefflux durch HDL in der Zelle eine Signalkaskade ausgelöst wird. Diese führt letztendlich zu einem aktiven Transport von Cholesterin zur Plasmamembran. Gestützt wird diese Hypothese durch *in vitro* Untersuchungen an Zellkulturen, die verschiedene HDL-übermittelte Signalkaskaden zeigen konnten.

3.2. Definition, Struktur und Metabolismus der HDL

Die HDL sind Lipoproteine mit einer Dichte von 1.063-1.21 kg/l. Sie sind etwa 70-100 nm groß und bestehen durchschnittlich aus ca. 50% Protein, 30% Phospholipiden, 10-20% Cholesterin und Cholesterinestern sowie 5% Triglyzeriden [8, 102]. Generell sind HDL inhomogene Lipoproteine mit unterschiedlicher Lipid- und Proteinzusammensetzung und verschiedenen physikochemischen und funktionellen Eigenschaften.

Durch Ultrazentrifugation lassen sich die HDL in zwei Dichteklassen HDL₂ (d=1.063-1.125 kg/l) und HDL₃ (d=1.125-1.21 kg/l) differenzieren [151, 258]. HDL₂ enthält sowohl die Apolipoproteine Apo-A-I und Apo-A-II, sowie in geringerem Ausmaß andere Apolipoproteine wie Apo-C-II, Apo-C-III, Apo-E und Apo-D [8, 102]. HDL₃ enthält überwiegend die Apolipoproteine A-I und A-II als Strukturproteine und nur geringe Anteile von Apo-C-I. Insgesamt wurde für mehr als 20 Proteine eine Assoziation mit einer oder mehreren HDL-Subklassen gezeigt. HDL₂ ist cholesterin- und triglyzeridreicher als HDL₃.

Die mit HDL assoziierten Apolipoproteine A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III und E weisen untereinander eine ähnliche molekulare Struktur auf [48, 199]. Hauptteile ihrer Primärstruktur sind aus repetitiven Blöcken eines 11-Aminosäuren-Sequenzmotivs zusammengesetzt. Die aus zwei 11'er-Einheiten entstehenden 22'er-Einheiten formen eine amphipathische α -Helix, bei der die hydrophobe Seite mit den hydrophoben Seitenketten der Phospholipide und Cholesterin in Wechselwirkung tritt, während die hydrophile Helixhälfte zur wässrigen Phase gerichtet ist und somit die Dispersion des Lipoproteinpartikels ermöglicht [296]. Das Hauptstrukturprotein der HDL ist das 243 Aminosäuren lange Apolipoprotein A-I. Aufgabe von Apo A-I ist unter anderem die Solubilisierung des HDL-Partikels und die Aktivierung des cholesterin-veresternden Enzyms LCAT. Dieses katalysiert den Transfer sn-2-ständiger Fettsäuren des Phosphatidylcholins auf die 3 β -Hydroxylgruppe des Cholesterins, wobei Lysolecithin und Cholesterinester entstehen [172]. Außerdem ist Apolipoprotein A-I Ligand für spezifische HDL-Rezeptor-Interaktionen und stabilisiert Prostacycline. Wenig untersuchte HDL-Proteine sind das β 2-Glykoprotein I (Apo H), ein Inhibitor der Kontaktaktivierung bei der Gerinnung, Clusterin (Apo J), ein Inhibitor der Komplement-vermittelten Zytolyse und Serum-Amyloid A, ein Akut-Phase Protein.

Außer Apolipoproteinen zählen Enzyme zu den Proteinbestandteilen der HDL. Neben der LCAT ist dies vor allem das Cholesterinestertransferprotein CETP, das den Transfer der durch LCAT synthetisierten Cholesterinester von HDL zu den triglyzeridreichen Lipoproteinen im Austausch gegen Triglyzeride und Phospholipide katalysiert [310]. Der

durch das Zusammenwirken von LCAT und CETP vermittelte Cholesteringradient zwischen Zellmembran und Plasma begünstigt die Aufnahme von zellulärem Cholesterin.

Unter den Lipiden der HDL kommt den Phospholipiden, vorwiegend Phosphatidylcholin, eine besondere Rolle zu. Die von ihnen gebildeten Bilayer, in denen die hydrophoben Fettsäuren nach innen und hydrophilen Phosphatidgruppen nach außen weisen, ermöglichen zusammen mit den Apolipoproteinen die Solubilisierung und den Transport von Cholesterin und Triglyzeriden. Sie bilden zudem die optimale Umgebung für die Funktion der HDL-assozierten Enzyme [167].

Lipidreiche HDL entstehen aus lipidarmen Partikeln oder sogar aus lipidfreien Apolipoproteinen [31, 102, 109, 248, 324]. Diese lipidarmen HDL-Vorläufer werden entweder als naszierende HDL in Hepatozyten [65, 119, 145, 219, 220, 314] sowie in der Mukosa des Dickdarms [84, 118, 141] produziert, oder entstehen durch Dissoziation während der Lipolyse von Chylomicronen und VLDL [239, 286, 312] oder durch die Umwandlung von HDL durch die Aktivitäten von CETP [73, 122, 154, 202, 203], Phospholipidtransferprotein (PLTP) [168, 323] und hepatischer Lipase [32]. Naszierende HDL aus dem Intestinum enthalten Apo-A-I und Apo-A-IV, naszierende HDL aus Hepatozyten enthalten Apo-A-I, Apo-A-II und / oder Apo E. Es ist bisher noch unbekannt, ob naszierende HDL bereits im Endoplasmatischen Retikulum (ER) entstehen, oder ob sie extrazellulär durch die Assoziation freier Apolipoproteine mit Phospholipiden und Cholesterin aus der Zellmembran gebildet werden. In Übereinstimmung mit dem letzteren Modell fördern lipidfreie Apolipoproteine A-I, A-IV und E den Efflux von Phospholipiden und Cholesterin aus der Zellmembran von Makrophagen, Hepatozyten und Fibroblasten und bilden so HDL-ähnliche Partikel [12, 20, 31, 38, 109, 120, 150, 162, 248, 269, 340].

Lipidarme HDL (prä- β -HDL) und lipidfreie Apo-A-I werden zu reifen, lipidreichen und sphärischen HDL durch die Aufnahme von Phospholipiden und unverestertem Cholesterin, die Veresterung des Cholesterins durch LCAT und die Aufnahme weiterer Apolipoproteine [74, 162, 164, 190, 204, 229, 241]. Bei diesem Prozeß dienen vermutlich die Plasmamembranen peripherer Körperzellen als Lipidspender und Apo B-haltige Lipoproteine im Plasma als Spender von Apolipoproteinen und Lipiden. Es gibt Hinweise, daß dieser Prozeß eher durch ein Lipidtransferprotein vermittelt wird, als durch unspezifische Assoziation [162, 163, 320, 322]. Das initiale Produkt sind kleine HDL₃, die durch die Veresterung von Cholesterin mittels LCAT in HDL₂ [70, 93, 102] und durch Fusion mit HDL₃ [166, 210, 318] in HDL₂ umgewandelt werden.

Cholesterinester der HDL werden durch mindestens zwei direkte und einen indirekten Weg aus dem Kreislauf entfernt: (I) Hepatozyten und steroidhormon-produzierende Zellen

exprimieren den Scavenger-Rezeptor B₁ (SR-B₁), der HDL bindet und die selektive Aufnahme der Cholesterinester vermittelt, ohne daß die Proteine der HDL internalisiert werden [2, 188, 271]. (II) Eine Subpopulation der HDL enthält Apo E und wird durch hepatische Apo E-Rezeptoren aufgenommen [125, 137, 186, 214]. (III) CETP tauscht Cholesterinester der HDL gegen Triglyceride aus VLDL, IDL und LDL und vermittelt so die Elimination der HDL-Cholesterinester aus dem Kreislauf durch den LDL-Rezeptorweg [309, 311].

Als Konsequenz werden aus diesem Prozeß kleinere HDL₃, prä-β-HDL und lipidfreie Apo-A-I gebildet [73, 122, 154, 202, 203]. HDL₃ und prä-β-HDL werden ebenfalls noch durch die Hydrolyse von Triglyceriden und Phospholipiden von HDL₂ durch die hepatische Lipase, die anscheinend als ein Co-Rezeptor in HDL-Bindungsstellen bei Hepatozyten fungiert, gebildet [32, 126].

Die Umsetzung von HDL₃ in HDL₂ durch PLTP, sowie die Entfernung von Lipiden aus HDL₂ durch SR-B₁, CETP und hepatischer Lipase setzt lipidarme und lipidfreie Apo-A-I-Partikel frei [32, 73, 122, 154, 168, 202, 203, 323]. Diese kleinen Partikel können den Kreislauf in den extravaskulären Raum verlassen [31, 109, 248]. Dort können sie als Akzeptoren zellulärer Lipide dienen, und somit die Bildung der HDL neu induzieren. In der Niere werden diese kleinen Partikel ausgefiltert und können so den Organismus verlassen [158].

Abbildung 3.1 zeigt schematisch vereinfacht den HDL-Metabolismus:

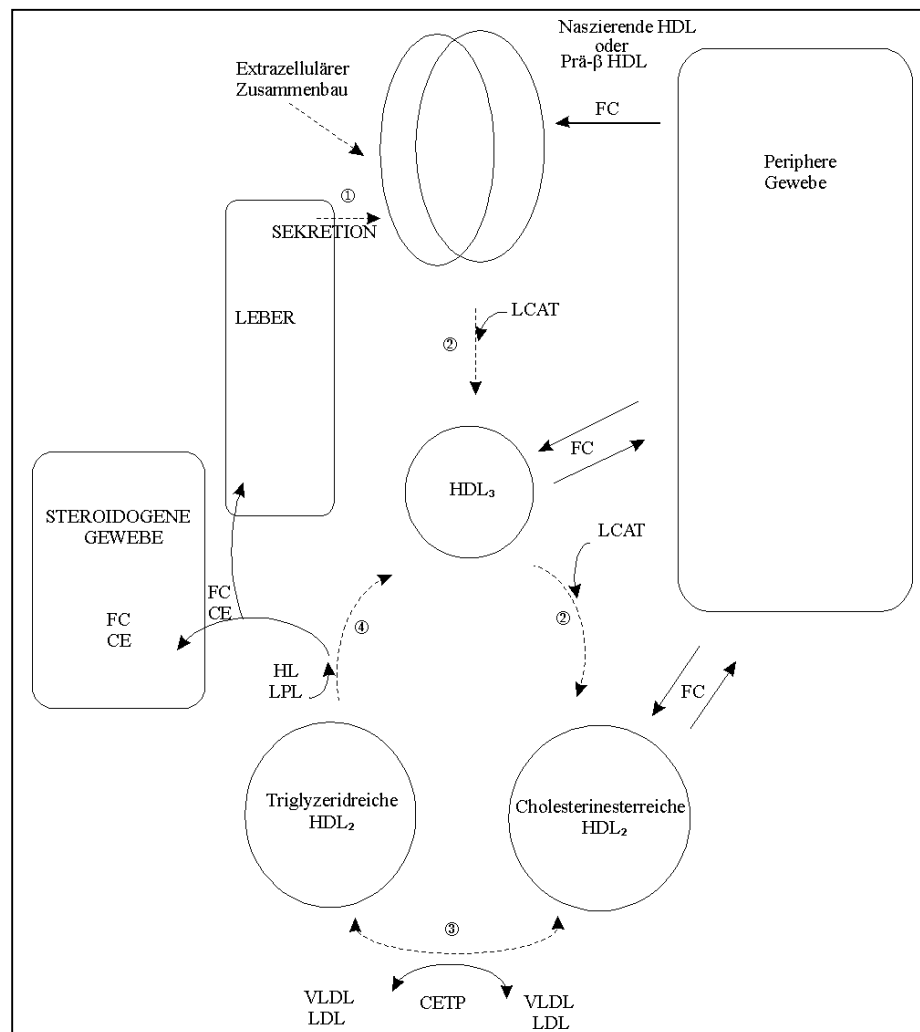


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des HDL-Metabolismus, verändert nach Pieters et al. [261]. FC: Freies Cholesterin; LCAT: Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase; CE: Cholesterinester; HL: Hepatische Lipase; LPL: Lipoprotein Lipase; VLDL: Lipoproteine sehr geringer Dichte; LDL: Lipoproteine geringer Dichte; CETP: Cholesterinester Transferprotein.

3.3. Einfluß von HDL auf die zelluläre Cholesterinhomöostase

Die Regulation der zellulären Cholesterinhomöostase erfolgt zum einen durch die Neusynthese von Cholesterin, zum anderen durch die Aufnahme und den Abtransport von Cholesterin durch Lipoproteine. Nur in wenigen Zelltypen kann Cholesterin durch die Umsetzung in Steroidhormone, Gallensäuren oder Vitamin D abgebaut werden. Exogenes Cholesterin wird als Komponente verschiedener Lipoproteine über spezifische Oberflächenrezeptoren zellulär aufgenommen. Die Cholesterinversorgung extrahepatischer Zellen geschieht überwiegend durch Neusynthese und zu 10-15 % durch die Aufnahme von LDL nach deren Bindung an LDL-Rezeptoren. Makrophagen besitzen darüber hinaus

Scavenger-Rezeptoren, durch die sie chemisch modifizierte LDL und Abbauprodukte der triglyzeridreichen Lipoproteine aufnehmen können. Unabhängig von der Art der Aufnahme gelangen die meisten Lipoproteine intrazellulär in Lysosomen, in denen sie abgebaut werden. Die dabei frei werdenden Cholesterinester werden entweder lysosomal gespeichert, oder durch die saure Lipase hydrolysiert und in die lysosomale Membran inkorporiert. Dieses lysosomale Cholesterin wird teils zur Plasmamembran transferiert [54], teils erneut am ER mittels AcetylCoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) verestert und als zytoplasmatische Cholesterinester-Tröpfchen gespeichert [305]. Der Transport lysosomalen Cholesterins zur Plasmamembran ist in Fibroblasten von Patienten mit der Niemann-Pick Typ C Krankheit gestört [64, 78, 209].

Da in eukaryotischen Zellen mehr als 85% des freien Cholesterins in der Plasmamembran lokalisiert ist [295], hat der Transport von Cholesterin zwischen dem *trans*-Golgi-Apparat und der Plasmamembran einen besonderen Stellenwert für die Cholesterinhomöostase der Zelle. Er wird durch amphiphile Substanzen inhibiert [112, 194]. Das Cholesterin kann hierbei nicht-vesikulär in Proteolipid-Partikeln zur Zellmembran transportiert werden. Diese enthalten neben Cholesterin auch Sphingolipide, Glykosyl-Phosphatidylinositol-verankerte Membranproteine und Caveolin [112, 238, 299, 300]. Die Mechanismen und Faktoren, die den zielgerichteten Transport ermöglichen, sind - im Gegensatz zum vesikulären Transport – jedoch nicht genau bekannt.

Der Transport neu synthetisierten Cholesterins vom ER zur Plasmamembran ähnelt dem beschriebenen Proteolipid-Partikel-vermittelten Transport. Er wurde *in vitro* durch amphiphile Substanzen wie Progesteron und Imipramin inhibiert [112].

Die auf Zellen einwirkenden Lipoproteinkonzentrationen schwanken je nach Zelltyp zwischen 100 % (Plasmakonzentration) bei Endothelzellen und 5-10 % (Konzentration in der Lymphflüssigkeit) [267]. Auch der Bedarf an Cholesterin ist je nach Zelltyp und Wachstumsphase verschieden. Daher ist ein fein reguliertes Gleichgewicht zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Cholesterin notwendig. Die Neusynthese von Cholesterin und die LDL-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Cholesterin unterliegen dabei einem negativen Rückkopplungsmechanismus. Ein Anstieg der intrazellulären Cholesterinkonzentration reguliert die Expression des Schlüsselenzyms der Cholesterinsynthese, der HMG-CoA-Reduktase, und die des LDL-Rezeptors herunter und verhindert so eine unbegrenzte Akkumulation von Cholesterin [60, 133, 169]. Weiterhin werden die Gene für CETP und PLTP durch den Cholesteringehalt in der Zelle reguliert. Diese Moleküle besitzen spezifische Lipidbindungsstellen und wirken dadurch als Trägerproteine, die den Lipidaustausch

zwischen Lipoproteinen vermitteln [62]. CETP spielt eine große Rolle im Katabolismus der HDL und beeinflusst durch den oben bereits beschriebenen Austausch von Cholesterinestern zwischen verschiedenen Lipoproteinklassen die Konzentration, den Apolipoproteingehalt und die Größe der HDL-Partikel im Plasma [62]. Reguliert werden diese Gene u. a. durch SREBP-1 und SREBP-2 (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins), Transkriptionsfaktoren, die durch SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein), ein Membranprotein mit einer sterolsensitiven Domäne, aktiviert werden [62, 159, 187, 253, 282, 341].

Im Gegensatz hierzu erfolgt die exogene Cholesterinaufnahme durch Scavenger-Rezeptoren wie z.B. LOX-1 (Lectin-like Oxidized low-density lipoprotein receptor) unkontrolliert [95, 339]. Infolgedessen können Zellen, die über diese Mechanismen der Cholesterinaufnahme verfügen (z.B. Makrophagen und Fibroblasten), Cholesterin intrazellulär akkumulieren und dann in Schaumzellen umgewandelt werden, die maßgeblich zur Arterioskleroseentwicklung beitragen [60, 133, 169].

Doch auch diese Zellen können sich durch aktiven Transport von Cholesterin in den Extrazellularraum vor einer Überladung mit Cholesterin schützen. An diesem Prozeß sind HDL wesentlich beteiligt, da sie den Cholesterinefflux durch verschiedene Mechanismen stimulieren können. Die mögliche Bedeutung der Cholesterinefflux-Mechanismen für die zelluläre Cholesterinhomeostase konnte an konfluenten ruhenden Fibroblasten *in vitro* demonstriert werden. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Aufnahme von LDL-Cholesterin fast ausschließlich Rezeptor-unabhängig durch einen selektiven Cholesterintransfer [111].

Wie bereits oben angeführt, können zwei Hauptmechanismen des HDL-induzierten Cholesterineffluxes unterschieden werden: a) der diffusionsähnliche Transport von Zellmembran-gebundenem Cholesterin durch die die Zellmembran umgebene wäßrige Phase [169, 277], sowie b) die durch spezifische Apolipoprotein-Zellinteraktion vermittelte Mobilisierung intrazellulären Cholesterins [150, 185, 198, 225, 249, 252, 293]. Der diffusionsähnliche Transport von Cholesterin erfolgt in beiden Richtungen, so daß ein Netto-Cholesterinefflux nur dann stattfindet, wenn ein Cholesteringradient zwischen Zellmembran und Cholesterin-Akzeptor (z.B. HDL) besteht [169, 170, 277]. Ausmaß und Richtung des Gradienten ist abhängig von der Cholesterinkonzentration in HDL und Zellmembran, aber auch von anderen Eigenschaften der HDL und Zellmembran wie Phospholipidzusammensetzung, Apolipoproteinzusammensetzung, Fluidität der Membranen und Radius der HDL [90, 169, 170, 171, 212, 213]. Wenn der Cholesterinakzeptor eine hohe Cholesterin-Absorptionsfähigkeit aufweist, ist die Cholesterin-Desorption von der Plasmamembran der limitierende Faktor dieses Mechanismus [169]. Die Cholesterin-Absorptionsfähigkeit der

HDL ist jedoch begrenzt. Sie wird durch die Cholesterinveresterung mittels LCAT erhöht, da die Cholesterinester im Kern der Lipoproteine akkumulieren und dadurch weiteres freies Cholesterin der Zellmembran in die Phospholipide der HDL-Oberfläche integriert werden kann [81]. Bei vielen bislang untersuchten Zelltypen verläuft *in vitro* die Desorption von Cholesterin aus der Plasmamembran über mehrere Stunden, bis eine Sättigung erreicht ist. Diese Form des Cholesterineffluxes kann auch von anderen Akzeptoren des Plasmakompartimentes, wie z.B. Albumin, induziert werden. Daher wird diese Effluxform oft auch als „unspezifisch“ bezeichnet.

Die zweite Form des Cholesterineffluxes wird durch spezifische, möglicherweise Rezeptorvermittelte Bindung an die Zelloberfläche vermittelt. Auch hier wird wieder das oben angeführte Modell zur Hilfe genommen, daß Apolipoproteine den Efflux von Cholesterin und Phospholipiden stimulieren können [12, 20, 31, 38, 109, 120, 150, 162, 185, 198, 225, 248, 249, 251, 269, 340]. Dabei induzieren Lipid-freie Apo A-I und Lipid-arme HDL-Vorläufer, s.g. prä- β -HDL, einen Cholesterinefflux durch spezifische Interaktion zwischen dem Akzeptor und der Zellmembran [31, 342]. Im Gegensatz zu nicht spezifischen Akzeptoren (Liposomen, Phospholipid-Emulsionen und Triglyzeriden), die ausschließlich eine Cholesterin-Mobilisierung aus der Plasmamembran induzieren, bewirken Apo A-I und prä- β -HDL nicht nur die Solubilisierung des Membrancholesterins, sondern auch die Mobilisierung des Cholesterins aus intrazellulären Pools, die im Gleichgewicht mit dem Cholesterinesterpool stehen und für das Enzym AcylCoA:Cholesterin Acyltransferase (ACAT) zugänglich sind, einem Enzym, das sich im endoplasmatischen Retikulum (ER) befindet [121, 224, 225, 249, 251, 252]. Da die Kapazität der spezifischen Akzeptoren, Cholesterin zu binden, nur gering ist, fungieren Apo A-I und prä- β -HDL vermutlich als „Shuttle“ zwischen der Zellmembran und größeren Partikeln wie HDL₃ [81, 120, 121, 148, 150, 185, 198, 225, 249, 251, 340].

In zahlreichen Experimenten wurde die Existenz spezifischen Cholesterineffluxes dokumentiert [248, 342]. Die kovalente Modifizierung der in HDL vorhandenen Proteine führt zu verminderter spezifischer Bindung von HDL an die Zelloberfläche und zu einer gestörten Mobilisierung intrazellulären Cholesterins, die Desorption des Membrancholesterins bleibt jedoch unverändert. Kein Apo A-I-vermittelter Efflux wurde in Zellen beobachtet, die nicht über spezifische HDL-Bindungsstellen verfügen, wie z.B. Erythrozyten. Auch eine proteolytische Behandlung von Fibroblasten, die die spezifische Bindung von Apo A-I und HDL aufhebt, hat eine Verringerung des Apo A-I-induzierten Effluxes, aber nicht des durch Gesamt-HDL induzierten Effluxes zur Folge. Probucol, ein lipidsenkendes Medikament, inhibiert den Apoprotein-induzierten Cholesterinefflux, aber nicht die Mobilisierung Cholesterins direkt aus der Zellmembran. Ähnliche Effekte wurden in Zellen beobachtet, die

mit Inhibitoren des intrazellulären Transportes (Monensin, Brefeldin) oder mit Toxinen des Energiestoffwechsels behandelt wurden. Diese Experimente zeigen, daß freie Apoproteine die Mobilisierung von Cholesterin aus dem ER in einem energieverbrauchenden Prozeß induzieren können. Auch Substanzen, die die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflussen, sind in der Lage, den durch die Apoproteine induzierten Efflux zu modulieren. Analoga des zyklischen AMP induzieren Apo A-I Bindung an die Zelloberfläche und verstärken deutlich die Cholesterin-Mobilisierung aus intrazellulären Pools. Auch Inhibitoren der Protein Kinase C (PKC) hemmen die Mobilisierung von Cholesterin aus intrazellulären Pools, während die Stimulation von PKC einen gegenteiligen Effekt hat [224, 240, 313].

3.4. HDL-Bindungsproteine

Die Suche nach physiologisch bedeutsamen HDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche wurde durch unspezifische Bindungsstellen erschwert, die HDL nur mit geringerer Affinität binden [108]. In letzter Zeit wurden jedoch mehrere Kandidaten für einen physiologisch wirksamen HDL-Rezeptor isoliert und teilweise bereits kloniert. Diese Bindungsproteine wurden in Nieren, Fibroblasten, Endothelzellen, Adipozyten, Hepatozyten und steroidogenem Gewebe gefunden [27, 107, 115, 140, 317]. Teilweise wurden auch zwei Proteine in einem Zelltyp gefunden [52, 317], was darauf hindeutet, daß es mehr als eine Klasse HDL-Rezeptoren gibt. Die wichtigsten sind SR-B₁ (Scavenger-Rezeptor B₁, M_r = 82 kDa, homolog zu CD36) [2], HBP (High density lipoprotein Binding Protein, M_r = 110 kDa, identisch mit Vigilin) [72, 221], und ein Protein-Dimer HB₁ und HB₂ (HDL-Bindungsproteine, M_r = 120 und 100 kDa. Nur HB₂ wurde bisher kloniert und ist homolog zu ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) und BEN (bursal epithelium and neurons), zwei Adhäsionsmolekülen [217].

SR-B₁ wurde zunächst als LDL-Scavenger-Rezeptor beschrieben [2], der acetylierte LDL binden kann, zeigt aber wie alle Scavenger-Rezeptoren eine breite Bindungsspezifität. Später wurde gefunden, daß SR-B₁ in LDL-Rezeptor-negativen CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) auch HDL mit hoher Affinität bindet [103, 108] und die selektive Aufnahme von Cholesterinestern in die Zelle vermittelt. SR-B₁ ist kolokalisiert mit Plasmamembran-caveolae und wird zusammen mit Caveolin aufgereinigt [23]. Diese Membrandomänen könnten bei dem SR-B₁-vermittelten Lipidtransfer zwischen Zellen und Lipoproteinen eine wichtige Rolle spielen.

SR-B₁ kommt bei Ratten und Mäusen vor allem in der Leber, in Ovarien, adrenalen Drüsen, in geringerer Menge in Hoden und Brustdrüsen sowie in Spuren im Herzen vor [2, 193, 233, 270]. Damit stimmt das Expressionsmuster mit dem Ausmaß der Beteiligung der Gewebe an der Steroidhormonsynthese überein.

HBP wurde von Graham und Oram beschrieben [140] und von McKnight et al. kloniert [221]. Die hypothetische Struktur von HBP zeigt weder klassische Transmembransequenzen, noch klar definierte zytoplasmatische oder extrazelluläre Domänen, wie sie andere Rezeptoren aufweisen. Es wird vermutet, daß HBP auf der Zelloberfläche lokalisiert ist und so HDL binden kann [108].

HB₁ und HB₂ wurden in der Rattenleber nachgewiesen. Nur HB₂ wurde bislang kloniert [72] und hat keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit den oben beschriebenen Rezeptoren. Es gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie und hat Ähnlichkeiten mit den Adhäsionsmolekülen ALCAM (96 % Homologie) und BEN (70 % Homologie). Eine Transfektion verschiedener Zelltypen mit HB₂ führte zu einer 80 bis 100 %igen Steigerung der HDL-Bindung, die auf HB₂ zurückzuführen war [108]. Außerdem wird die Expression des HB₂-Gens durch eine Cholesterinbeladung der Zellen mit acetyliertem LDL herunterreguliert [217].

3.5. Mögliche andere Funktionen der HDL

Die inverse Beziehung zwischen der Höhe des HDL-Cholesterinwertes im Plasma und der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen ist in zahlreichen epidemiologischen Studien bestätigt worden [18, 135]. Die mögliche Erklärung für diesen statistischen Zusammenhang, die Fähigkeit der HDL, Cholesterin aus der Arterienwand in die Leber zu transportieren, ist aus den oben beschriebenen Gründen umstritten. Es müssen daher auch andere potentiell antiatherogene Wirkungen der HDL beachtet werden. So deuten verschiedene Befunde auf eine Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch HDL hin [Überblick in: 76]. Eine vermehrte Thrombozytenaktivität wurde bei Personen mit niedrigen HDL-Konzentrationen nachgewiesen [39]. *In vitro* Studien zeigten einen inhibitorischen Effekt der HDL auf die durch starke Agonisten wie Thrombin und Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation [21, 22, 156, 244]. HDL sind zudem in der Lage, die Bildung und Freisetzung von Thromboxan A₂ in Thrombozyten zu inhibieren [34, 35]. Außerdem wurde jetzt gezeigt, daß HDL, durch eine Aktivierung von Protein C und Protein S, den Koagulationsfaktor Va inaktivieren [142].

Weiterhin wurde nachgewiesen, daß HDL die Synthese von Prostacyclin in arteriellen Endothelzellen stimulieren [116, 246]. Prostacyclin wirkt durch seine vasodilatierende und die Thrombozytenaggregation hemmenden Eigenschaften potentiell antiatherogen. HDL verstärken außerdem *in vitro* die durch Urokinase induzierte Fibrinolyse [283]. Darüber hinaus inhibieren HDL atherogene Mechanismen oxidiertes LDL [257]. Die Oxidation der LDL spielt eine entscheidende Rolle für die Atherogenität dieser Lipoproteinklasse [306]. Auch die Aggregatbildung von LDL begünstigt die Aufnahme in Makrophagen und somit die Schaumzellbildung. HDL und Apolipoprotein A-I inhibieren die Bildung von LDL-Aggregaten und reduzieren dadurch den Cholesterininflux in die Intima [179].

Weiterhin stimulieren HDL das Wachstum von Endothelzellen und verhindern deren Zelltod [76], verhindern in Endothelzellen die Expression von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selectin, Proteine, die den ersten Schritt der Arteriosklerose, die Bindung von Leukozyten an die Endothelwand, ermöglichen [75]. Eine weitere Schutzfunktion der HDL bei beginnender Arteriosklerose liegt in der Inhibition der Bildung des C5b-C9 Komplexes [144], wodurch prokoagulierende Reaktionen in Endothelzellen und Blutplättchen inhibiert werden.

3.6. HDL und Signaltransduktion

Die bislang publizierten Daten zur HDL-induzierten Signaltransduktion deuten darauf hin, daß HDL über einen oder mehrere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wirken. An unterschiedlichen Zelltypen konnte ein HDL-vermittelter Anstieg von zyclischem AMP (cAMP), Inositoltriphosphat (IP₃), Ca²⁺ und Diacylglycerin (DAG) beobachtet werden.

DAG und IP₃ werden durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) gebildet. Diese Hydrolyse wird durch die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) katalysiert, die ein wichtiges Targetprotein von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist. DAG aktiviert bestimmte Isoformen der Proteinkinase C (PKC), die ihrerseits eine Vielzahl intrazellulärer Proteine phosphoryliert und somit aktiviert. IP₃ bewirkt die Freisetzung des u. a. für diese Prozesse erforderlichen intrazellulären Calciums. DAG kann auch durch Hydrolyse von Phosphatidylcholin (PC) gebildet werden, und zwar entweder direkt, durch eine PC-spezifische Phospholipase C (PC-PLC), oder indirekt über Phosphatidsäure (PA), die zunächst durch eine PC-spezifische Phospholipase D (PC-PLD) gebildet und anschließend durch eine PA-Phosphatase (PPH) in DAG umgewandelt werden kann. PA ist selbst vermutlich auch ein wichtiger Second Messenger [41].

Ebenfalls ein wichtiger intrazellulärer Second messenger ist zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Es entsteht durch das Adenylatcyclase-System, welches ebenfalls durch Bindung eines Agonisten an einen Rezeptor aktiviert wird. Bei diesem System sind sowohl aktivierende als auch inhibierende Agonisten bekannt, die jeweils über die Bindung an einen Rezeptor G-Proteine aktivieren, die dann aktivierend bzw. inhibierend auf die Adenylatcyclase wirken. Die membrangebundene Adenylatcyclase spaltet dann intracelluläres ATP in cAMP und Pyrophosphat. Dieses cAMP führt zu einer Aktivierung von cAMP-abhängigen gewebespezifischen Proteinkinasen [77], die ihrerseits andere Proteine phosphorylieren und damit aktivieren oder inaktivieren.

Eine Bindung der HDL an einen Rezeptor der Zelle ist nach den bislang veröffentlichten Daten zur HDL-induzierten Signaltransduktion wahrscheinlich. Bochkov et al. zeigten nach HDL-Inkubation einen Anstieg der PI-Hydrolyse in glatten Muskelzellen [46], Drobnik et al. in Fibroblasten [96], während in Thrombozyten und Adipozyten die Hydrolyse von PC gezeigt werden konnte [240, 313].

Eine Aktivierung von Proteinkinasen durch HDL wurde zunächst in Endothelzellen nachgewiesen [4]. In späteren Untersuchungen an Adipozyten, Fibroblasten und Thrombozyten wurde beobachtet, daß insbesondere die Bindung der Apo-A-I-reichen HDL-Subfraktion HDL₃ oder Apo-A-I-haltiger *in vitro* hergestellter Proteoliposomen die PKC aktiviert [224, 240, 313]. An humanen Fibroblasten konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung der PKC mit einer vermehrten Translokation intrazellulären Cholesterins zur Zellmembran einher geht [224]. Auch die Inkubation mit PKC-Aktivatoren erzeugte eine Translokation intrazellulären Cholesterins. Durch Inkubation mit PKC-Inhibitoren wurde der HDL₃-vermittelte Cholesterin-Transport inhibiert. Der Efflux des membranösen Cholesterins auf die HDL₃ wurde hingegen weder durch PKC-Aktivatoren, noch durch PKC-Inhibitoren beeinflusst [224, 240, 313]. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß HDL₃ via PKC-Aktivierung Cholesterin aus intrazellulären Kompartimenten mobilisieren kann, für den Übergang von membranständigem Cholesterin auf die HDL jedoch andere Mechanismen verantwortlich sind. Apo A-I als Hauptstrukturprotein der HDL scheint entscheidend an diesen Prozessen beteiligt zu sein. So konnte in Adipozyten gezeigt werden, daß Apo-A-I-haltige Proteoliposomen sowohl eine PC-Hydrolyse mit DAG-Freisetzung, eine PKC-Aktivierung, wie auch einen Cholesterinefflux induzieren können. Hingegen induzierten Apo-A-II-haltige Proteoliposomen diese Effekte in diesem Zelltyp nicht [313].

HDL und Apo-A-I aktivieren nicht nur PKC, sondern Apo-A-I ist zumindest *in vitro* selbst auch Substrat für die PKC und wird durch sie phosphoryliert [157]. Dabei kann jedoch nur freies Apo A-I phosphoryliert werden, nicht aber Apo A-I in HDL-Partikeln oder

Proteoliposomen. In humanen Hautfibroblasten wurde nach Zugabe von 45 $\mu\text{g/ml}$ HDL ein deutlicher Calciumanstieg nach 100 Sekunden beobachtet, der bei wiederholter HDL-Zugabe abgeschwächt wurde. Da auch in extrazellulärer Gegenwart von Calcium-Komplexbildnern ein intrazellulärer Calciumanstieg initiiert wurde, deutet dies auf eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern hin [264].

3.6.1. Phosphatasen

Reversible Proteinphosphorylierung ist eine wichtige Komponente von Signaltransduktionsmechanismen, mit denen die zelluläre Homöostase durch extrazelluläre Signale reguliert wird. Extrazelluläre Effektoren wirken durch die Aktivierung von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen, deren Aktivität die gegenteiligen Wirkungen von Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung katalysieren.

Es wurde gezeigt, daß die HDL-induzierte Mobilisierung von zellulärem Cholesterin von Proteinphosphorylierungen [85] und einer Aktivierung der Proteinkinase C [224, 313] begleitet wird.

Dies legt die Beteiligung einer antagonistisch wirkenden Proteinphosphatase nahe. Proteinphosphatasen werden in drei Familien gegliedert. Zwei dieser Familien, die PPP- und PPM-Familie dephosphorylieren Phosphothreonin- und Phosphoserinreste. Die Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen PP1, PP2A und PP2B der PPP-Familie, sowie die PP2C der PPM-Familie sind für den Großteil aller Protein-Serin/Threonin-Phosphataseaktivität *in vivo* verantwortlich. PP1, PP2A und PP2B haben ein gemeinsames katalytisches Zentrum von 280 Aminosäureresten. Diese Enzyme unterscheiden sich durch ihre nichtkatalytischen N- und C-terminalen Enden und die assoziierten regulativen Untereinheiten und bilden so eine Vielzahl unterschiedlich aktiver Holoenzyme [29].

Phosphatasen des Typs PP1, die sich durch ihre regulativen Untereinheiten unterscheiden, wurden bei der Kontrolle vieler zellulärer Funktionen nachgewiesen. Darunter fallen unter anderem der Glykogenstoffwechsel, die Muskelkontraktion, die Zellzyklus-Kontrolle, neuronale Aktivitäten und das Splicen von RNA [29]. PP2A-Phosphatasen wurden im anabolen und katabolen Stoffwechsel, im Zellzyklus und bei der Kontrolle der Telomeraseaktivität nachgewiesen [29].

Phosphatasen dieser beiden Typen arbeiten unabhängig von Ca^{2+} -Ionen, wohingegen Phosphatasen des Typs PP2B durch ihre Abhängigkeit von Ca^{2+} -Ionen charakterisiert sind.

Sie spielen eine wichtige Rolle als Calmodulin-Bindungsprotein bei aktivierten T-Zellen und im Gehirn.

Die Aktivität der Phosphatasen der PPM-Familie, deren wichtigste Vertreter die Phosphatasen des Typs PP2C sind, ist Mg^{2+} -abhängig. Die PP2C-Domäne ist strukturell variiert, wodurch funktionelle Vielfalt gesichert wird. Im Gegensatz zu der PPP-Familie werden die verschiedenen Aktivitäten der PPM-Familie nicht durch unterschiedliche, assoziierte Untereinheiten erreicht. Statt dessen enthalten unterschiedliche Enzyme ein homologes katalytisches Zentrum, das für Phosphatasen der PPM-Familie typisch ist, und periphere Bereiche, die für die Spezifität der Enzyme verantwortlich sind.

Die dritte Familie der Phosphatasen sind die Phosphotyrosinphosphatasen. Ähnlich wie die antagonistisch wirkenden Enzyme der Phosphotyrosinkinasefamilie, gibt es in der PTP-Familie ebenfalls sowohl rezeptorähnliche Transmembranproteine wie auch lösliche Proteine im Zytosol. Die katalytischen Zentren der Enzyme dieser Familie sind stark konserviert. Die Spezifität der Enzyme entsteht wie bei den Enzymen der PPM-Familie durch die N- und C-terminalen Enden der Enzyme, welche die regulatorische und strukturelle nichtenzymatische Funktion und den Wirkungsort der Enzyme innerhalb der Zelle bestimmen. Phosphatasen der PTP-Familie sind spezifisch für Phosphotyrosinreste und können Serin- und Threonin-Aminosäurereste nicht dephosphorylieren [316].

3.7. HDL und Zellwachstum

Der Einfluß von Lipoproteinen auf das Zellwachstum ist auch für die Erforschung der Arteriosklerose und die Erkennung von atherogenen oder antiatherogenen Mechanismen von besonderer Bedeutung. Insbesondere das Wachstumsverhalten von glatten Muskelzellen könnte für die Entwicklung der atherosklerotischen Läsion eine wichtige Rolle spielen. Während es jedoch in den letzten Jahren verschiedene Untersuchungen zum Einfluß von Wachstumsfaktoren wie PDGF (Platelet-Derived-Growth-Factor) oder EGF (Endothelial-Growth-Factor) auf die Arterioskleroseentstehung gab, gibt es nur wenige und zum Teil widersprüchliche Untersuchungen zur Beeinflussung des Wachstumsverhaltens durch Lipoproteine.

In Experimenten wurde ein Wachstums-stimulierender Effekt von LDL in Kombination mit Serum [139], lipoproteinfreiem Serum [274] oder mit Wachstumsfaktoren wie PDGF, Insulin, Transferrin [138], oder EGF [43] gezeigt.

An verschiedenen Zelltypen wurde nachgewiesen, das HDL einen stark mitogenen Effekt ausüben kann [42, 43, 53, 104, 105, 129, 138, 176, 177, 242]. Dieser Effekt wurde als konzentrationsabhängig beschrieben und steigerte sich bis zu einer Konzentration von 500 - 1000 µg/ml HDL [129, 138]. In unserer Arbeitsgruppe konnte an humanen Hautfibroblasten nach HDL-Zugabe ein schneller PI-Umsatz und eine Aktivierung der PI-spezifischen Phospholipase C beobachtet werden [328], was auf eine mögliche mitogene Wirkung von HDL in diesem Zelltyp hindeutet, da in anderen Zelltypen eine der Aktivierung der PI-PLC folgende mitogene Aktivität nachgewiesen werden konnte.

In Experimenten mit glatten Gefäßmuskelzellen zeigte sich bei Inkubation mit HDL eine deutlich erhöhte Zellproliferationsrate [43, 138]. Die proliferativen Effekte waren deutlich höher, wenn HDL und PDGF gemeinsam zu den Zellen gegeben wurden, als wenn die Zellen nur mit einem dieser beiden Agonisten inkubiert wurden [43]. Der mitogene Effekt der HDL stieg bis 1000 µg/ml an [138]. Auch bei humanen Lymphozyten kam es durch HDL-Konzentrationen von 20 – 200 µg/ml zu einer Wachstumsinduktion [177]. Der mitogene Effekt von HDL in glatten Muskelzellen wurde in Anwesenheit von lipoproteinfreiem Serum [43] oder in Anwesenheit von Insulin, Transferrin und EGF [138] oder in Anwesenheit von Insulin und PDGF [205] gezeigt. Relativ wenig ist über mögliche mitogene Effekte von HDL in Abwesenheit anderer Faktoren bekannt. Gospodarowicz et al. zeigten einen stark mitogenen Effekt von HDL auf Zellkulturschalen, die mit extrazellulärer Matrix beschichtet waren [138]. Libby et al. hingegen konnten keinen Wachstums-stimulierenden Effekt in serumfreiem Medium feststellen [205]. Björkerud et al. wiesen nach, daß sowohl LDL als auch VLDL und HDL in glatten Muskelzellen und Fibroblasten auch in Abwesenheit anderer Wachstumsfaktoren mitogen wirken [43]. Eine Ausnahme bildete die HDL-Subfraktion HDL₂, die das Wachstum von glatten Muskelzellen, nicht aber das von fötalen Fibroblasten, inhibierte [43]. Ko et al. hingegen fanden, daß HDL den Wachstums-stimulierenden Effekt des Epidermal growth Factors (EGF) auf glatte Muskelzellen hemmt [183].

Deeg et al. zeigten, daß die durch HDL induzierte PKC-Aktivierung zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 führt [89], die auch nach einer Modifikation der HDL mit Tetranitromethan, die den Apolipoprotein-vermittelten Cholesterinefflux inhibiert, nachzuweisen war.

3.8. Tangier-Krankheit

Erstmals 1961 wurden auf Tangier-Insel, einer Insel vor Virginia an der Ostküste der USA, zwei Patienten mit charakteristischen Symptomen einer bis dahin unbekanntes Krankheit entdeckt. Nach dem Ort der Erstdiagnose wurde diese Krankheit als Tangier-Krankheit bezeichnet [13].

Klinisch fallen hyperplastische, orange Tonsillen der Patienten auf. Weiterhin zeigt sich eine Lymphadenopathie und Splenomegalie, in etwa einem Drittel der Fälle eine Hepatosplenomegalie [10, 13, 288]. Die Patienten haben oftmals eine periphere Neuropathie, wobei sowohl transiente als auch langsam progrediente Formen bekannt sind. Weiterhin ist eine gesteigerte Hämolyse, verbunden mit einer Erythrozytenanomalie bekannt. Zudem zeigte sich eine Thrombozytopenie und Leukopenie. Okuläre Manifestationen wie korneale Infiltrationen und Ablagerungen in der Retina sind häufige Begleiterscheinungen bei der Tangier-Krankheit [10, 13]. Diese Symptome resultieren möglicherweise aus der Cholesterinester-Deponierung in vielen Zelltypen, von denen die meisten Teil des retikuloendothelialen Systems sind [142]. Außerdem kommt es bei der Tangier-Krankheit auch zu Cholesterinesterablagerungen in Fibroblasten der Cornea, in Melanozyten, Schwann'schen Zellen, Neuronen und nichtvaskulären glatten Muskelzellen [10, 12, 289, 291].

Bei der Bedeutung der HDL für die Entstehung der Arteriosklerose sind die kardialen und vaskulären Manifestationen der Erkrankung bei fast vollständigem Fehlen von HDL von besonderem Interesse. Das Arterioskleroserisiko ist bei Tangier-Patienten insgesamt erhöht [12, 13, 329, 332], wobei es jedoch auch Fälle ohne vorzeitige Arteriosklerose gibt. Da es nur wenige Patienten mit dieser Erkrankung gibt und aufgrund der multifaktoriellen Genese der Arteriosklerose ist ein entsprechender Zusammenhang nicht einfach zu beurteilen.

Histologisch sind Tangierzellen, insbesondere retikulären Ursprungs, durch massive Lipidablagerungen gekennzeichnet. Dabei wurden schaumzellartig degenerierte Makrophagen [292] in allen Geweben des retikuloendothelialen Systems, wie Tonsillen, Lymphknoten, Leber und Milz, zusätzlich aber auch in intestinaler Mukosa, Gefäßwandzellen, sowie Vaginalschleimhaut gefunden [289, 290].

Das Gesamtcholesterin von Tangier-Patienten ist niedrig, wobei der prozentuale Anteil der Cholesterinester normal ist. Die Menge der Triglyzeride variiert stark bei Tangier-Patienten. Vor allem in Erwachsenen sind sie jedoch häufig auf 300 bis 400 mg/dl erhöht. Die Phospholipidkonzentrationen im Plasma sind auf 30 bis 50 % des Normalwertes abgesenkt

und das Sphingomyelin / Phosphatidylcholin-Verhältnis stark verringert [12, 13]. Die Chylomikronen in Tangier-Patienten sind normal.

VLDL zeigen durch einen hohen Anteil an Apo-A-II und Apo C eine reduzierte Mobilität in der Lipoprotein-Elektrophorese [153]. Eine verminderte Aktivität der Lipoprotein-Lipase kommt vermutlich durch hohen Anteil an Apo B-haltigen VLDL (90 % der VLDL Gesamtpopulation) zustande [12].

Tangier-LDL enthalten 27 % Triglyzeride, verglichen mit 7 % bei normalen LDL. Ein monoklonaler Apo B-Antikörper, der normalerweise mit normalen VLDL, aber nicht mit LDL reagiert, bindet an Tangier-LDL. Außerdem enthalten Tangier-LDL im Gegensatz zu normalen LDL kleine Mengen Apo-A-II. Eventuell sind dies die Gründe für den fehlenden Cholesterinester-Triglyzerid-Austausch zwischen Tangier-HDL und -LDL [12].

Die Plasma-Konzentration der HDL ist bei homozygoten Tangier-Patienten wegen der Abwesenheit gereifter HDL praktisch auf Null abgesenkt [10, 13, 288, 321, 322]. Die wenigen Mengen HDL-ähnlicher Partikel in Tangier-Plasma wurden mittels Elektronenmikroskopie, Immunoaffinitäts-Chromatographie, Gelfiltration und Elektrophorese untersucht [14, 16, 68, 100, 211, 288, 321, 322]. Im allgemeinen sind diese Partikel klein und lipidarm. Sie enthalten Apo-A-I, Apo-A-II, Apo-A-IV oder Apo E als alleiniges Apolipoprotein [16, 68, 100, 211, 288, 321, 322]. Diese Partikel können einen Cholesterinefflux aus Zellen induzieren und sind eventuell eine Erklärung für den Rest-Cholesterinefflux aus Tangierzellen trotz gestörter zellulärer Apolipoprotein-induzierter Cholesterintranslokation [12, 68, 321].

Die beiden Hauptstrukturproteine der HDL, die Apolipoproteine A-I und A-II, sind im Plasma von Tangier-Patienten bis auf 1-3 % (Apo-A-I), bzw. 5-10 % (Apo-A-II) der Norm reduziert [13, 14, 287]. Dabei konnte gezeigt werden, daß dies auf einen stark gesteigerten Katabolismus zurückzuführen ist [9, 15], der jedoch nicht durch einen Strukturdefekt der Apolipoproteine erklärt werden kann [13, 49, 195, 215].

Auch andere Apolipoproteine sind bei Tangier-Patienten reduziert. Darunter fallen Apo-C-I, Apo-C-II, Apo-C-III, Apo D, und Apo E [5].

Bei einigen Tangier-Patienten wurde festgestellt, daß die Aktivität der Lipoproteinlipase vermindert und die Aktivität der hepatische Lipase normal bis erhöht war [333].

Die Abwesenheit von normalen HDL und das fast völlige Fehlen von Apo-A-I hemmen die Plasmaaktivität der LCAT und des CETP, da HDL normalerweise eine große Menge dieser Enzyme und ihrer Substrate transportieren [12, 172, 309, 311]. Außerdem ist Apo-A-I ein Co-Faktor des LCAT-Enzyms [57, 110]. Es gibt zwei verschiedene LCAT-Enzyme in höheren Tieren: α -LCAT verestert Cholesterin in HDL oder künstlichen, Apo-A-I-haltigen

Proteoliposomen, während β -LCAT in VLDL und LDL wirkt. Bei Tangier-Patienten ist die β -LCAT-Aktivität normal, während die α -LCAT-Aktivität um 60 bis 70 % reduziert ist [63, 265]. Bei einem Patienten wurde die LCAT-Gesamtmasse bestimmt und war um 80 % reduziert [265]. Vermutlich ist das Fehlen der LCAT bei Tangier-Patienten sekundär und wird durch das Fehlen der HDL hervorgerufen [11, 12]. Die Cholesterinveresterung im Plasma von Tangier-Patienten findet in Apo-A-I-freien Lipoproteinen statt, die bei Kontrollprobanden und Tangier-Patienten absolut gleich viel LCAT tragen [73]. In normalen Zellen wird verestertes Cholesterin auf LDL übertragen, bei Tangier-Patienten aber auf LDL und VLDL [69].

Die Aktivität des PLTP in Tangierplasma unterscheidet sich nicht von der im Plasma von Kontrollprobanden [320, 322].

An Makrophagen und Fibroblasten von Tangier-Patienten konnten *in vitro* funktionelle [265] und morphologische Veränderungen des Golgi-Apparates [272], sowie ein gesteigerter Phospholipid- und Cholesterinumsatz [292, 294] gezeigt werden. Hieraus resultiert wahrscheinlich auch die fehlerhafte Speicherung der Cholesterinester in Tangier-Makrophagen; es handelt sich daher bei der Tangier-Krankheit vermutlich um einen Defekt im intrazellulären Cholesterintransport [12, 294].

Um festzustellen, ob die HDL-Defizienz bei Tangier-Patienten durch einen erhöhten Katabolismus oder eine verminderte Synthese der HDL zustande kommt, wurde radioaktiv markiertes HDL in kinetischen Studien eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, daß es bei Tangier-Patienten zu einem bemerkenswert erhöhten Katabolismus von Apo-A-I, Apo-A-II und HDL kommt [287]. Auch bei heterozygoten Tangier-Patienten wird radioaktiv markiertes HDL, sowie normales und Tangier-Apo-A-I und Apo-A-II schneller katabolisiert als bei normalen Kontrollen [50, 285, 287]. Dadurch konnte belegt werden, daß die Ursache der Tangier-Krankheit ein erhöhter Katabolismus und kein Defekt der Biosynthese der HDL-Apolipoproteine ist.

Verglichen mit Kontrollzellen zeigten sich cholesterinbeladene Hautfibroblasten von Tangier-Patienten zu 100 % effektiv in der Freisetzung von Cholesterin in der Anwesenheit von Cyclodextrinen und Phospholipidvesikeln im Medium [269], nur zu 50 % effektiv in der Anwesenheit von nativen oder rekonstituierten HDL [121, 269, 273, 330] und komplett ineffektiv in der Anwesenheit lipidfreier Apolipoproteine A-I, A-II, A-IV, Cs oder E, oder künstlicher amphipatischer Polypeptide [121, 269]. Lipidfreie Polypeptide konnten ebenfalls keinen Efflux von Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin induzieren [121, 269]. In den Experimenten von Francis et al. [121], sowie Remaley et al. [269] war der Cholesterinefflux aus Tangierzellen in Anwesenheit von Apolipoproteinen im Medium gestört und in Anwesenheit von HDL verringert. Dabei zeigte sich kein Unterschied, ob die Zellen mit ^{14}C -Mevalonat

(Efflux von neu synthetisiertem Cholesterin), mit ^3H -Cholesterin (Efflux des gesamten zellulären Cholesterins) oder mit ^3H -Cholesterinestern-beladenen LDL (Efflux von lysosomalem Cholesterin) inkubiert wurden [121, 269]. In unserer Arbeitsgruppe und in der von Rogler et al. war der HDL-induzierte Efflux neusynthetisierten Cholesterins um etwa 50 %, der Efflux von Plasmamembrancholesterin (Kurzzeitinkubation mit ^3H -Cholesterin) jedoch nicht reduziert [273, 330]. Insgesamt stimmen diese Ergebnisse überein, widersprechen sich jedoch in Details. Alle zeigen jedoch, daß Tangierzellen einen Defekt in dem durch lipidfreie Apolipoproteine und HDL induzierten Cholesterinefflux aufweisen. Hingegen ist die unspezifische Cholesterindesorption von der Plasmamembran durch HDL und apolipoproteinfreie Akzeptormoleküle offenbar intakt [12, 248]. Interessanterweise inhibiert Brefeldin A, ein Inhibitor des vesikulären Lipidtransports zwischen Golgi-Apparat und der Plasmamembran bei normalen Kontrollzellen den Apolipoprotein-vermittelten Lipidefflux vollständig und den HDL-induzierten teilweise, während es bei Tangierzellen den HDL-induzierten Cholesterinefflux nicht weiter beeinflusst [226, 227, 228, 269]. Somit scheint der Defekt des Cholesterineffluxes in Tangierzellen den vesikulären Transport zwischen Golgi-Apparat und Plasmamembran zu betreffen [12]. In Übereinstimmung mit dieser These findet sich in lipidbeladenen Tangierzellen ein hyperplastischer Golgi-Apparat [272]. Als Ergebnis dieses Defekts sind Cholesterinester in Tangierfibroblasten resistent gegen eine Apolipoprotein-induzierte Hydrolyse, und weniger resistent gegen eine HDL-induzierte Hydrolyse [12, 121, 269].

Weitere Hinweise auf eine Störung der Translokation des Cholesterins von einem intrazellulären Pool zur Plasmamembran brachten Experimente zur HDL-induzierten Signaltransduktion in Zellen von Kontrollprobanden und Tangier-Patienten [96, 273, 331]. Sowohl die HDL-induzierte Bildung von Diazylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3) aus Phosphatidylinositol (PI) durch eine PI-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) als auch die HDL-induzierte Bildung von Phosphatidsäure (PA) aus Phosphocholin (PC) durch eine Phospholipase D (PLD) waren in Tangierfibroblasten reduziert [96, 331]. Die HDL-induzierte Bildung von DAG aus PC durch die PC-PLC war erhöht [96]. Ein dem Efflux bei Tangierzellen ähnelnder Efflux wurde bei Kontrollzellen durch Inkubation mit Pertussis-Toxin, welches die G-Protein-regulierte Funktion von Phospholipasen stört, erreicht [331]. Eine medikamentöse Hemmung der DAG und PA-Bildung reduziert sowohl den Cholesterinefflux von normalen, wie auch den von Tangierzellen. Andererseits normalisiert eine Inkubation mit DAG-Analoga und eine medikamentöse Erhöhung der PA durch Inhibition der PA-Hydrolyse den HDL-induzierten Cholesterinefflux bei Tangierzellen [96, 273]. Aus diesen Daten wurde geschlossen, daß ein G-Protein-abhängiger Prozeß stromaufwärts der

Aktivierung der PKC für die Translokation von Cholesterinestern zur Plasmamembran benötigt wird und bei Tangierzellen gestört ist [12, 96].

Es gibt einige Berichte, daß kultivierte Hautfibroblasten von heterozygoten Tangier-Patienten eine halbnormale Kapazität zur Freisetzung radioaktiv markierten Cholesterins in der Anwesenheit von lipidfreiem Apo-A-I besitzen [101, 250]. Eine solche Gen-Dosis-Abhängigkeit des Apo-A-I-vermittelten Cholesterineffluxes bei Fibroblasten ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die Tangier-Krankheit durch einen defekten Cholesterinefflux aus den Zellen verursacht wird [12].

In neuesten Untersuchungen wurde der Tangier-Gendefekt zunächst dem Chromosom 9q31 zugeordnet [278]. Drei unabhängige Arbeitsgruppen konnten nun gleichzeitig das defekte Gen isolieren und mehrere Mutationen in diesem Gen der Tangier-Krankheit zuordnen [47, 56, 279]. Es handelt sich um das Gen des ABC1-Transporters (ATP Binding Cassette). Es wird davon ausgegangen, daß der ABC1-Transporter in der Plasmamembran lokalisiert ist und als ein aktiver Transporter für freies Cholesterin und möglicherweise auch für Phospholipide funktioniert [343].

3.9. Aufgabenstellung

Die obigen Kapitel haben die Bedeutung der HDL für die Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen und den inversen Zusammenhang zwischen HDL-Konzentrationen und Arterioskleroseentwicklung aufgezeigt. Warum hohe Konzentrationen HDL eine offenbar stark antiatherogene Schutzwirkung haben, ist letztlich unbekannt. Ein Zusammenhang mit der zellulären Cholesterinhomöostase, der Thrombozyteninhibition, der Aktivierung der Prostacyclinsynthese und der Inhibition der atherogenen Wirkungen oxidiertes LDL ist möglich, wobei vermutlich bei allen Wirkungen der HDL spezifische zelluläre Funktionen beeinflusst werden. Daher wurden in dieser Arbeit die durch HDL induzierten zellulären Signale untersucht. In Kapitel 3.5 wurde gezeigt, daß HDL unterschiedliche zelluläre Signale aktivieren. Problematisch ist hierbei die Zuordnung einzelner Signale zu bestimmten Funktionen der HDL. Aufgabe dieser Promotion war es nun, die den mitogenen Effekten und dem Cholesterinefflux zugrundeliegenden Signalwege näher zu charakterisieren.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Geräte

Bio-Imager Fuji Bas-KR 1500	Raytest, Düsseldorf
Brutschrank CO ₂ -Auto-Zero Typ B 5042 E	Heraeus, Düsseldorf
Durchlicht-Mikroskop „NIC Phase Contrast“	Olympus optical Co. Ltd., Tokio, Japan
Flüssigstickstoffanlage	Westfalengas, Münster
Fluoreszenz Spectrophotometer F-2000	Hitachi, Japan
Gas-Flüssigkeitschromatograph:	
Gaschromatograph „Dani 8521a“	Monza, Italien
Programmierbarer Injektor PTV	Monza, Italien
Säule „CP-Wax 57CB“	Chrompac, Frankfurt
Auswertungsprogramm „MT2“	Kontron, Neufahrn
FPLC-Anlage	LKB Bromma, Schweden
Säule: Mono Q HR 5/5	Pharmacia, Freiburg
HPLC- Anlage	Kontron, Neufahrn
Pumpe Modell 422	
Ofen Modell 480	
Dioden-Array-Detektor Modell 440	
Säule: 3 µm Spherisorb ODS2 250 x 4 mm	
Lichtmikroskop IMT-2	Olympus optical Co. Ltd., Tokio, Japan
Lyophilie DELTA 1-20 KD	Christ, Osterode
Microplate Reader MR 600	Dynex Technologie, Denkendorf
Ultraschallgerät Sonopuls GM70	Bandelin, Berlin
Spectrophotometer Uvikon 810	Kontron, Neufahrn
Sterilwerkbank UVF 6.12.8	BDK Luft- und Reinraumtechnik,
Zentrifugen: 3 K1	Sigma, Osterode
5417 R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge ZU L8-70	Beckmann, Rotor Ti 70, München
Zentrifugenröhrchen, Quick Seal, 25 x 85 mm	Beckmann, München

4.1.2. Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten anorganischen Salze und nicht extra aufgeführten Lösungen wurden von der Firma Roth mit dem Reinheitsgrad z.A. geliefert. Radioaktive Stoffe wurden von der Firma Amersham, fötales Kälberserum und Fibroblast Basal Medium von der Firma BioWhittaker und DMEM, TNM, TEMED, Trypsin-EDTA, Glycerin, Antibiotika-Fertiglösung, sowie alle verwendeten Enzyme von der Firma Sigma bezogen.

Alle verwendeten Gase, sowie Flüssig-Stickstoff wurden von der Firma Westfalengas geliefert.

4.1.3. Lösungen und Medien

Antibiotika-Antimykotika-Fertiglösung (Sigma) 100fach (angegeben sind Endkonzentrationen):

Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0,1 mg/ml
Amphotericin B	0,25 g/ml

PBS-Puffer:

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,1 mM
pH	7,4

PBS / EDTA-Puffer:

PBS-Puffer mit 0,1 % (w/v) EDTA

Phosphatfreier HEPES-Puffer:

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,8 mM
KCl	4,8 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM
NaCl	132 mM
HEPES	10 mM
Glucose x H ₂ O	10 mM
Na-Pyruvat	2,5 mM
pH	7,4

Porzio Gel Puffer:	Tris	200 mM
	Glyzin	600 mM
	EDTA	0,12 mM
	SDS	0,2 % (w/v)
	Glyzerin	10 % (v/v)
	Polyacrylamid	0,4 %
	pH	8,8

Fibroblasten-Kulturmedium:	DMEM (Sigma)	500 ml
	FCS (BioWhittaker)	10% (v/v)
	Antibiotika-Antimykotika-Fertiglösung	1% (v/v)
	Fatty acid free Albumin (FAFA)	1mg/ml

Fibroblasten-Kulturmedium für Versuche zum Zellwachstum:

Fibroblast Basal Medium (BioWhittaker)	500 ml
Antibiotika-Antimykotika-Fertiglösung	1% (v/v)

Einfriermedium für Fibroblasten:

30 % DMEM
50 % FCS (v/v)
20 % DMSO (v/v)

Lösungen für die FPLC (Isolierung von Apo-A-I aus delipidierten HDL):

Puffer A :	15 mmol Tris/HCl
(Equilibrierungspuffer)	10 mmol NaCl
	5 mol Harnstoff
	pH 7,2 (± 0,05)

Puffer B :	15 mmol Tris/HCl
(Elutionspuffer)	1 mol NaCl
	5 mol Harnstoff
	pH 7,2 (± 0,05)

PB-Puffer	0,05 M Na ₂ HPO ₄
	pH 7,0

4.2. Methoden

4.2.1. Kultivierung humaner Hautfibroblasten [208]

Im direkten Umgang mit den kultivierten Hautfibroblasten werden alle Tätigkeiten unter einer Sterilwerkbank (UVF 6.12.8, BDK Luft- und Reinraumtechnik) durchgeführt.

Als Kulturgefäße werden Kulturflaschen (Falcon) mit 25, 75 und 150 cm² Fläche verwendet, sowie Zellkulturplatten (Falcon) mit einem Durchmesser von 60 mm.

4.2.1.1. Biopsie und Kultivierung humaner Hautfibroblasten

Bei gesunden normolipidämischen Probanden oder Patienten mit Tangier-Krankheit wird nach gründlicher Kategorie-II-Hautdesinfektion mit einer 0,1%igen Lidocain-Lösung zur Lokalanästhesie eine subkutane Quaddel über einer Crista iliaca gesetzt. Mit einer Hautstanze, 3-5 mm im Durchmesser, und einer Schere wird ein Hautareal mit möglichst geringem Anteil Subkutanfett entnommen und in ein vorbereitetes steriles Gefäß mit vorgewärmten und CO₂-begasten Vollmedium gebracht.

Unter sterilen Bedingungen wird das Biopsie-Material mit einem Skalpell zerkleinert, in eine 25 cm²-Kulturflasche angeheftet und für 3-6 Wochen bei 37 °C in einer 5% CO₂ / 95% Luftatmosphäre im Brutschrank (Heraeus, „CO₂-Autozero“) in Vollmedium inkubiert. Eine Subkultivierung wird durchgeführt, wenn aus den Biopsie-Fragmenten emigrierte Fibroblasten die Oberfläche der Kulturflasche bedecken.

4.2.1.2. Subkultivierung von Monolayerkulturen

Wenn ein Kulturgefäß von Zellen vollständig bedeckt ist, sind strikt adhärente Zelllinien wachstumsinhibiert. Zur weiteren Kultivierung werden vollständig konfluente Zellen daher 1:2 bis 1:3 diluiert und subkultiviert.

Zur Komplexierung von Calciumionen werden die Kulturflaschen mit den Zellen mit 5-10 ml PBS/ 0,2% EDTA für 1 min. inkubiert. Bei der anschließenden Trypsinierung wird der Zellfilm mit 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA-Lösung benetzt. Bei Kontrolle unter dem

Durchlicht-Mikroskop (Olympus, „NIC Phase Contrast“) wird abgewartet, bis die Zellen sich abrunden und ablösen. Dann erfolgt die Aufnahme in frischem Vollmedium und die Subkultivierung in neue Flaschen, die mit bereits vorgewärmtem und CO₂-begastem Vollmedium gefüllt sind.

Sobald eine Verfärbung des im Medium enthaltenen Indikators sichtbar wird, spätestens aber nach 4-5 Tagen, wird nach Waschen der Zellen mit PBS frisches Vollmedium zugeführt.

4.2.1.3. Kryokonservierung von Zellen

Zur besseren Verfügbarkeit von Zellen der gleichen Passage, die unter identischen Kulturbedingungen gehalten wurden, zum Schutz vor Kontamination und für eine leichtere Handhabung, wird ein Großteil der Zellen kryokonserviert. Dazu werden die Zellen trypsinisiert. Nach der Aufnahme in 10 ml Vollmedium erfolgt eine Zentrifugation der Zellsuspension bei 10 °C und 120 x g (1000 Upm) in einer Kühlzentrifuge (Sigma, „3K1“). Der Überstand wird abgenommen und die Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen werden vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette in ein spezielles 1-ml-Kryogefäß überführt. Das Kryogefäß wird für ca. 1 h auf Eis gelagert. Anschließend werden die Zellen für 12 h bei -20 °C gelagert und danach in einem stark thermoisolierten Behälter langsam bis auf -70 °C abgekühlt. Nach weiteren 24 h erfolgt die Langzeitlagerung bei -176 °C in einem Flüssigstickstoffbehälter.

4.2.1.4. Auftauen kryokonservierter Zellen

Für ein möglichst schonendes Auftauen der Zellen werden diese sofort nach der Entnahme aus dem Tiefkühlbehälter bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit einer Pasteur-Pipette in eine 25 cm² Kulturflasche mit 5 ml vorgewärmtem, CO₂-begastem Vollmedium überführt.

Ein Mediumwechsel erfolgt innerhalb der ersten 3 Tage alle 24 h. Danach wird eine Subkultivierung in Abhängigkeit von der Zelldichte durchgeführt.

4.2.1.5. Ausplattieren der Zellen für Experimente

Für die Experimente werden ausschließlich Fibroblasten zwischen der 3. und 8. Passage verwendet.

Eine 150 cm² Kulturflasche mit Kontroll- oder Tangierfibroblasten wird auf 12-18 Zellkulturplatten mit 60 mm Durchmesser subkultiviert.

Ein Mediumwechsel erfolgt jeden zweiten bis dritten Tag. Dabei werden nach einem Waschschrift mit 5 ml PBS-Puffer 3 ml frisch angesetztes Vollmedium wieder auf die Kulturplatten gegeben. Die Zellen werden nach mikroskopischer Kontrolle für die Experimente bei einer Konfluenz von ca. 95% eingesetzt, wenn noch keine Kontaktinhibierung des Zellwachstums vorliegt.

4.2.1.6. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt in einer Zählkammer nach Neubauer. Bei 95 % Konfluenz werden die Zellen trypsiniert und nach dem Ablösen in 3 ml PBS-Puffer aufgenommen. Von der Zellsuspension werden 50 µl in die Zählkammer gefüllt und die Zahl der Zellen pro Großquadrat bestimmt. Die Zellzahl pro ml Ausgangslösung entspricht 160 x der Zellzahl pro Großquadrat.

4.2.2. Lipoproteinpräparation

Die für die Experimente benötigten HDL₃ werden aus menschlichem Plasma durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert [207]. Als Rohmaterial dient frisches Plasma des Instituts für Transfusionsmedizin der Universitätskliniken Münster.

Mit Kaliumbromid wird die Dichte des Blutplasmas auf 1,125 g/ml eingestellt, so daß alle Plasmabestandteile mit einer geringeren Dichte bei der Ultrazentrifugation nach oben flotieren. Die benötigte Menge Kaliumbromid errechnet sich dabei nach der Formel:

$$\text{Kaliumbromid (in kg/l)} = \frac{\text{neue Dichte} - \text{alte Dichte}}{1 - (0,312 \times \text{neue Dichte})}$$

Nach dem Einsalzen wird die Salzlösung in spezielle Ultrazentrifugationsröhrchen (25 x 89 mm, Beckman) überführt. Diese werden in einem 70 Ti-Rotor (Beckman) für 24 h bei 226000 x g (60000 Upm) in einer Ultrazentrifuge (Beckman, „L8-70“) zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen. Die Dichte des HDL-haltigen Unterstands wird auf 1,21 g/ml eingesalzen, das fehlende Volumen wird durch eine Kaliumbromidlösung mit einer Dichte von 1,21 g/ml substituiert und der Ansatz für weitere 24 h bei 226000 x g ultrazentrifugiert. Hierbei flotiert die HDL₃-Subfraktion in den Überstand und kann isoliert werden.

Das Kaliumbromid wird durch eine 24stündige Dialyse der Lipoprotein-Salz-Lösung gegen einen 0,9% NaCl-Puffer mit 0,1 mol/l Tris-HCl und 0,1 mol/l EDTA (pH 7,4) entfernt. Es folgt ein 4-5maliger Wechsel der Dialyselösung während dieser Zeit. Anschließend wird die HDL-Lösung unter einer Sterilwerkbank mit einem Mikrofilter (Schleicher & Schüll, Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

4.2.2.1. Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCA-Protein-Assays der Firma Pierce. Hierbei werden, ähnlich wie bei der Protein-Bestimmung nach Lowry [207], Cu²⁺-Ionen zu Cu¹⁺-Ionen reduziert, mit denen das Farbstoffreagenz reagieren kann. Bei dem verwendeten BCA-Protein-Assay handelt es sich bei dem Farbstoffreagenz um Bicinchoninic Acid (BCA), wobei zwei Moleküle BCA mit einem Cuprat-Ion komplexieren. Es wurde gezeigt, daß Peptidbindungen und vier Aminosäuren (Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin) mit dem BCA-Cuprat-Komplex reagieren und für die Farbbildung verantwortlich sind [303, 336]. Der Komplex ist wasserlöslich und hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm.

Material:

- (A) Reagenz A: Enthält Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Natriumtartrat und BCA-detection-reagent. Die genaue Zusammensetzung wird von der Firma Pierce nicht bekannt gegeben.
- (B) Reagenz B: 4 % Kupfer-Sulfat Lösung
- (C) Standard-Protein-Lösung aus Rinder-Serum-Albumin, Konzentration 2 mg/ml (Pierce)

Durchführung der Proteinbestimmung:

Alle Messungen werden mit einem ELISA-Gerät durchgeführt. Die Proben werden in 96-Well-Platten gegeben. Als Standards werden Verdünnungen der Rinder-Serum-Albumin-Lösung (C) eingesetzt. Eine Leerwertbestimmung erfolgt mit PBS. Die Standards und Proben werden mit PBS auf 10 µl aufgefüllt und auf die ELISA-Platte gegeben. Zu allen Proben werden 200 µl einer 1:50 Mischung aus Reagenz A und B gegeben und 30 s lang vorsichtig durchmischt. Die Proben werden für 30 min. bei 37 °C inkubiert und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Messung der Probenabsorption erfolgt bei einer Wellenlänge von 560 nm (MR 600 Microplate Reader, Dynex Technology, Denkendorf).

Mit Hilfe der erstellten Ausgleichsgeraden der Vergleichsproben mit bekanntem Proteingehalt wird die jeweilige Proteinmenge der Probe bestimmt.

4.2.2.2. Modifizierung der HDL₃**4.2.2.2.1. Nitrierung von HDL₃**

Die Modifizierung von HDL₃ mit Tetranitromethan (TNM, Sigma) wird nach der Methode von Brinton et al. [55] durchgeführt. Hierbei erfolgt eine Modifikation speziell der Tyrosin-Reste in den HDL₃, es kommt zu einer Vernetzung der Lipoproteine. Die HDL-Partikel verlieren so ihre Fähigkeit, an den HDL-Rezeptor zu binden, so daß es zu keiner PKC-Aktivierung und Cholesterintranslokation kommt [55]. Andererseits bleibt die Struktur des HDL-Partikels weitgehend erhalten und auch der diffusionsähnliche Transfer von zellmembrangebundenem Cholesterin auf die HDL bleibt durch diese Nitrierung unbeeinflusst [302].

Von der TNM-Ausgangslösung werden 72 µl mit 1,28 ml Ethanol für eine 300 mM Stammlösung zusammengegeben. 10 ml dialysierte und sterilfiltrierte HDL₃-Lösung mit einer Proteinkonzentration von 1,5 mg/ml (pH 7,4) werden mit 100 µl der 300 mM TNM-Stammlösung zusammengegeben (TNM-Reaktionskonzentration = 3 mM). Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt eine 24stündige Dialyse der TNM-Lipoprotein-Lösung gegen 5 l eines 0,9% NaCl-Puffers mit 0,01 mol/l Tris-HCl und 0,01 mol/l EDTA (pH 7,4), dabei erfolgt ein 4-5maliger Wechsel der Dialyselösung.

Eine Protein-Konzentrationsbestimmung der dialysierten TNM-Lipoprotein-Lösung wird angeschlossen.

4.2.2.2.2. Modifizierung von HDL₃ mit Dimethylsuberimidat

Bei der Modifizierung mit DMS nach Chacko et al. [66] werden freie NH₂-Reste der Apolipoproteine eines HDL-Moleküls miteinander verknüpft.

Dazu werden HDL (5 mg Protein) mit 5 mg DMS / ml in 0,09 M Triethanolamin-HCl-Puffer (pH 9,5) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Reaktion werden DMS-HDL über eine Sephadex G25-Säule reisoliert. Die Säule wird mit 0,9 % NaCl wieder eluiert. Eine Protein-Konzentrationsbestimmung der DMS-Lipoprotein-Lösung wird angeschlossen.

4.2.2.3. Delipidierung von Lipoproteinen [284]

Zur Isolierung von Proteinbestandteilen der HDL müssen die Lipide der HDL entfernt werden. Erst danach können die Proteine mittels FPLC aufgetrennt werden.

Dazu wird 1 ml einer sterilfiltrierten Lipoprotein-Lösung in ein Spitzglasröhrchen mit 15 ml Ethanol und 5 ml Diethylether gegeben, kräftig geschüttelt und 8 h bei -20 °C in einer explosionsgeschützten Gefriertruhe inkubiert. Anschließend wird die Probe für 25 min. mit 625 x g (2500 Upm) bei -20 °C zentrifugiert und danach der Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen. Es werden erneut Ethanol und Diethylether (3:1) hinzugegeben, geschüttelt und bei -20 °C inkubiert. Diese Schritte werden so lange wiederholt, bis der Überstand und die Proteinfraction keine gelbliche Färbung mehr aufweisen. Danach erfolgt bei -20 °C ein letzter Zentrifugationsschritt, der Überstand wird verworfen und die Proteinfraction in 2 ml Puffer A der FPLC (sh. Kapitel 4.2.2.4) resuspendiert.

Abschließend erfolgt ein Abdampfen von Lösungsmittelrückständen unter Stickstoff.

4.2.2.4. Isolierung von Apolipoprotein A-I

Die Isolierung des Apo A-I erfolgt durch FPLC-Auftrennung mit einem System der Firma Pharmacia. Dabei wird delipidiertes HDL auf eine Mono-Q Säule (HR5/5, Pharmacia) gegeben und die Proteine der HDL mit einem Laufmittelgradienten wieder einzeln eluiert.

Apo-A-I-Isolation mit FPLC:

Bei Raumtemperatur werden ca. 300 µg der delipidierten HDL₃-Lösung in die FPLC-Anlage eingespritzt und durch einen konstanten Flüssigkeitsstrom über die stationäre unpolare Phase in einem Kühlschrank (4 °C) geführt. Als mobile hydrophile Phase dient ein Laufmittel, das durch eine zeitlich unterschiedliche Mischung von Puffer A und Puffer B (Zusammensetzung der Puffer: Siehe Kapitel 4.1.3) gebildet wird: Bei einem konstanten Fluß von 1 ml/min wird bei einem Anfangsverhältnis Puffer A 100% / Puffer B 0% der Anteil von Puffer B linear innerhalb der ersten 20 min auf 45% gesteigert, anschließend in den folgenden 10 min auf 100% gesetzt und schließlich in den letzten 5 min wieder auf 0%. Durch ein angeschlossenes Spektrophotometer werden bei 280 nm Wellenlänge die unterschiedlichen Fraktionen registriert und die einzelnen Fraktionen mit einem Fraktionssammler zeitabhängig gesammelt. Die Trennung der Proteine entsprechend ihrer Hydrophobizität erlaubt eine Auftrennung von unterschiedlichen Apolipoproteinen und der Unterscheidung zwischen oxidierten und reduzierten Formen. Die Fraktion mit den nicht oxidierten A-I-Apolipoproteinen wird gesammelt, 24 h gegen PBS dialysiert, lyophilisiert und anschließend bei -20°C gelagert.

4.2.2.5. Präparation von Apo-A-I-Proteoliposomen

Die Präparation von Apo-A-I-haltigen-Proteoliposomen erfolgt nach der Natriumcholat-Methode von Ana Jonas [175]. Die Eigenschaften und Interaktionen dieser Partikel sind relativ gut untersucht [51, 174, 281, 325, 328], und sind denen von HDL sehr ähnlich [262, 280, 327, 328]. Die Fähigkeit der spezifischen Bindung an einen Rezeptor und der Cholesterinaufnahme wurden von einigen Autoren gezeigt [173, 255, 325]. Damit bietet sich die Möglichkeit, mit einem Partikel, der einen Teil der physiologischen Funktionen von HDL imitieren kann [328], isoliert die Wirkungen von Apo A-I zu untersuchen.

Material:

Substanz (A):	Apolipoprotein A-I in PBS gelöst (35,7 nM)	
Lösung (B):	DPPC (100 mM) in Ethanol	
Lösung (C):	NaCl	140 mM
	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH = 7,4	
Lösung (D):	Natriumcholat	100 mM

Durchführung der Präparation:

Lyophilisiertes Apo A-I wird in PBS gelöst. Es wird eine Proteinbestimmung durchgeführt, und anschließend eine Proteinkonzentration von 500 µg/ml (Lösung (A)) eingestellt.

35,7 µl einer DPPC-Lösung (B) werden mit 1 ml der Lösung (A) zusammengegeben und für 1 min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Nun werden 714 µl Lösung (D) hinzu gegeben, und nach guter Durchmischung für 90 min. bei 41 °C im Wasserbad inkubiert. Über Nacht wird gegen Puffer (C) und im Anschluß für 24 h gegen PBS dialysiert.

Von dieser Apo-A-I-Liposomenlösung wird erneut eine Protein-Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Die durch die Liposomenpräparation bedingten Verluste von Apo A-I liegen im Vergleich zur eingesetzten Menge bei ca. 20 bis 40 %.

4.2.2.6. Isolation von Apolipoprotein A-II und Herstellung von Apo-A-II-Proteoliposomen

Die Isolation von Apolipoprotein A-II und Herstellung von Apo-A-II-Proteoliposomen erfolgt analog zur Isolation von Apolipoprotein A-I und Herstellung von Apo-A-I-Proteoliposomen.

4.2.2.7. Herstellung von Liposomen mit Lipiden aus HDL

Zur Herstellung HDL-Lipidhaltiger Liposomen werden HDL delipidiert (sh. Kapitel 4.2.2.3) und die organische Phase gesammelt. Das Lösungsmittel wird unter Stickstoffzufluß abgedampft und die Lipide in Ethanol aufgenommen. Die Liposomenherstellung erfolgt analog zur Herstellung von Apo-A-I-Proteoliposomen, nur daß anstelle von Apo-A-I nur PBS eingesetzt wird und statt DPPC die HDL-Liposomenlösung.

4.2.3. Vorinkubation der Zellen zur Beladung mit Cholesterin

Eine Beladung von humanen Fibroblasten mit Cholesterin führt zu einem verstärkten Efflux von Cholesterin nach HDL-Zugabe [37, 38]. Die Wirkung der HDL läßt sich so schon in kleineren Volumina bzw. mit einer geringeren Zellzahl nachweisen.

Zur Beladung mit Cholesterin werden die Zellen mit Fibroblast Basal Medium (BioWhittaker) inkubiert, das als Zusätze nur Antibiotika und 0,5 mM Mevalonolacton enthält.

4.2.4. Methoden zur Cholesterinbestimmung

4.2.4.1. Lipidextraktion des Mediums

Die Lipidextraktion des Mediums erfolgt modifiziert nach Folch et al. [117] und Bligh et al. [44]. Die Lipide müssen aus dem Medium für einen Nachweis extrahiert werden, da sie für Messungen mittels der GC siliert werden müssen und diese Silierung nicht in einem wäßrigen Medium möglich ist. Für die Auftrennung radioaktiv markierter Lipide mittels DC ist für eine einwandfreie Auftrennung der Lipide ebenfalls eine Isolierung der Lipide vor der Auftrennung nötig.

Dabei werden 4 ml Hexan zu den Proben gegeben, gevortext und 10 min. bei 600 x g (6.000 Upm) und 4 °C zentrifugiert (Sigma, „3K1“). Die obere, organische Phase wird mit einer Pasteur-Pipette entnommen und in ein separates Probengefäß überführt. Es folgt eine Wiederholung der obigen Arbeitsschritte. Die so erhaltene Hexanphase wird unter Stickstoff abgedampft.

4.2.4.2. Lipidextraktion der Zellen

Die Lipidextraktion der Zellen erfolgt nach der Methode von Hara und Radin [147], modifiziert nach Brown *et al.* [59].

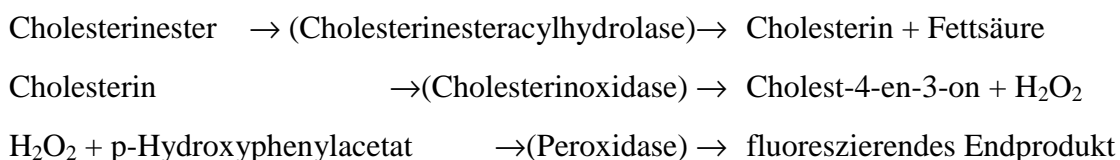
Für die Auftrennung der Lipide aus Zellen mittels DC werden die Zellen mit 1 ml Hexan:Isopropanol 3:2 (v/v) überschichtet und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lösungsmittel wird abgenommen und die Zellen mit frischer Lösung erneut 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wird wieder abgenommen und mit dem vorigen vereinigt. Die so erhaltene Hexan:Isopropanolphase wird unter Stickstoff abgedampft.

Für die Messung mittels GC werden die Zellen aus der Kulturschale abgeschabt und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Mit dieser Lösung wird wieder eine, wie oben in Kapitel 4.2.4.1 beschriebene Lipidextraktion durchgeführt.

4.2.4.3. Fluorimetrisch-enzymatische Cholesterinbestimmung

Die Bestimmung von Cholesterin mittels einer fluorimetrisch-enzymatischen Methode erfolgte nach Heider und Boyett [152].

Bei dieser Methode wird Cholesterin mit der Cholesterinoxidase enzymatisch zu Cholest-4-en-3-on umgesetzt. Das bei dieser Reaktion freiwerdende H_2O_2 reagiert mit p-Hydroxyphenylacetat in Anwesenheit einer Peroxidase zu einem fluoreszierenden Endprodukt mit einer Exzitationswellenlänge von 325 nm und einer Emissionswellenlänge von 415 nm. Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins ist der Reaktion die enzymatische Hydrolyse der Cholesterinester vorgeschaltet.



Material:

PB-Puffer		0,05 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, pH 7,0
Cholesterinoxidase-Lösung		16 U/ml in PB-Puffer
Peroxidase-Lösung		4000 U/ml in PB
p-Hydroxyphenylacetat-Lösung		1,5 mg/ml in PB
Natriumtaurocholat-Lösung		0,55 g/ml in PB
Carbowax-6000-Lösung		0,16 g/ml in PB
Reagenz A:	PB-Puffer	5 ml
	Cholesterinoxidase-Lösung	50 µl
	Peroxidase-Lösung	40 µl
	p-Hydroxyphenylacetat-Lösung	500 µl
Reagenz B:	Reagenz A	5,59 ml, wie oben beschrieben
	Natriumtaurocholat-Lösung	30 µl
	Carbowax-6000-Lösung	35 µl
	Cholesterinesteracylhydrolase	2 U

Durchführung:

Das Medium wird am Ende der Inkubationszeit von den Zellen abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und Waschlösung und Medium vereinigt und abzentrifugiert (2000 x g, 4 °C, 10 min.). Die Zellen werden abgekratzt und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Aus den Lösungen (Medium und Zellen) werden die Lipide extrahiert und das organische Lösungsmittel danach abgedampft. Der Rückstand wird in 400 µl Ethanol aufgenommen und 80 µl der Mediumproben mit 800 µl Reagenz A versetzt und 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Von den Zellproben werden 10 µl genommen und mit Ethanol auf 80 µl aufgefüllt und anschließend wie die Mediumproben weiter behandelt.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 1600 µl 0,5 N NaOH gestoppt. Diese pH-Erhöhung von 7 auf 12,5 führt zu einer Verfünffachung der Fluoreszenz der Proben, sowie zu größerer Stabilität des Farbstoffes [152]. Die Fluoreszenz der Proben wird in einem Hitachi F-2000 Fluoreszenz Spektrophotometer bei einer Exzitationswellenlänge von 325 nm und einer Emissionswellenlänge von 415 nm gemessen. Dabei wird eine Quarzglas Präzisionsküvette der Schichtdicke 10 mm verwendet. Die Proben werden während der Messung mit einem Magnetrührer durchmischt und mit einer Verstärkung von 700 V und einer Bandbreite von 10 nm werden sowohl Exzitations- wie auch Emissionswellenlänge gemessen.

Die Messung des Gesamtcholesterins wird analog durchgeführt, nur werden die Proben zunächst statt mit Reagenz A mit Reagenz B für 30 min. bei 37 °C inkubiert.

4.2.4.4. Bestimmung von Cholesterin mittels HPLC

Bei dieser Methode werden die zu untersuchenden Lipide mit hohem Druck über eine hydrophobe Säule geschickt. Je nach der Hydrophobizität des einzelnen Stoffes ist die Verweildauer auf der Säule länger oder kürzer. Mit Hilfe eines internen Standards, der zu den Proben vor der Aufarbeitung gegeben wird, kann das Cholesterin mittels seiner Laufzeit identifiziert werden und über den Vergleich der Peakflächen die absolute Menge ausgerechnet werden.

Für diese Messungen wird das Medium von den Zellen abgenommen und 10 min. mit 3000 Upm bei 4 °C zentrifugiert (Sigma, 3K1) und anschließend in neue Röhrchen überführt, damit keine Zellen im Medium zurückbleiben. Die Zellen werden von den Kulturschalen abgeschabt und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Zu den Lösungen (Medium oder Zellen) werden 100 µg/ml Cholesterinheptadecanoat (Sigma) als interner Standard hinzugegeben. Die Lipide werden zweimal mit 1 Vol. Hexan/Isopropanol 3:2 (v/v) aus der Lösung extrahiert. Die organische Phase wird gesammelt und unter Stickstoff abgedampft. Der Rückstand wird in 100 µl Acetonitril/Isopropylalkohol/*n*-Heptan 50:35:12 (v/v) aufgenommen. 20 µl dieser Lösung werden auf die HPLC aufgespritzt. Cholesterin und Cholesterinester werden bei einer Flußrate von 0,5 ml/min und einer Temperatur von 40 °C mit einem Eluierungsmittel aus Isopropanol:*n*-Heptan:Acetonitril 35:12:52 (v/v) aufgetrennt und bei einer Wellenlänge von 206 nm bestimmt.

4.2.4.5. Gaschromatographische Bestimmung von Cholesterin

Bei diesen Messungen wird der zu untersuchende Stoff verdampft und mittels eines Trägergases (z.B. Helium) über eine Säule geschickt. Die Stoffe verbleiben je nach ihrer Polarität länger oder kürzer auf der Säule. Durch eine Sililierung der Proben werden die Retentionszeiten verkürzt und die Analyten stabilisiert, so daß eine Verdampfung ohne Zersetzung der Proben erst möglich wird. Mit Hilfe eines internen Standards, der zu den Proben vor der Aufarbeitung gegeben wird, kann das Cholesterin mittels seiner Laufzeit

identifiziert werden und über den Vergleich der Peakflächen die absolute Menge ausgerechnet werden.

Dazu wird das Medium von den Zellen abgenommen, 10 min. mit 3000 Upm bei 4 °C zentrifugiert (Sigma, 3K1) und anschließend in neue Röhrchen überführt, damit keine Zellen im Medium verbleiben. Die Zellen werden von den Kulturschalen abgeschabt und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Zu der Lösung (Medium oder Zellen) werden 5 µg 5β-Cholestan-3α-ol (Epicoprostanol, Sigma) als interner Standard und 1 Vol. KOH/Ethanol 2:3 (v/v) zur Esterspaltung zugegeben und die Lösung für 1,5 h bei 80 °C inkubiert. Anschließend wird die Lösung mit 1 Vol. Hexan versetzt, geschüttelt und für 10 min. mit 2500 x g bei 4 °C zentrifugiert (Sigma, 3K1). Die organische Phase wird abgenommen und die Extraktion einmal wiederholt. Das Hexan wird unter Stickstoffzufluß abgedampft und der Rückstand mit Trimethylsilan verestert [315]. Das Sililierungsmittel wird wieder unter Stickstoffzufluß abgedampft und der Rückstand in 50 µl Hexan/Pyridin 95:5 (v/v) aufgenommen. 1 µl dieser Lösung wird auf einen Gas-Flüssigkeitschromatographen (Dani 8521a) mit einer CP-Wax 57CB-Säule (Chrompac) aufgetragen.

4.2.4.6. Nachweis von Cholesterin mittels DC

Um den Efflux *de-novo* synthetisierten Cholesterins nachzuweisen, werden die Zellen Zellkulturschalen (Durchmesser: 3,5 cm) bis zu einer Konfluenz von etwa 95 % angezogen. Anschließend werden die Zellen für 24 h mit einem Minimalmedium (DMEM + 1 % AB + 1mg/ml Albumin) inkubiert. Danach werden die Zellen mit PBS gewaschen und für 4 h mit einem Medium inkubiert, das ¹⁴C-Acetat enthält (DMEM + 1 % AB + 1 mg/ml Albumin + 10 µCi ¹⁴C-Acetat / ml). Die Zellen werden nun 3 mal gewaschen und für 10 min mit dem gleichen Medium ohne ¹⁴C-Acetat inkubiert. Nach dieser Inkubation werden die Zellen einmal gewaschen und mit dem jeweiligen Agonisten (HDL, APO-A-I o.ä.) für 2 h inkubiert. Alle Inkubationen erfolgen bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank. Nach der Inkubation wird das Medium abgenommen, und Zellen und Medium wie in den Kapiteln 4.2.4.1 und 4.2.4.2 beschrieben aufgearbeitet.

Um radioaktiv markiertes Cholesterin in Zellen und im Effluxmedium nachzuweisen, wird das Lösungsmittel der extrahierten Lipide abgedampft. Die Lipide werden in 200 µl Chloroform aufgenommen und auf DC-Platten (Kieselgel 60, Merck) aufgetragen. Die Platten werden in eine Kammer mit Laufmittel (Ether:Hexan, 2:3) gestellt. Kurz bevor die

Laufmittelfront am oberen Ende der DC-Platte ankommt, wird die Platte aus der Kammer genommen, die Laufmittelfront markiert und die Platte über Nacht getrocknet. Die Radioaktivität kann durch eine 3- bis 8-tägige Inkubation mit Bio-Imager-Platten (BAS-III 4020, Fuji) und eine nachfolgende Detektion mit einem Bio-Imager (BAS-KR 1500, Fuji) bestimmt werden. Die hierbei erhaltenen Daten werden in PSL angegeben. PSL sind keine physikalische Einheit, sondern eine maschinenabhängige, die von Gerät zu Gerät und in ungünstigen Fällen auch von Messung zu Messung leichten Schwankungen unterworfen sein kann. Daher werden alle Messungen gleichzeitig mit einem Nullwert, auf den sich die Messungen beziehen (100%) durchgeführt.

4.2.4.6.1. Detektion nichtradioaktiver Lipide durch Anfärbung der DC-Folien [301]

Zur Bestimmung der einzelnen Fraktionen auf den Platten mit radioaktiven Lipiden (sh. Kapitel 4.2.4.6), die nicht durch radioaktive Standards bestimmt werden konnten, wurden nichtradioaktive Standards auf DC-Platten aufgetragen. Zur Detektion der einzelnen Fraktionen können verschiedene Methoden eingesetzt werden:

1. Die DC-Folie wird in eine mit kristallinem Jod gefüllte, abgeschlossene DC-Kammer gestellt. Die aufsteigenden Joddämpfe verbinden sich mit den Doppelbindungen einzelner Lipide und färben diese an. Mit diesem Verfahren lassen sich Fraktionen mit doppelbindungshaltigen Lipiden detektieren.
2. Die DC-Folie wird unter einem Abzug mit 2-Chloro-Fluoreszein (Sigma) angesprüht. Eine Detektion der so gefärbten Lipidfraktionen erfolgt unter UV-Licht (240 nm). Hierbei ist eine größere Menge an Lipiden nötig, bis sich eine Fraktion sichtbar anfärbt.
3. 0,2 g Mangan-(II)-Chlorid-Tetrahydrat (Merck) werden mit 30 ml Aqua dest. und 30 ml Methanol gelöst und tropfenweise mit 2 ml konzentrierter H_2SO_4 versetzt. Die DC-Folie wird kurz in die Lösung eingetaucht und bei 120 °C im Wärmeofen für 15 min. getrocknet. Die Detektion erfolgt unter UV-Licht bei 364 nm. Hierbei werden auch geringe Mengen diverser Neutral- und Phospholipide angefärbt.

4.2.4.7. Messung des Cholesterin-Masseneffluxes bei kurzen Inkubationszeiten

Messungen des Cholesterineffluxes erfolgten in der Literatur und in unserer Arbeitsgruppe bisher nur ab Zeiten von 10 min. oder länger. Dazu wurden für jeden Messpunkt einzelne Kulturschalen angesetzt und inkubiert. Für eine Bestimmung der Kinetik des Cholesterin-Masseneffluxes nach HDL-Zugabe schwanken die Meßergebnisse von Kulturplatte zu Kulturplatte hierbei jedoch zu sehr. Es muß für solche Messungen eine große Zellmasse vorhanden sein, damit man Änderungen auch noch in einem kleinen Teil des Mediums nachweisen konnte. Daher werden für dieses Experiment Zellen in einer großen Zellkulturflasche (175 cm²) bis zur Konfluenz angezogen und anschließend für 48 h in DMEM-Medium mit 1000 µg/ml Albumin, 0,5 mM Mevalonolacton und 1 % Antibiotika-Lösung inkubiert, damit die Zellen alle in dieselbe Zellzyklusphase gelangen und möglichst synchron auf die Stimulation mit HDL reagieren. Nach der Inkubation wird der Deckel der Flasche mit einem Schraubenzieher, der über einer Bunsenbrennerflamme erhitzt wird, aufgeschweißt, damit man ungehindert Zugang zum Medium hat und in schneller Folge Proben entnehmen kann. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. In die Zellkulturflasche werden 100 ml Medium (DMEM mit 1 % Antibiotika-Lösung und 1000 µg/ml Albumin) gegeben und die Flasche auf einen Schüttler gestellt. Nun werden weitere 50 ml HDL-haltiges Medium (75 µg/ml, Endkonzentration 25 µg/ml) hinzugegeben und alle 5 Sekunden 1 ml des Mediums von den Zellen abgenommen. Vorher werden 333 µl des HDL-haltigen Mediums abgenommen und mit 666 µl des normalen Mediums vermischt und hinterher als Nullwert (100% in ng/ml) für die Auswertung bestimmt. Die einzelnen Proben (ca. 145, da die letzten Milliliter nicht mehr den gesamten Boden der Flasche bedecken und somit für eine weitere Messung nicht mehr benutzt werden können) werden wie oben beschrieben (Kapitel 4.2.4.5) für eine Messung mit der GC aufbereitet.

Abbildung 4.1 zeigt noch mal den Versuchsablauf in einer schematischen Darstellung.

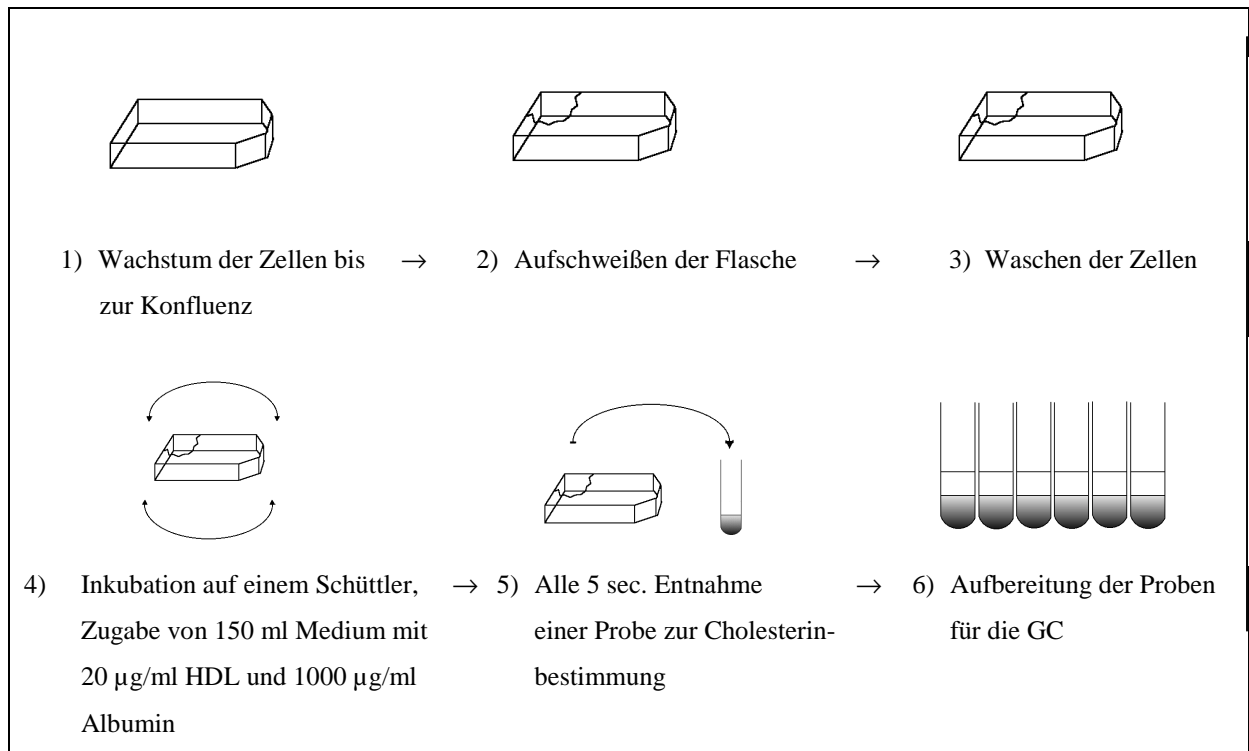


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Bestimmung des Cholesterin-Masseneffluxes bei kurzen Inkubationszeiten. Eine Erklärung des Schemas bietet der obestehende Text.

Durch die weitere Aufarbeitung der Proben und Messung des Cholesterins mit der GC erhält man Cholesterinwerte, die sich aus einer allmählichen Aufkonzentrierung des Mediums ergeben. Da das Volumen des Mediums mit jeder Probenentnahme verringert wird, die Zellzahl jedoch gleich bleibt, müssen die GC-Werte noch umgerechnet werden. Gleichzeitig muß bei dieser Rechnung berücksichtigt werden, daß das HDL-Cholesterin, sozusagen der Grundwert, ebenfalls kontinuierlich verringert wird.

Die GC-Werte wurden nach der folgenden Formel umgerechnet:

$$((GC - NW) * RV / AV) + NW$$

Wobei GC = der Meßwert der GC (in ng/ml) ist, RV = das Restvolumen vor der Probenentnahme (in ml), AV = das Ausgangsvolumen (in ml) und NW = der Nullwert (in ng/ml) ist.

Die Formel ergibt sich folgendermaßen:

Von dem gemessenen GC-Wert (GC) wird zunächst der Nullwert (NW), also der Cholesterinwert des Mediums vor Zugabe zu den Zellen, der sich allein durch das HDL-Cholesterin ergibt, abgezogen.

Das Ergebnis wird mit dem Restvolumen multipliziert, um das Gesamtcholesterin im Medium zum Zeitpunkt der Probenentnahme zu bestimmen. Dieser Wert wird nun durch das Anfangsvolumen geteilt, um die Aufkonzentrierung des Mediums durch die Probenentnahme zu berücksichtigen.

Hierdurch erhält man einen Cholesterinwert, der durch Bindung der HDL an die Zellen zu Anfang auch negativ werden kann. Der erste Meßwert ergibt sich hierbei mit Null, da der gemessene Cholesterinwert (GC) gleichzeitig auch der Nullwert (NW) ist. Da man einen Wert von Null in der Prozentrechnung nicht als 100% einsetzen kann, wird auf diesen Wert und alle anschließenden Werte als konstanter Faktor der Nullwert (NW) addiert.

4.2.5. Phosphatase-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität von Phosphatasen der PPP- und PPM-Familie wurde ein Phosphatase-Assay mit humanen Hautfibroblasten durchgeführt. Dabei wird ein Substrat der Phosphatasen, die Phosphorylase a radioaktiv markiert und anschließend die Freisetzung radioaktiven Phosphors durch die Phosphatasen gemessen. Hiermit kann die effektive Wirkung von Phosphatase-Inhibitoren in den von uns verwendeten Zellen gemessen werden.

Material:

Mix I:	25 µl Tris	50 mM, pH 7,4
	12,5 µl EDTA	10 mM, pH 7,4
	62,5 µl Koffein	100 mM

Phosphorylase a Mix II:

H ₂ O	10 µl / Reaktionsgefäß
β Mercaptoethanol	1 µl / Reaktionsgefäß
Mix I	4 µl / Reaktionsgefäß
³² P-Phosphorylase a	5 µl / Reaktionsgefäß

Dialysierlösung:

40 ml Tris (1M, pH7,4)
20 ml EDTA (0,2M, pH7,4)
H₂O ad 4000 ml

Durchführung:**Herstellung einer ³²P-markierten Phosphorylase A:**

200 U Phosphorylase-Kinase werden in 3,2 ml H₂O, 0,2 ml 1 M Tris-Puffer pH 7,4 und 30 µl β-Mercaptoethanol zusammen mit 10 mg BSA gelöst.

10 mg Phosphorylase B werden in 1 ml H₂O gelöst und mit 100 µl 1 M Tris-Puffer pH 7,4, 40 µl 1 M MgCl₂, 40 µl β-Mercaptoethanol, 20 µl 100 mM CaCl₂, 300 µl H₂O und 500 µl der Phosphorylase-Kinase Lösung inkubiert. Zu dieser Lösung kommen 20 µl 100 mM ATP und 1 mCi γ-[³²P]-ATP. Der Reaktionsansatz wird 2,5 bis 4 h bei 30 °C inkubiert.

Nach der Inkubation werden 3 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung zu dem Ansatz zugegeben, geschüttelt und die Lösung für weitere 30 min. auf Eis inkubiert.

Der Ansatz wird für 30 min. bei 4 °C und 15000 upm (Eppendorffzentrifuge) zentrifugiert.

Das Pellet wird in 2 ml Dialysierlösung aufgenommen, nochmals mit NH₄Cl gefällt, dann wieder in Dialysierlösung aufgenommen und für 24 h bei Raumtemperatur dialysiert. Die Aufbewahrung der Phosphorylase a erfolgt bei 4 °C.

Phosphatase-Assay:

Für die Durchführung des Experiments werden Zellen von einer großen Kulturflasche abgelöst, dreimal mit phosphatfreiem HEPES-Puffer gewaschen und anschließend in 10 ml phosphatfreien HEPES-Puffer aufgenommen. Die Zellen werden mit Ultraschall aufgearbeitet und das Homogenat in Eppendorffgefäße aliquotiert. In die Reaktionsgefäße werden 10 µl DMSO (1% in H₂O), eine Verdünnungsreihe des Phosphatase-Inhibitors und 20 µl Phosphorylase a Mix II pipettiert und 10 min. bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 µl Trichloressigsäure (50 %) und 30 µl BSA gestoppt und die Gefäße für 10 min. auf Eis inkubiert. Die Reaktionsgefäße werden zentrifugiert (5 min., 14000 upm, Eppendorffzentrifuge) und 70 µl des Überstands werden in einem Szintillationscounter ausgewertet.

4.2.6. Bestimmung der Phosphataseaktivität

Nachdem durch den Phosphatase-Assay die Aktivität der Phosphatasen in einem Zellhomogenat nachgewiesen wurde, wird hier die Phosphorylierung der Proteine *in vivo* unter Einfluß von Phosphatase-Inhibitoren, HDL, Apo-A-I und anderen Effektoren gemessen.

Bei diesen Experimenten werden die Zellen von einer großen Kulturflasche abgelöst, dreimal mit phosphatfreiem HEPES-Puffer gewaschen und anschließend in 10 ml des phosphatfreien Puffers mit 5 mCi $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der radioaktive Überstand von den inzwischen sedimentierten Zellen vorsichtig abgenommen und erneut 10 ml phosphatfreier HEPES-Puffer zu den Zellen gegeben und 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wird wieder abpipettiert und die restliche Lösung mit den sedimentierten Zellen auf ca. 5 ml aufgefüllt. Die Zellen werden vorsichtig geschüttelt und jeweils 100 μl der Zellsuspension in vorbereitete Eppendorfgefäße gegeben. Die Reaktionsgefäße enthalten jeweils 100 μl HEPES-Puffer mit den entsprechenden Konzentrationen der Agonisten. Die Zellen werden 30 min. bei 37 °C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 100 μl Lämmli-Puffer (62,5 mM Tris, 10 % SDS, 20 % Glycerin, 6mg/ml DTT und Spuren von Bromphenolblau, pH 6,8) gestoppt. Anschließend werden die Zellen für 10 min. auf 95 °C erhitzt und so aufgeschlossen. Je 100 μl eines Ansatzes werden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (s. Kapitel 4.2.7).

4.2.7. Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Kontrolle des isolierten Apolipoprotein A-I und A-II, sowie zur Auftrennung der ^{32}P -markierten Proteine des Phosphatase-Assays wurden die isolierten Proteine bzw. die Zellaufschlüsse mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese wird Acrylamid polymerisiert und bildet ein Gel, durch das die Proteine in einem elektrischen Feld wandern. Dabei werden größere Proteine stärker zurückgehalten als kleinere, man erreicht also eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe.

Dazu werden pro Gel 18,75 ml Porzio Gel Puffer mit 12,5 ml einer 30 % Acrylamid / 1,5 % Bisacrylamid-Lösung, 6,25 ml Glycerin:H₂O 1:1 und 32,5 μl TEMED vermischt und anschließend mit 150 μl 10 % APS versetzt. Die Lösung wird zwischen die vorbereiteten Platten gegeben. Nach ca. 30 min. ist das Gel polymerisiert. Anschließend wird auf das Trenngel das Sammelgel gegossen. Dazu werden pro Gel 2,35 ml einer 0,5 M Tris – 0,4 %

SDS Lösung (pH 6,8) mit 1,25 ml einer 30 % Acrylamid / 1,5 % Bisacrylamid-Lösung, 5,6 ml H₂O und 6 µl TEMED vermischt und danach 95 µl 10 % APS zugegeben. Die Lösung wird auf das Trenngel gegeben, ein Kamm aufgesteckt und wieder für ca. 30 min. inkubiert, bis das Gel polymerisiert ist.

Wenn das Gel ausgehärtet ist, wird der Kamm entfernt, die Taschen mit Puffer ausgewaschen und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt, die Proben aufgetragen und zunächst 30 min. bei 40 mA fokussiert, danach bei 60 mA weitere 2,5 h fokussiert.

Die Gele wurden nach dem Lauf entweder geblottet (Apolipoproteine A-I und A-II), oder mit Coomassie Blue gefärbt um den Standard sichtbar zu machen, getrocknet und mit Bio-Imager Platten inkubiert, um die Radioaktivität zu bestimmen.

4.2.8. Durchführung der Versuche zum Zellwachstum

Um den Einfluß von HDL auf das Zellwachstum näher zu untersuchen, wurde eine nichtradioaktive Methode verwendet. Dabei wird Bromdeoxyuridin anstelle von Thymidin in die DNA der wachsenden Zellen eingebaut. Mittels eines Antikörpers gegen dieses Bromdeoxyuridin, der mit einem Enzym gekoppelt wurde, kann die DNA-Bildungsrate und somit das Wachstum der Zelle bestimmt werden.

Verwendet wird hierbei ein Zellproliferationskit „BrdU ELISA“ der Firma Boehringer, Mannheim. Die Zellen werden dazu von großen Zellkulturflaschen mit Trypsin/EDTA abgelöst, in 10 ml Medium aufgenommen und für 5 min. bei 10 °C und 1000 upm zentrifugiert (Sigma, 3K1). Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen in 3 ml Vollmedium wieder aufgenommen. Die Zellzahl wird bestimmt und jeweils 6000 Zellen pro Vertiefung in einer 96-well-Zellkulturschale ausgesät. Nach 6 h wird das Medium abgenommen und die Zellen in 100 µl Hungermedium (Fibroblast Basal Medium + Antibiotika) pro Vertiefung inkubiert. In den nächsten 48 h gelangen die Zellen alle in die gleiche Zellzyklusphase. Nun wird das Medium erneuert und die Agonisten (HDL, Apo-A-I und Inhibitoren) zu den Zellen zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 16 h sind die Zellen in einer Phase der DNA-Synthese. Nun wird das Bromdeoxyuridin zugegeben und die Zellen weitere 8 h inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit einer alkoholischen Lösung fixiert. Die fixierten Zellen werden mit dem Anti-BrdU-Antikörper inkubiert, anschließend mehrfach gewaschen und mit der Substratlösung für das an den Antikörper gekoppelte Enzym versetzt. Mit H₂SO₄ wird die

Reaktion gestoppt und die Menge an gebildetem Farbstoff und damit indirekt die Wachstumsrate mit einem ELISA-Meßgerät gemessen.

5. Ergebnisse

5.1. Etablierung einer Methode zur Bestimmung des Cholesterineffluxes

Um den Netto-Efflux von Cholesterin aus humanen Hautfibroblasten zu messen, wurden mehrere Methoden untersucht. Zum einen eine fluorimetrisch-enzymatische Methode nach Heider und Boyett [152]. Hierbei wird Cholesterin mittels des Enzyms Cholesterinoxidase zu Cholest-4-en-3-on umgesetzt. Das freiwerdende H_2O_2 reagiert mit p-Hydroxyphenylacetat in Anwesenheit einer Peroxidase zu einem fluoreszierenden Endprodukt. Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins werden die Cholesterinester vor der Reaktion enzymatisch hydrolysiert. Zum anderen eine Methode zur Bestimmung des Cholesterins mittels HPLC. Bei diesen Messungen werden die Lipide mit hohem Druck über eine hydrophobe Säule geleitet und nach ihrer Polarität aufgetrennt.

Als drittes wurde der Cholesteringehalt der Proben mit einer gaschromatographischen Methode bestimmt. Hierbei wird der zu untersuchende Stoff verdampft und über eine Säule geleitet, die ähnlich wie bei Messungen mit der HPLC die Stoffe nach ihrer Polarität auftrennt.

Als vierte Methode wurde der Cholesterinefflux mittels radioaktiver Markierung bestimmt. Hierbei wird das Cholesterin der Zellen durch Inkubation mit radioaktiven Präkursoren markiert. Durch eine Auswertung der Radioaktivität im Medium durch Auftrennung der Lipide mittels Dünnschichtchromatographie läßt sich der Cholesterinefflux bestimmen.

Die für die in dieser Arbeit durchzuführenden Messungen ideale Methode sollte folgende Charakteristika aufweisen:

- a) Sie mußte sensitiv und dabei ausreichend genau sein, damit kleine Probenmengen für eine Messung ausreichen.
- b) Sie mußte einen möglichst hohen Probendurchsatz erlauben, da einige Versuche eine sehr hohe Probenzahl verlangten.
- c) Sie mußte es ermöglichen, zwischen freiem und verestertem Cholesterin zu unterscheiden.

Die oben beschriebenen Methoden wurden daher diesbezüglich getestet.

Es zeigte sich, daß die Messung mit der GC und die Messungen mit radioaktiven Präkursoren die Methoden mit den geringsten Nachweisgrenzen waren, während Messungen mit der HPLC etwa die 500fache Probenmasse benötigten. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden Proben mit bekannten Mengen Cholesterin gemessen. Als untere Nachweisgrenze wurde die Cholesterinmenge der Proben bestimmt, die statistisch signifikant noch vom Nullwert unterschieden werden konnte.

Bezüglich des Probendurchsatzes war die fluorimetrisch-enzymatische Methode die beste Methode, die bei der unteren Nachweisgrenze zwischen der GC und der HPLC lag.

Bei der GC und der HPLC war von Vorteil, daß im Gegensatz zu der fluorimetrisch-enzymatischen und der radioaktiven Methode ein interner Standard verwendet werden konnte. Dadurch werden die Messungen präziser und Standardabweichungen durch Verluste bei der Aufarbeitung der Proben werden minimalisiert. Die Präzision der fluorimetrisch-enzymatischen Methode war für unsere Messungen nicht ausreichend.

Tabelle 5.1 zeigt die einzelnen Methoden und ihre Vor- und Nachteile:

Methode	Nachweisgrenze	Probendurchsatz bei der Aufarbeitung	interner Standard	Dauer einer Messung	Simultane Bestimmung von freiem und verestertem Cholesterin	Standardabweichungen bei bekannten Proben***	Probenmenge *
Fluorimetrisch-enzymatisch	ca. 50 ng	sehr hoch – ca. 150 / h	Nein	30 sek.	Nein	Bis zu 45 % des Mittelwertes	ca. 100 µg
HPLC	ca. 1000 ng	mittel – ca. 10 / h	Ja	45 min.	Ja	Bis zu 3 % des Mittelwertes	ca. 1 mg
GC	ca. 2 ng	mittel – ca. 10 / h	Ja	12 min.	Nein	Bis zu 2,5 % des Mittelwertes	ca. 100 µg
Radioaktiv	ca. 20 ng**	mittel – ca. 10 / h	Nein	ca. 8 Tage	(Ja)**	Bis zu 10 % des Mittelwertes	ca. 100 µg

Tabelle 5.1: Methoden zur Bestimmung des Cholesterineffluxes.

* Benötigte Zellmasse für Messungen des Cholesterineffluxes in das Medium.

** Je nach vorheriger Markierung der Zellen.

*** Bei einer Cholesterinmasse von 100 ng

Ich entschloß mich für die GC-Messmethode, weil sie die meisten Vorteile aufwies: Sie erlaubte einen annehmbaren Probendurchsatz sowohl bei der Aufarbeitung, wie auch bei der Messung, sie war durch die Verwendung eines internen Standards sehr genau und hatte die niedrigste Nachweisgrenze.

5.2. Einfluß verschiedener Beladungsmethoden

Es ist bekannt, daß eine Anreicherung von Cholesterin in humanen Hautfibroblasten den HDL-induzierten Cholesterinefflux beeinflußt [37, 38]. In der Literatur ist beschrieben worden, daß nach Vorinkubation mit Cholesterin und Progesteron der Cholesterinefflux verstärkt wird [37, 38, 61, 224, 249, 302]. Daher wurden verschiedene Beladungstechniken auf ihre Effizienz hin verglichen, den Cholesterin-Massenefflux zu stimulieren. Zellen wurden mit freiem Cholesterin (25 µg/ml), mit Progesteron (10^{-4} M) und mit Mevalonolacton (0,5 mM) vorinkubiert. Anschließend wurde der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux bestimmt. Ein Vergleich der Cholesterinmasse im Effluxmedium und eine mikroskopische Untersuchung der Zellen vor, während und nach dem Experiment brachte folgende Ergebnisse:

Vorinkubation mit freiem Cholesterin:

Nach einer Vorinkubation mit Cholesterin wurde der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux 1,8-fach erhöht. Eine mikroskopische Kontrolle der Zellen zeigte keine morphologischen Veränderungen.

Von Nachteil war, daß Cholesterin wasserunlöslich ist und als Kristall im Medium ausfällt. Diese Kristalle haften an den Zellen fest und sind mikroskopisch sichtbar. Sie waren auch nach mehrmaligem Waschen nicht völlig zu entfernen. Dadurch wurde bei der späteren Messung eine größere Ungenauigkeit verursacht.

Vorinkubation mit Progesteron:

Nach einer Vorinkubation mit Progesteron wurde der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux 1,2-fach erhöht. Eine mikroskopische Kontrolle der Zellen zeigte ebenfalls keine morphologischen Veränderungen der Zellen. Die Standardabweichungen der Messungen waren mäßig bis gering.

Ähnlich wie bei der Inkubation mit Cholesterin, fiel auch das wasserunlösliche Progesteron als Kristall im Medium aus. Eine Aufnahme dieser Kristalle in die Zellen ist unwahrscheinlich, so daß von der gesamten eingesetzten Progesteronmenge nur ein Teil in die Zellen gelangt. Vermutlich läßt sich dadurch auch die nur sehr geringe Steigerung des Cholesterin-Masseneffluxes erklären.

Vorinkubation mit Mevalonolacton:

Die Vorinkubation mit Mevalonolacton erhöhte den HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux 1,5-fach. Eine mikroskopische Kontrolle der Zellen zeigte keine morphologischen Veränderungen. Die Standardabweichungen der Messungen waren bei dieser Beladungsmethode sehr gering, die Präzision war also hoch, und die Steigerung des Cholesterin-Masseneffluxes war vergleichbar mit Messungen nach Beladung der Zellen mit Cholesterin.

Abbildung 5.1 zeigt eine graphische Darstellung des Versuches:

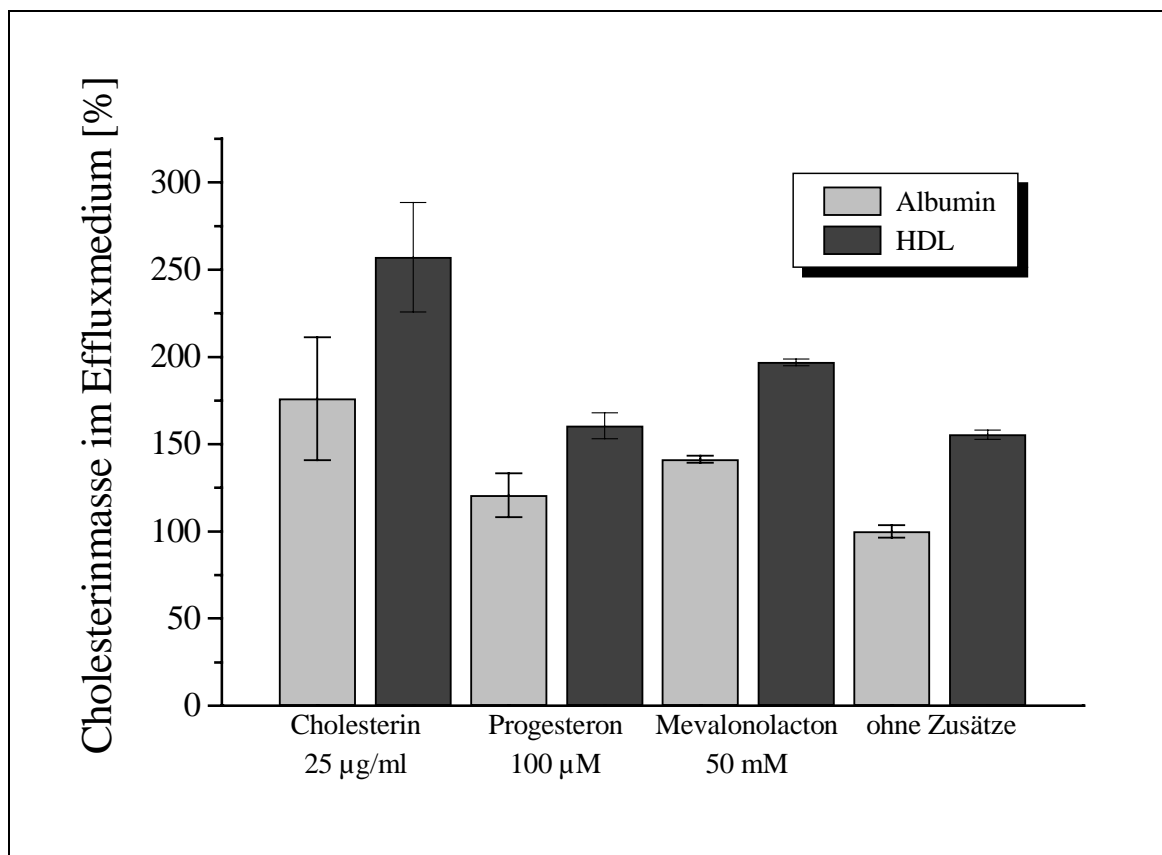


Abbildung 5.1: Cholesterinefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin aus humanen Hautfibroblasten nach 48-stündiger Beladung mit 25 µg/ml Cholesterin, 100 µM Progesteron, 10 % FCS, 50 mM Mevalonolacton bzw. ohne Zusätze. Bei allen Ansätzen waren 1 mg/ml Albumin im Medium vorhanden. In hellgrau werden Ansätze dargestellt, die außer dem Agonisten zur Vorinkubation nur 1 mg/ml Albumin enthielten. In schwarz wurden Ansätze dargestellt, die zusätzlich zu dem Agonisten und 1 mg/ml Albumin noch 25 µg/ml HDL enthielten. 100 % entsprechen in dieser Abbildung dem Efflux ohne Vorinkubation in Medium nur mit Albumin (erster Balken der vierten Staffe).

Nach Vorinkubation der Zellen mit Cholesterin zeigt sich nach zweistündiger Inkubation der Zellen mit Albumin und HDL der jeweils größte Cholesterinmassenefflux verglichen mit dem entsprechenden Efflux der anderen Ansätze. Die Standardabweichungen der Messungen sind relativ groß und liegen bei ± 30 bis 45 %.

Die Vorinkubation mit Progesteron zeigt kleinere Standardabweichungen von ± 7 bis 13 %, die Steigerung des Cholesterineffluxes bezogen auf den Ansatz ohne Vorinkubation der Zellen ist jedoch nur gering.

Die Vorinkubation der Zellen mit dem H₂O-löslichen Mevalonolacton zeigte gute Ergebnisse. Es zeigte sich, daß durch die Beladung mit Mevalonolacton eine um bis zu 50 % Steigerung Effluxes mit und ohne HDL auftrat. Dies ist ein mit der Cholesterinbeladung vergleichbarer Wert. Von Vorteil war, daß die Standardabweichungen bei den Messungen mit $\pm 1,4$ bis 1,9 % äußerst gering waren.

Deshalb wurden für die folgenden Experimente die Zellen mit der Cholesterinvorstufe Mevalonolacton beladen, und anschließend der Efflux mit HDL stimuliert.

5.3. Cholesterinefflux aus Kontrollfibroblasten: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit

Es wurde die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Cholesterineffluxes untersucht, induziert durch HDL, freies Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen. Dabei wurde sowohl die Mobilisierung *de-novo* synthetisierten Cholesterins mittels radioaktiver Markierung als auch der Cholesterin-Massenefflux mittels Gaschromatographie untersucht.

5.3.1. HDL-induzierter Cholesterinefflux

5.3.1.1. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Der durch HDL induzierte Cholesterinefflux wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Dabei wurden zum einen sehr kurze Inkubationszeiten gewählt, zum anderen lange Inkubationszeiten bis maximal 20 h. Für diese beiden Ansätze mußten unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt werden, die in den Kapiteln 4.2.4.7 und 4.2.4.5 beschrieben wurden. Das Sättigungsverhalten des HDL-induzierten Cholesterineffluxes wurde ebenfalls durch die Mobilisierung *de-novo* synthetisierten Cholesterins in Abhängigkeit längerer Inkubationszeiten bis 4 h untersucht.

Abbildung 5.2 zeigt die Abhängigkeit des HDL-induzierten Cholesterineffluxes von der Inkubationszeit.

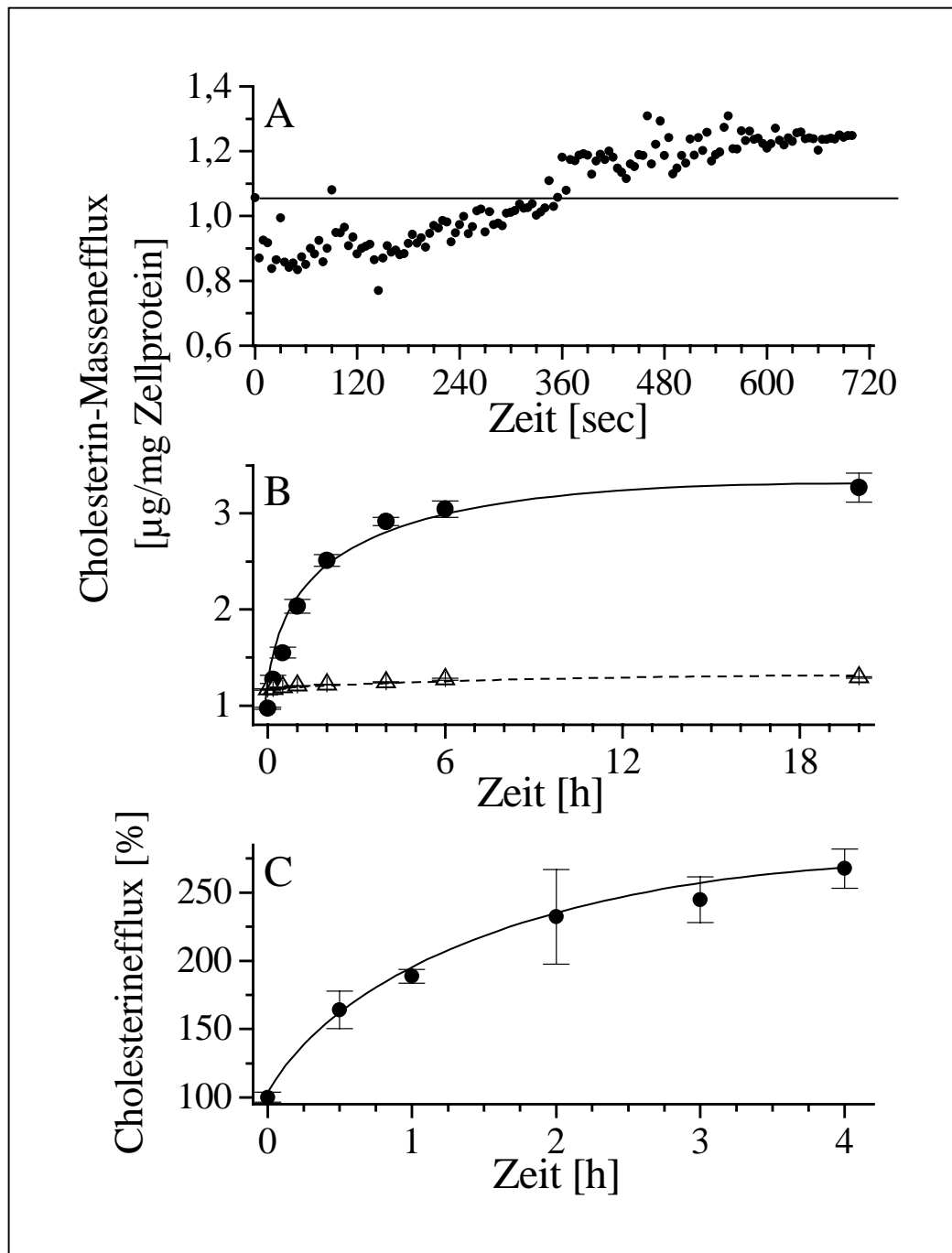


Abbildung 5.2: HDL-induzierter Cholesterinefflux. Dargestellt ist die zeitabhängige Kinetik.

[A]: HDL-induzierter Cholesterin-Massenefflux bis 12 Minuten nach HDL-Zugabe (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.7 beschrieben durchgeführt. Der Ausgangswert der Messung entspricht dem Cholesteringehalt des Mediums vor Zugabe zu den Zellen. Der Cholesteringehalt der HDL wurde bei den dargestellten Werten abgezogen. Punkte oberhalb der eingezeichneten Linie kennzeichnen Netto-Efflux.

[B]: HDL-induzierter Cholesterin-Massenefflux (gefüllte Kreise) und Albumin-induzierter Cholesterin-Massenefflux (offene Dreiecke) bis 20 h nach HDL-Zugabe (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt. Die Messung zum Zeitpunkt 0 zeigt den Cholesterinwert des Mediums vor Zugabe zu den Zellen. Der HDL-Cholesterinwert wurde bei allen Messungen abgezogen.

[C]: HDL-induzierter Cholesterinefflux de-novo synthetisierten Cholesterins bis 4 h nach HDL-Zugabe (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen in diesem Versuch dem Cholesterinefflux nach 4 h in Medium mit 1 mg/ml Albumin ohne HDL. Dies entspricht in diesem Versuch einem Wert von $6994,37 \pm 148,91$ PSL. (PSL=Photostimulated Luminescence, Einheit des Bio-Imagers Fuji BAS-KR1500 der Firma Raytest)

Man erkennt in Abbildung 5.2 A, daß der Cholesteringehalt im Medium in den ersten 30 Sekunden bis auf ca. 80 % des Ausgangswertes absinkt und anschließend kontinuierlich ansteigt. Erst nach circa 6 Minuten wird der durch eine Gerade dargestellte Ausgangswert wieder erreicht. Erst danach findet ein Netto-Efflux statt.

Abbildung 5.2 B zeigt, daß der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux in den ersten zwei bis sechs Stunden sehr stark ansteigt und anschließend ein Plateau erreicht. Der Albumin-induzierte Cholesterin-Massenefflux steigt nur sehr langsam linear an.

In Abbildung 5.2 C ist zu sehen, daß der HDL-induzierte Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins einen ähnlichen Verlauf wie der HDL-induzierte Cholesterinmassenefflux des Gesamtcholesterins in Abbildung 5.2 B aufweist. Jedoch steigt der Efflux in den ersten zwei Stunden nicht so steil an, erreicht dann aber ebenfalls ein Plateau. Ausgangswert (100%) ist der Efflux neusynthetisierten Cholesterins nach 4 Stunden in Medium mit 1 mg/ml Albumin ohne Zugabe von HDL.

5.3.1.2. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Konzentration

Der durch HDL induzierte Cholesterinefflux wurde in Abhängigkeit von der Konzentration der HDL im Medium untersucht.

Hierbei wurde sowohl die Mobilisierung neusynthetisierten Cholesterins, wie auch der Massenefflux des Gesamtcholesterins der Zellen untersucht.

Abbildung 5.3 zeigt die HDL-Konzentrationsabhängigkeit des Cholesterineffluxes aus humanen Kontrollfibroblasten.

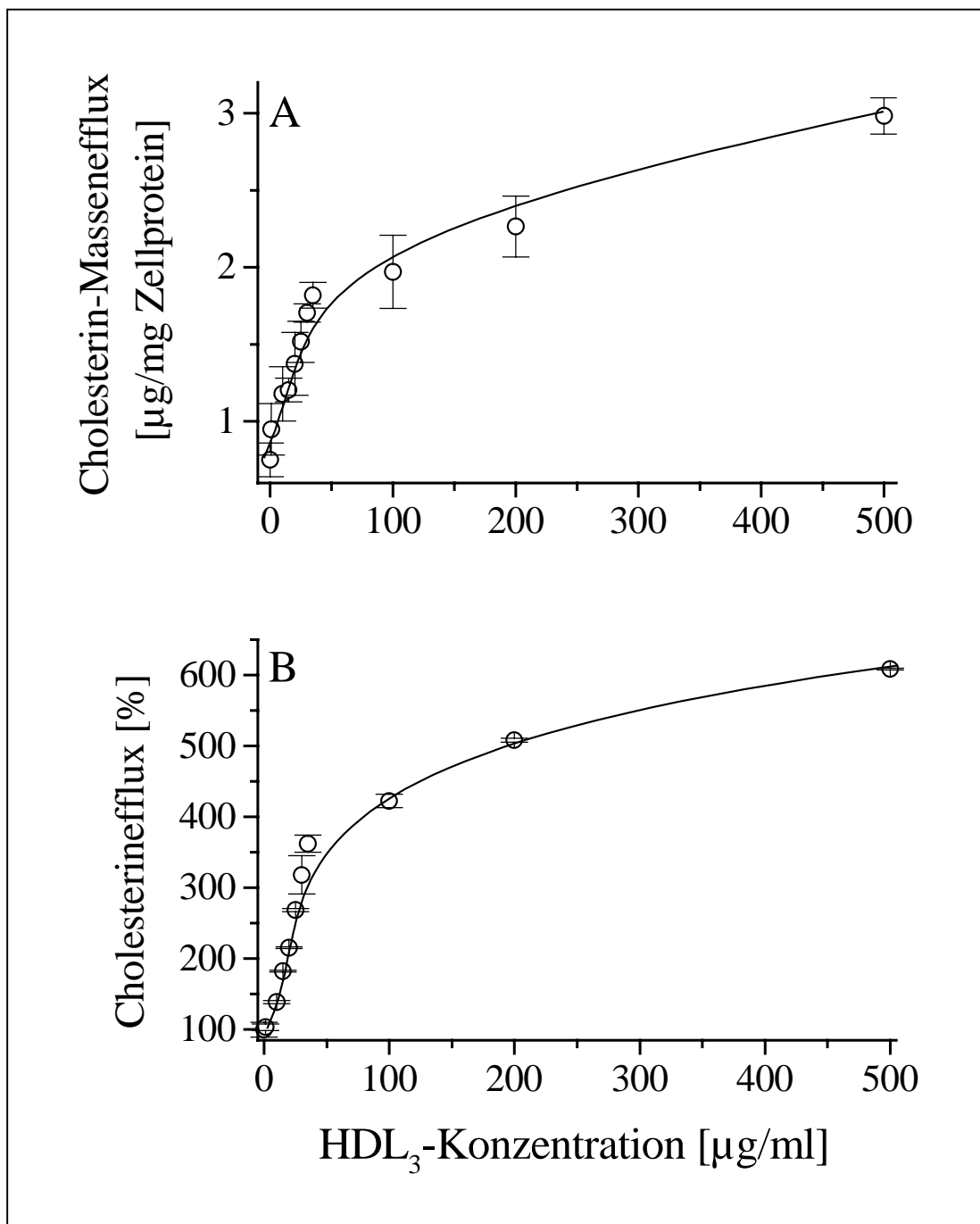


Abbildung 5.3: Cholesterinefflux von humanen Hautfibroblasten in Abhängigkeit der HDL₃-Konzentration.

[A]: Massenefflux des Gesamtcholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[B]: Mobilisierung de novo synthetisierten Cholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen dem Efflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin nach 4 h ohne Zugabe von HDL, in diesem Experiment entspricht dies einem Wert von $3943,95 \pm 502,30$ PSL.

Abbildung 5.3 A zeigt, daß der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux des Gesamtcholesterins bis zu einer Konzentration von etwa 25 µg/ml stark ansteigt (bis 50 µg/ml HDL auf das 2-fache) und danach annähernd linear (bis auf das 3,5-fache bei 500 µg/ml HDL) in Abhängigkeit der Akzeptorkonzentration weiter ansteigt.

In Abbildung 5.3 B ist zu sehen, daß die Mobilisierung *de novo* synthetisierten Cholesterins bis zu einer Konzentration von etwa 25 µg/ml ebenfalls stark ansteigt (bis 50 µg/ml HDL auf das 3,5-fache) und danach auch näherungsweise linear (bis auf das 5,5-fache bei 500 µg/ml HDL) in Abhängigkeit der Konzentration ansteigt.

Ein Vergleich der beiden Abbildungen zeigt, daß der Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins wesentlich stärker durch HDL induziert wird als der Cholesterin-Massenefflux.

5.3.2. Apo-A-I-induzierter Cholesterinefflux

HDL₃ besitzen als Hauptapolipoproteine Apo A-I und Apo A-II [19], wobei insbesondere Apo A-I eine bedeutende Rolle für die zellulären Wechselwirkungen des HDL₃ zugeschrieben wird [30]. Es konnte gezeigt werden, daß insbesondere Apo A-I für die Funktion der HDL₃ als Akzeptoren zellulären Cholesterins wichtig ist [10, 26, 149]. Es wurde daher in dieser Arbeit neben HDL₃ auch freies Apo-A-I verwendet, um so isoliert die Apo-A-I-spezifischen Effekte charakterisieren zu können. Es wurden die Abhängigkeiten des Cholesterineffluxes von der Konzentration und der Inkubationszeit untersucht. Diese Experimente sollten durch Vergleiche der Effluxmasse und der Kinetik des Cholesterineffluxes darüber Aufschluß geben, ob Apo-A-I auch bei humanen Hautfibroblasten wie in der Literatur beschrieben [150, 185, 198, 225, 249, 251] ein Faktor der HDL ist, der Cholesterinefflux induziert, und wie groß der Anteil des Apo-A-I an der Induktion von Cholesterin-Massenefflux ist.

5.3.2.1. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Der durch Apo-A-I induzierte Cholesterinefflux wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Dabei wurden zum einen sehr kurze Inkubationszeiten gewählt, zum anderen lange Inkubationszeiten bis maximal 4 h.

Anhand der kurzen Inkubationszeiten sollte gezeigt werden, wie schnell ein Cholesterinefflux durch Apo-A-I induziert werden kann und ob sich die Kinetik des Effluxes von der Kinetik des HDL-induzierten Cholesterineffluxes unterscheidet.

Längere Inkubationszeiten sollten zeigen, ob sich die maximal mobilisierbare Cholesterinmasse von der durch HDL maximal mobilisierten Masse unterscheidet und wie sich die Kinetiken des Effluxes zueinander verhalten.

Abbildung 5.4 stellt die Abhängigkeit des Apo-A-I-induzierten Cholesterineffluxes von der Inkubationszeit dar.

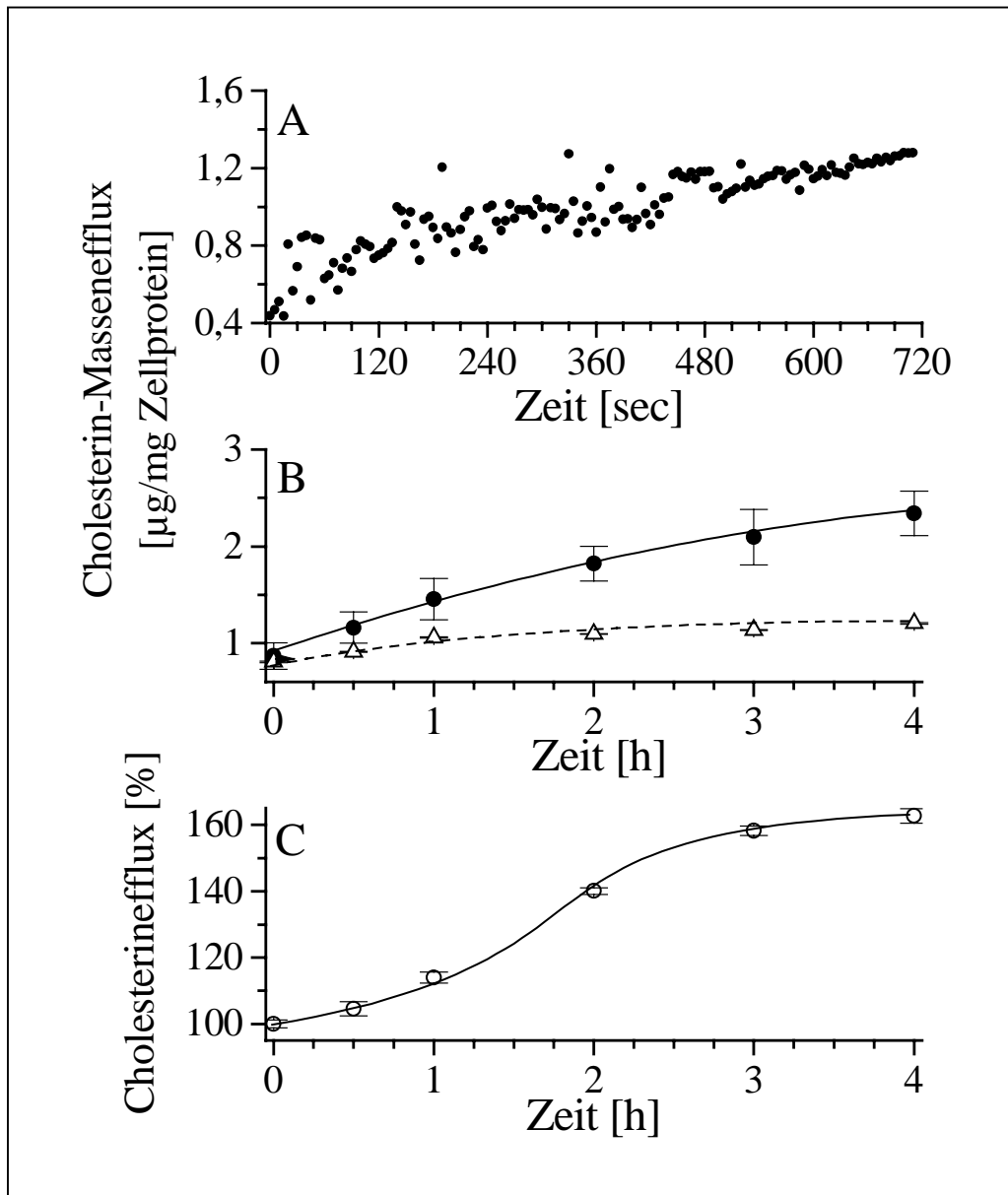


Abbildung 5.4: Apo-A-I-induzierter Cholesterinefflux in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

[A]: Apo-A-I-induzierter Cholesterin-Massenefflux bis 12 min. nach Apo-A-I-Zugabe ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) in Medium mit $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.7 beschrieben durchgeführt.

[B]: Apo-A-I-induzierter Cholesterin-Massenefflux (gefüllte Kreise) und Albumin-induzierter Cholesterin-Massenefflux (offene Dreiecke) bis 4 h nach Apo-A-I-Zugabe ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) in Medium mit $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[C]: Apo-A-I-induzierter Cholesterinefflux de-novo synthetisierten Cholesterins bis 4 h nach Apo-A-I-Zugabe ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) in Medium mit $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen in diesem Versuch dem Cholesterinefflux nach 4 h in Medium mit $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Albumin ohne Zugabe von Apo-A-I. Dies entspricht in diesem Versuch einem Wert von $4578,13 \pm 56,08 \text{ PSL}$.

Abbildung 5.4 A zeigt, daß der Apo-A-I-induzierte Cholesterin-Massenefflux im Gegensatz zum HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux sofort nach Zugabe des Apo-A-I über den Ausgangswert ansteigt. Der Efflux ist annähernd linear.

In Abbildung 5.4 B ist zu erkennen, daß der Apo-A-I-induzierte Cholesterin-Massenefflux zunächst stark ansteigt und nach drei bis vier Stunden ein Plateau erreicht. Der Albumin-induzierte Cholesterin-Massenefflux steigt nur sehr langsam linear an.

Vergleicht man Abbildung 5.4 A und B, sieht man, daß in Abbildung A bereits nach 10 Minuten der Cholesterinwert um fast 0,8 µg/mg Zellprotein angestiegen ist, während der Cholesterinwert in Abbildung B erst nach 2 h diesen Anstieg erreicht hat. Dieser Widerspruch ist durch die unterschiedlichen methodischen Ansätze zu erklären, in denen unterschiedliche Zellmassen (4,3 mg und 0,18 mg Zellprotein) mit unterschiedlichen Volumina Medium (150 ml und 1 ml) inkubiert wurden. Zusätzlich wird der Cholesteringehalt bei der einen Methode nur in einem kleinen Teil des Mediums bestimmt und anschließend auf das Gesamtvolumen hochgerechnet. Weiterhin sind die Ausgangswerte der einzelnen Versuche stark unterschiedlich, so daß sich unterschiedliche Konzentrationsgradienten von der Plasmamembran der Zellen zu den HDL im Medium bilden, die eine unterschiedliche Geschwindigkeit des Effluxes induzieren.

In Abbildung 5.4 C ist zu sehen, daß der Apo-A-I-induzierte Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins einen sehr ähnlichen Verlauf wie der Apo-A-I-induzierte Cholesterin-Massenefflux des Gesamtcholesterins in Abbildung 5.4 B aufweist. Auch hier steigt der Efflux in den ersten zwei Stunden zunächst sehr stark an und erreicht dann ein Plateau.

Ausgangswert (100%) ist der Efflux neusynthetisierten Cholesterins nach 4 Stunden in Medium mit 1 mg/ml Albumin ohne Zugabe von Apo-A-I.

5.3.2.2. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Konzentration

Der durch Apo-A-I induzierte Cholesterinefflux wurde in Abhängigkeit von der Konzentration der Apo-A-I im Medium untersucht.

Hierbei wurde sowohl die Mobilisierung neusynthetisierten Cholesterins, wie auch der Massenefflux des Gesamtcholesterins der Zellen untersucht.

Abbildung 5.5 zeigt die Apo-A-I-Konzentrationsabhängigkeit des Cholesterineffluxes aus humanen Kontrollfibroblasten.

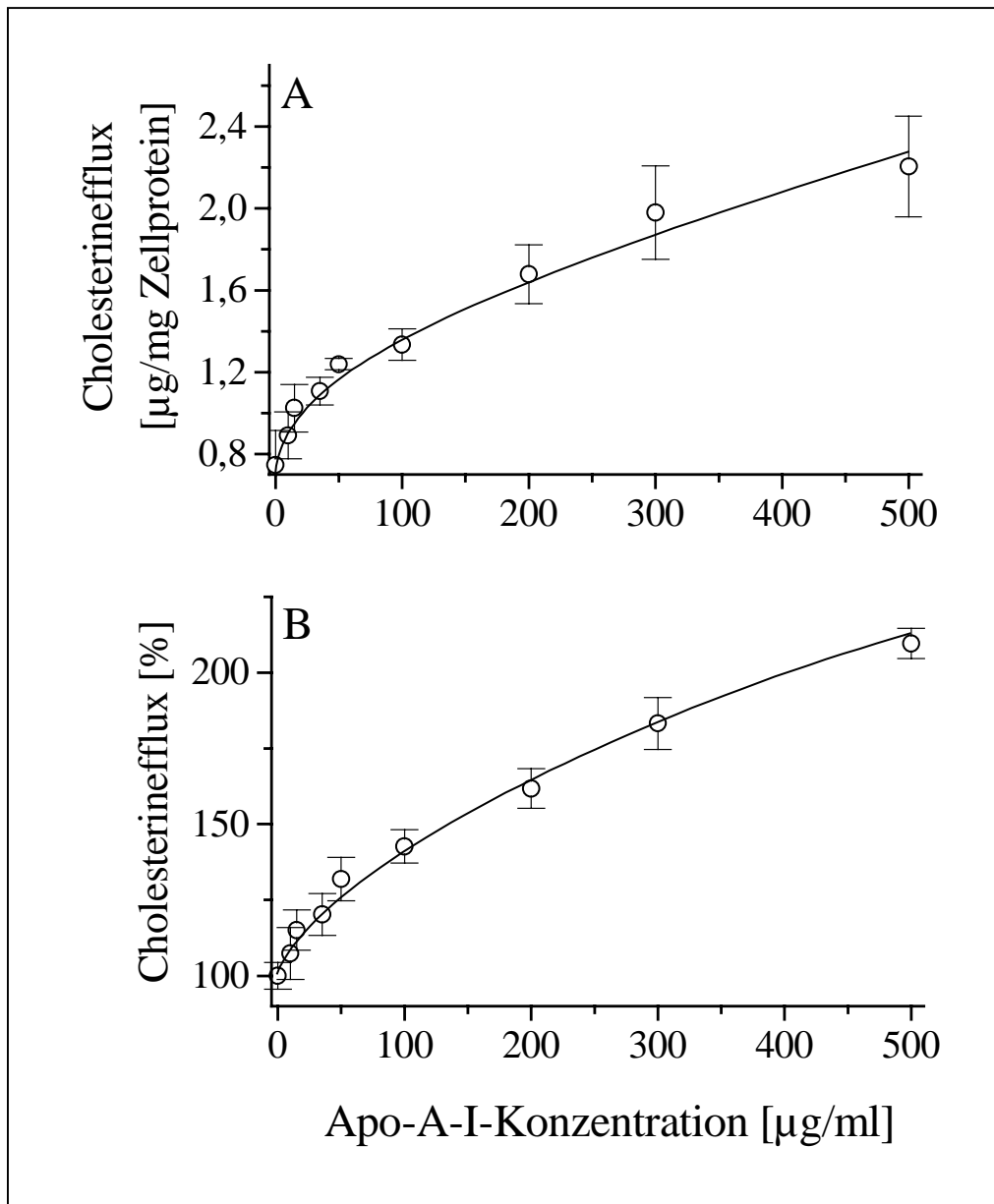


Abbildung 5.5: Abhängigkeit des Apo-A-I-induzierten Cholesterineffluxes von der Apo-A-I-Konzentration.

[A]: Massenefflux des Gesamtcholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[B]: Mobilisierung de novo synthetisierten Cholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen dem Efflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin nach 4 h ohne Zugabe von Apo-A-I, in diesem Experiment entspricht dies einem Wert von $4836,22 \pm 215,12$ PSL.

Abbildung 5.5 A zeigt, daß sich der Apo-A-I-induzierte Cholesterin-Massenefflux bei niedrigeren Konzentrationen bis ca. 20 µg/ml zunächst stark steigert (bis auf das 1,8-fache bei 50 µg/ml Apo-A-I) und ab Konzentrationen von ca. 50 µg/ml annähernd linear mit der Konzentration der zugesetzten Apo-A-I ansteigt (bis auf das 2,5-fache bei 500 µg/ml Apo-A-I).

In Abbildung 5.5 B kann man erkennen, daß auch der Apo-A-I-induzierte Efflux neusynthetisierten Cholesterins bei Konzentrationen bis ca. 50 µg/ml Apo-A-I zunächst stark ansteigt (bis auf das 1,3-fache), und ab Konzentrationen von ca. 50 µg/ml annähernd linear mit der Konzentration der zugesetzten Apo-A-I ansteigt (bis auf das 2-fache bei 500 µg/ml Apo-A-I).

5.3.3. Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterinefflux

Neben freiem Apo-A-I, können Apo-A-I auch als rekonstituierte Lipidvesikel eingesetzt werden. Hierbei nehmen die Apo-A-I-Partikel innerhalb des rekonstituierten Lipidvesikels annähernd die gleiche Konformation wie in nativen HDL ein. Allerdings haben auch die zur Herstellung der Proteoliposomen verwendeten Lipide einen eigenen Einfluß, der sich mit der Wirkung der Apo-A-I überschneiden könnte.

Die Synthese der Proteoliposomen erfolgte nach der Methode von Ana Jonas [175], mit der HDL-ähnliche, diskoidale Partikel erzeugt werden. Die durchschnittliche Größenverteilung liegt dabei bei $95,4 \pm 0,65$ Ångström [174]. Andere Experimente haben gezeigt, daß diese intakten Vesikel sowohl die Fähigkeit haben, Cholesterin aufzunehmen als auch über den Apo-A-I-Anteil an Rezeptoren zu binden [26, 325].

5.3.3.1. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Der durch Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterinefflux wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Dabei wurden zum einen sehr kurze Inkubationszeiten gewählt, zum anderen lange Inkubationszeiten bis maximal 4 h.

Abbildung 5.6 zeigt die Abhängigkeit des Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierten Cholesterineffluxes von der Inkubationszeit.

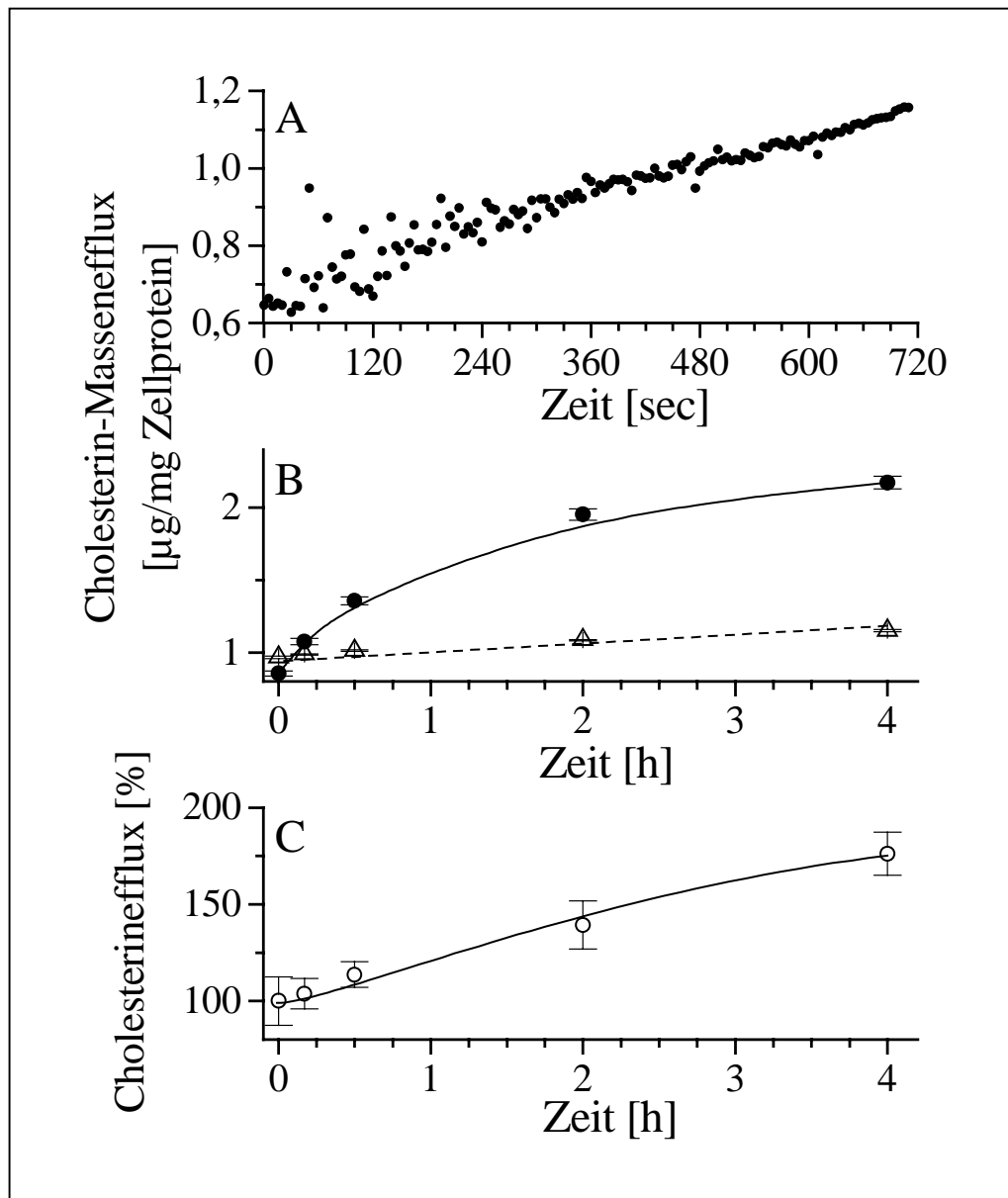


Abbildung 5.6: Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterinefflux aus humanen Hautfibroblasten in Abhängigkeit der Inkubationszeit. .

[A]: Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterin-Massenefflux bis 12 min. nach Apo-A-I-Proteoliposomen-Zugabe (20 µg/ml) in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.7 beschrieben durchgeführt.

[B]: Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterin-Massenefflux (gefüllte Kreise) und Albumin-induzierter Cholesterin-Massenefflux (offene Dreiecke) bis 4 h nach Apo-A-I-Proteoliposomen-Zugabe (20 µg/ml) in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[C]: Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterinefflux de-novo synthetisierten Cholesterins bis 4 h nach Apo-A-I-Proteoliposomen-Zugabe (20 µg/ml) in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen in diesem Versuch dem Cholesterinefflux nach 4 h in Medium mit 1 mg/ml Albumin ohne Zugabe von Apo-A-I-Proteoliposomen. Dies entspricht in diesem Versuch einem Wert von $3987,16 \pm 502,06$ PSL.

Abbildung 5.6 A zeigt, daß der Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Cholesterin-Massenefflux wie der Apo-A-I-induzierte Efflux (im Gegensatz zum HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux) sofort nach Zugabe der Apo-A-I-Proteoliposomen über den Nullwert steigt. Der Efflux ist näherungsweise linear.

In Abbildung 5.6 B ist zu erkennen, daß der Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Cholesterin-Massenefflux in den ersten zwei Stunden nach Zugabe der Proteoliposomen stark ansteigt und anschließend ein Plateau erreicht. Der Albumin-induzierte Cholesterin-Massenefflux steigt nur sehr langsam linear an.

Vergleicht man Abbildung 5.6 A und B, sieht man, daß in Abbildung A bereits nach 10 Minuten der Cholesterinwert um 0,4 µg/mg Zellprotein angestiegen ist, während der Cholesterinwert in Abbildung B erst nach ca. 0,5 Stunden um diesen Wert angestiegen ist. Die möglichen Gründe für diesen Widerspruch wurden bereits in Kapitel 5.3.2.1 erläutert.

In Abbildung 5.6 C ist zu sehen, daß der Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins einen sehr ähnlichen Verlauf wie der Apo-A-I-induzierte Cholesterinmassenefflux des Gesamtcholesterins in Abbildung 5.6 B aufweist. Auch hier steigt der Efflux in den ersten zwei Stunden zunächst stark an und erreicht dann ein Plateau. Ausgangswertwert (100%) ist der Efflux neusynthetisierten Cholesterins nach 4 Stunden in Medium mit 1 mg/ml Albumin ohne Zugabe von Apo-A-I-Proteoliposomen.

5.3.3.2. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Konzentration

Der durch Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterinefflux wurde in Abhängigkeit von der Konzentration der Apo-A-I-Proteoliposomen im Medium untersucht.

Hierbei wurde sowohl die Mobilisierung neusynthetisierten Cholesterins, als auch die Mobilisierung des Gesamtcholesterins der Zellen untersucht.

Abbildung 5.7 zeigt die Apo-A-I-Proteoliposomen-Konzentrationsabhängigkeit des Cholesterineffluxes aus humanen Kontrollfibroblasten.

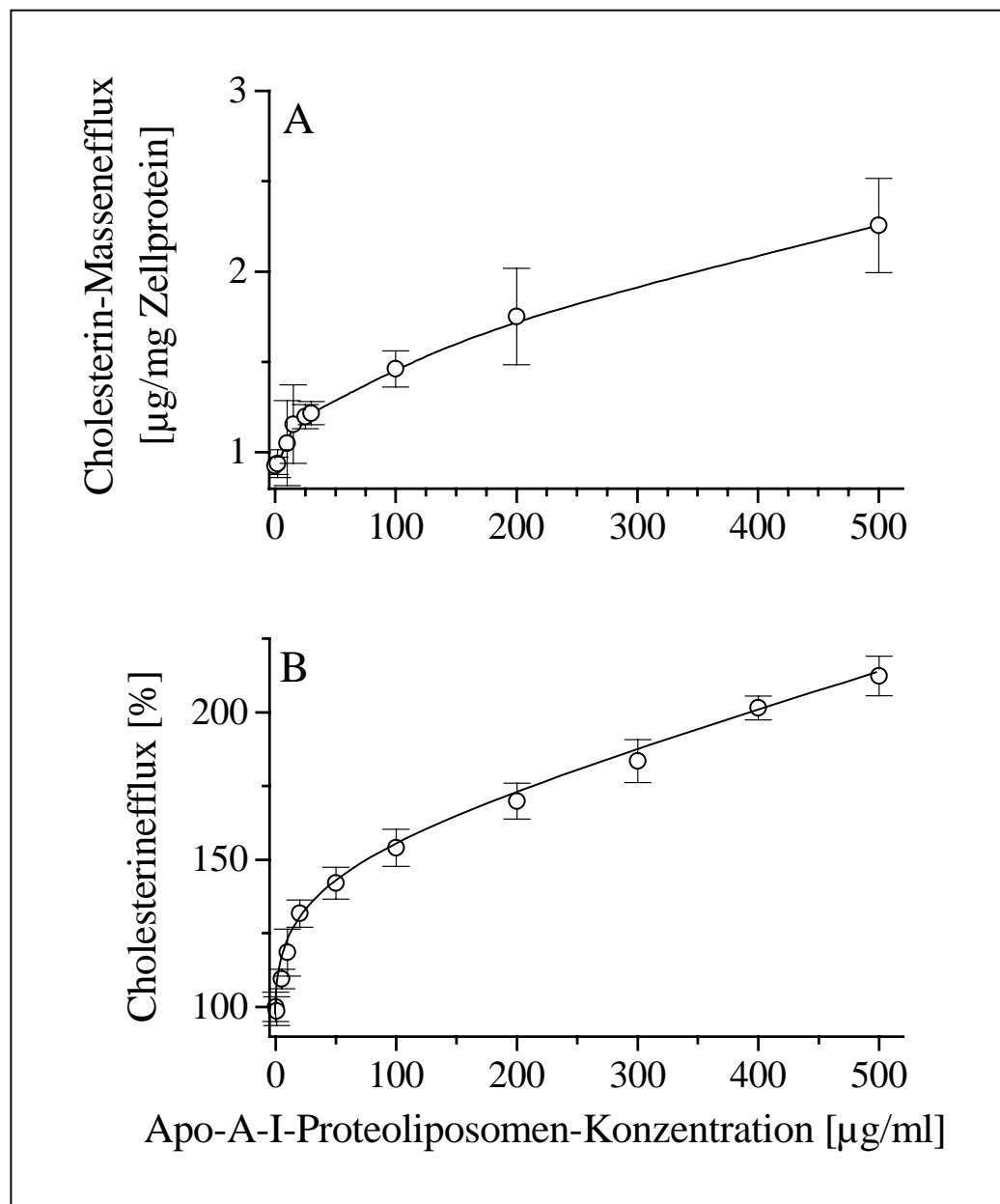


Abbildung 5.7: Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterinefflux in Abhängigkeit von der Apo-A-I-Proteoliposomen-Konzentration.

[A]: Massenefflux des Gesamtcholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[B]: Mobilisierung de novo synthetisierten Cholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen dem Efflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin nach 4 h ohne Zugabe von Apo-A-I-Proteoliposomen, in diesem Experiment entspricht dies einem Wert von $3422,89 \pm 178,81$ PSL.

Abbildung 5.7 A zeigt, daß der Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Cholesterin-Massenefflux bei niedrigeren Konzentrationen bis ca. 50 µg/ml zunächst stark ansteigt (bis auf das 1,5-fache) und in höheren Konzentrationen sich näherungsweise linear mit der Konzentration der zugesetzten Apo-A-I-Proteoliposomen erhöht (bis auf das 2,1-fache bei 500 µg/ml Apo-A-I-Proteoliposomen).

In Abbildung 5.7 B kann man erkennen, daß sich der Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Efflux neusynthetisierten Cholesterins ähnlich dem des Gesamtcholesterins verhält. Auch hier steigt der Efflux bei Konzentrationen bis ca. 50 µg/ml Apo-A-I-Proteoliposomen zunächst stark an (bis auf das 1,5-fache), und steigert sich anschließend annähernd linear mit der Konzentration der zugesetzten Apo-A-I-Proteoliposomen weiter (bis auf das 2,2-fache bei 500 µg/ml Apo-A-I-Proteoliposomen).

5.3.4. Cholesterinefflux: Vergleich von HDL, Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen

Zum besseren Vergleich der unterschiedlichen Wirkungen von HDL, freiem Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen werden in diesem Kapitel die Ergebnisse der Kapitel 5.3.1 bis 5.3.3 noch einmal direkt gegenübergestellt.

Abbildung 5.8 zeigt den Vergleich der Effluxkinetiken des durch HDL, Apo-A-I, und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterineffluxes. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Kapiteln 5.3.1.1, 5.3.2.1 und 5.3.3.1.

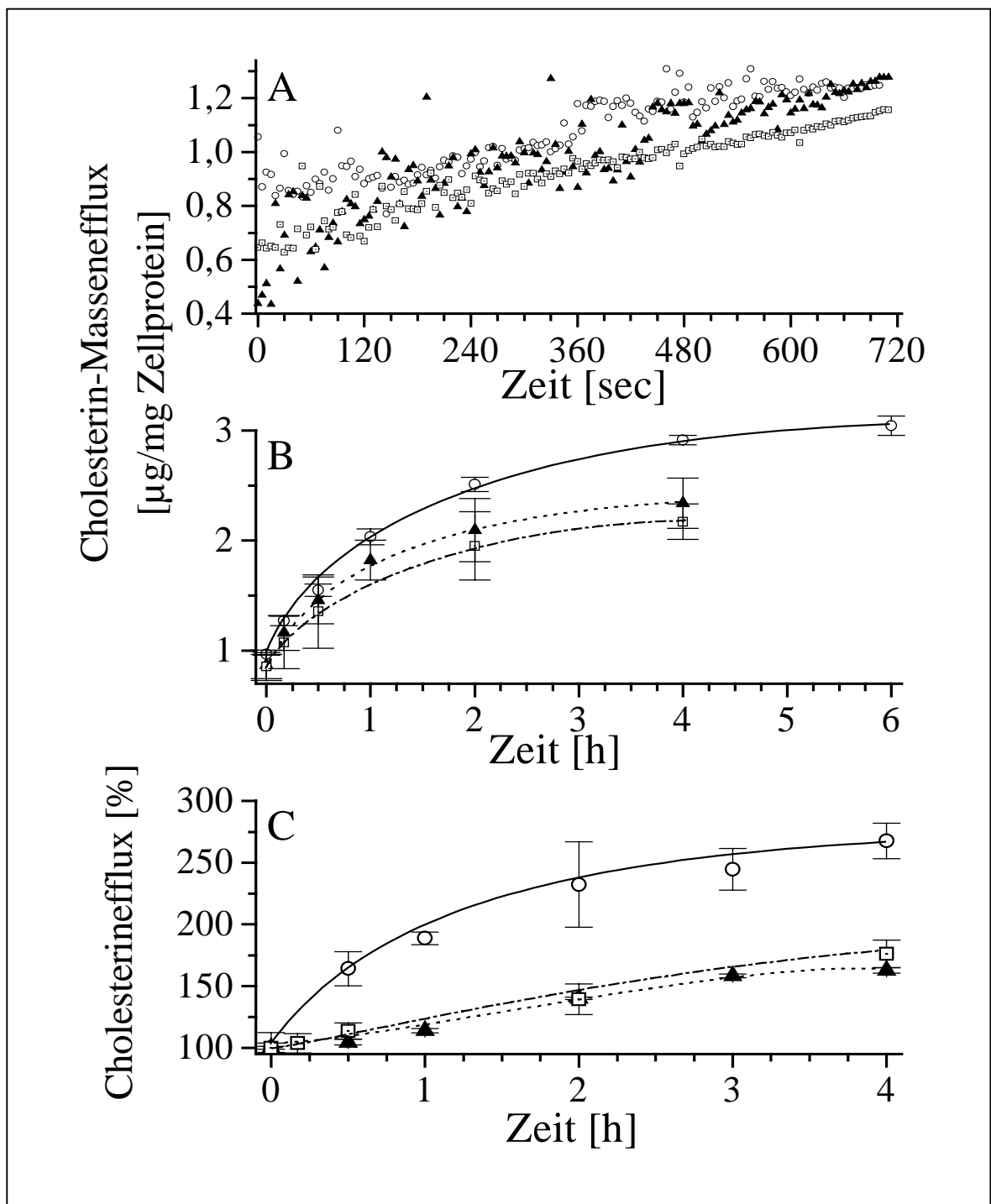


Abbildung 5.8: Vergleich der Effluxkinetiken des durch HDL, Apo-A-I, und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterineffluxes in Abhängigkeit der Inkubationszeit.

[A]: Durch HDL (offene Kreise), Apo-A-I (offene Quadrate) und Apo-A-I-Proteoliposomen (geschlossene Dreiecke) induzierter Cholesterin-Massenefflux aus humanen Hautfibroblasten bei Inkubationszeiten bis 12 min. nach Zugabe der Agonisten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.7 beschrieben durchgeführt.

[B]: Durch HDL (offene Kreise mit durchgängiger Linie), Apo-A-I (offene Quadrate mit gestrichelter Linie) und Apo-A-I-Proteoliposomen (geschlossene Dreiecke mit gepunkteter Linie) induzierter Cholesterin-Massenefflux aus humanen Hautfibroblasten bei Inkubationszeiten bis 4 bzw. 6 h nach Zugabe der Agonisten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[C]: Durch HDL (offene Kreise mit durchgängiger Linie), Apo-A-I (offene Quadrate mit gestrichelter Linie) und Apo-A-I-Proteoliposomen (geschlossene Dreiecke mit gepunkteter Linie) induzierter Efflux neusynthetisierten Cholesterins bei Inkubationszeiten bis 4 h nach Zugabe der Agonisten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen dem Cholesterinwert des Mediums mit 1 mg/ml Albumin nach 4 h Inkubation ohne Zugabe der Agonisten. Die Nullwerte (100 %) betragen: HDL: $3994,37 \pm 148,91$ PSL, Apo-A-I: $4578,13 \pm 56,08$ PSL und Apo-A-I-Proteoliposomen: $3987,16 \pm 502,06$ PSL.

Abbildung 5.8 A zeigt, daß der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux erst nach einigen Minuten einen Netto-Efflux aufweist, während der Apo-A-I- und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterinefflux sofort über den Nullwert steigt. Der durch HDL induzierte Cholesterin-Massenefflux steigert sich nur langsam, der durch Apo-A-I induzierte etwas stärker und der durch Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterin-Massenefflux am stärksten.

In Abbildung 5.8 B ist zu sehen, daß der Apo-A-I- und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterin-Massenefflux geringer ist als der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux. Weiterhin zeigt Abbildung 5.8 B, daß Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen insgesamt einen geringeren Cholesterin-Massenefflux als HDL induzieren.

In Abbildung 5.8 C ist zu erkennen, daß der Apo-A-I- und Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins nicht so stark ist, wie der HDL-induzierte.

Abbildung 5.9 zeigt den Vergleich der Effluxkinetiken des durch HDL, Apo-A-I, und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterineffluxes. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse der Konzentrationsabhängigkeit des Cholesterineffluxes aus den Kapiteln 5.3.1.2, 5.3.2.2 und 5.3.3.2.

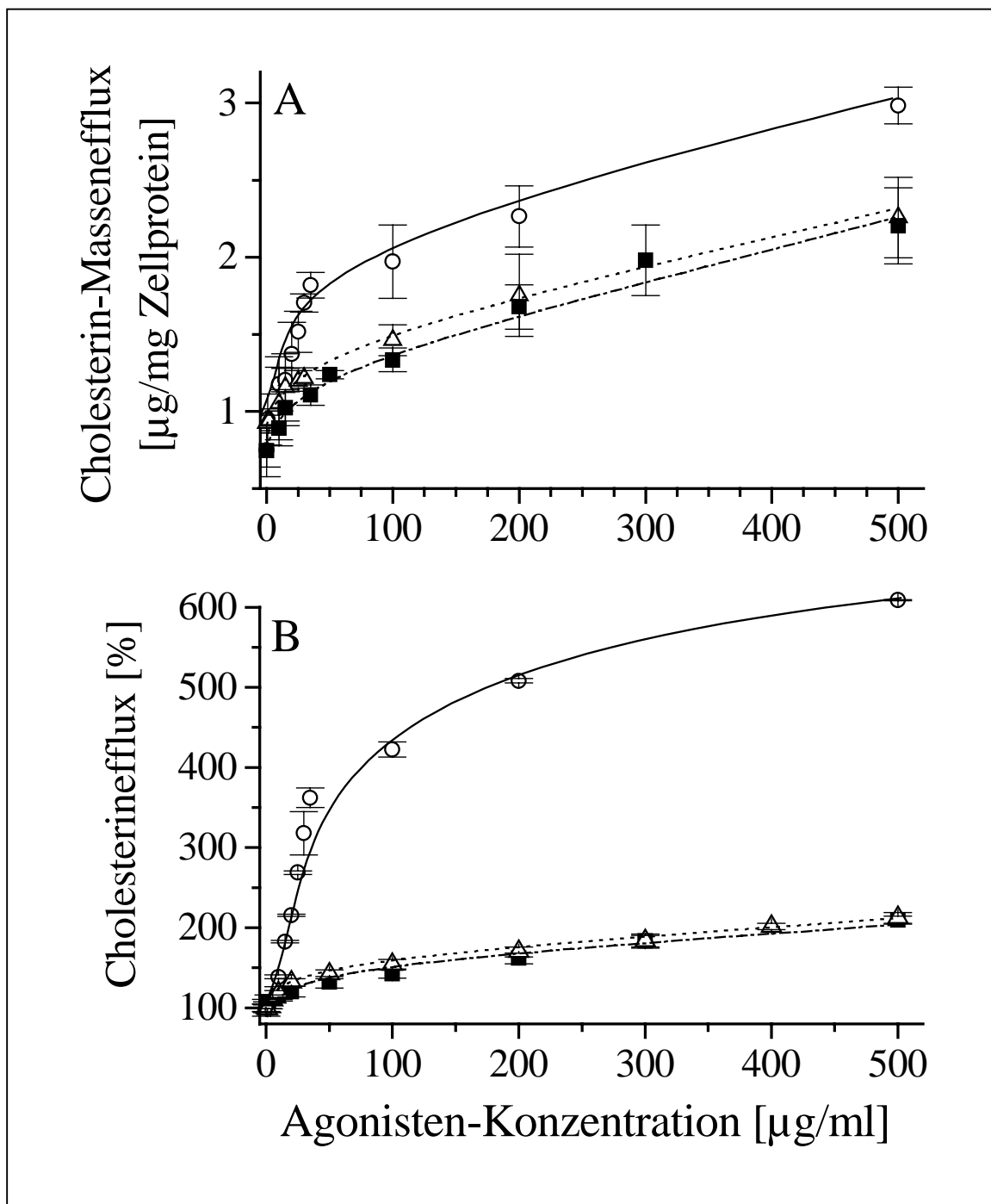


Abbildung 5.9: Vergleich der Effluxkinetiken des durch HDL, Apo-A-I, und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterineffluxes in Abhängigkeit der Konzentration der zugesetzten Agonisten.

[A]: Durch HDL (offene Kreise mit durchgängiger Linie), Apo-A-I (geschlossene Quadrate mit gestrichelter Linie) und Apo-A-I-Proteoliposomen (offene Dreiecke mit gepunkteter Linie) induzierter Cholesterin-Massenefflux aus humanen Hautfibroblasten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[B]: Durch HDL (offene Kreise mit durchgängiger Linie), Apo-A-I (geschlossene Quadrate mit gestrichelter Linie) und Apo-A-I-Proteoliposomen (offene Dreiecke mit gepunkteter Linie) induzierter Efflux neusynthetisierten Cholesterins aus humanen Hautfibroblasten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen dem Wert radioaktiven Cholesterins im Medium mit 1 mg/ml Albumin nach 4 h Inkubation ohne Zugabe der Agonisten. Die Nullwerte (100 %) betragen: HDL: $4943,95 \pm 502,30$ PSL, Apo-A-I: $4836,22 \pm 215,12$ PSL und Apo-A-I-Proteoliposomen: $3422,89 \pm 178,81$ PSL.

Abbildung 5.9 A zeigt, daß der durch alle drei Agonisten induzierte Cholesterin-Massenefflux zunächst bis Konzentrationen von etwa 30 bis 50 µg/ml sehr stark ansteigt, und sich danach

ab Konzentrationen von über 50 $\mu\text{g/ml}$ annähernd linear mit der Konzentration des jeweiligen Agonisten weiter steigert.

Es zeigt sich, daß HDL einen stärkeren Cholesterin-Massenefflux induzieren, als Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen. Der durch Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterinefflux weicht nicht signifikant voneinander ab.

Abbildung 5.9 B zeigt, daß die Mobilisierung neugebildeten Cholesterins durch HDL, Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen in allen drei Ansätzen ebenfalls zunächst bei niedrigeren Konzentrationen bis ca. 50 $\mu\text{g/ml}$ stärker ist, während es bei Konzentrationen ab ca. 50 $\mu\text{g/ml}$ zu einem weiteren, näherungsweise linearen Ansteigen des Effluxes neusynthetisierten Cholesterins mit der Konzentration des Agonisten kommt. Dabei fällt auf, daß der durch HDL induzierte Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins sehr viel stärker ist als der durch Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte. Weiterhin kann man anhand der Steigungen des linearen Teils der Effluxkinetiken erkennen, daß HDL auch in höheren Konzentrationen den Efflux neusynthetisierten Cholesterins noch sehr viel stärker induzieren als Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen.

5.4. Cholesterinefflux aus Tangierfibroblasten

Hautfibroblasten von Tangier-Patienten zeigen eine Störung des HDL- und Apo-A-I-vermittelten Cholesterineffluxes. Es wird vermutet, daß der gestörte Cholesterintransport mit der massiven Cholesterinspeicherung in Tangier-Zellen und auch mit der gestörten HDL-Bildung in Zusammenhang steht. Da die bisherigen Messungen jedoch ausschließlich mit radioaktivem Cholesterin durchgeführt wurden, sollte überprüft werden, ob und in welchem Ausmaß der Cholesterin-Massenefflux bei Tangier-Patienten auftritt.

5.4.1. HDL-induzierter Cholesterinefflux

5.4.1.1. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Der durch HDL induzierte Cholesterinefflux wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Dabei wurden wie bei der Untersuchung des Cholesterineffluxes von Kontrollzellen zum einen sehr kurze Inkubationszeiten gewählt, zum anderen lange Inkubationszeiten bis maximal 20 h.

Für diese beiden Ansätze mußten, wie bereits in Kapitel 5.3.1.1 dargestellt, unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt werden, die in den Kapiteln 4.2.4.7 und 4.2.4.5 beschrieben wurden. Die Kinetik des HDL-induzierten Cholesterineffluxes wurde ebenfalls durch die Mobilisierung *de-novo* synthetisierten Cholesterins in Abhängigkeit längerer Inkubationszeiten bis 4 h untersucht.

Abbildung 5.10 zeigt die Abhängigkeit des HDL-induzierten Cholesterineffluxes von der Inkubationszeit.

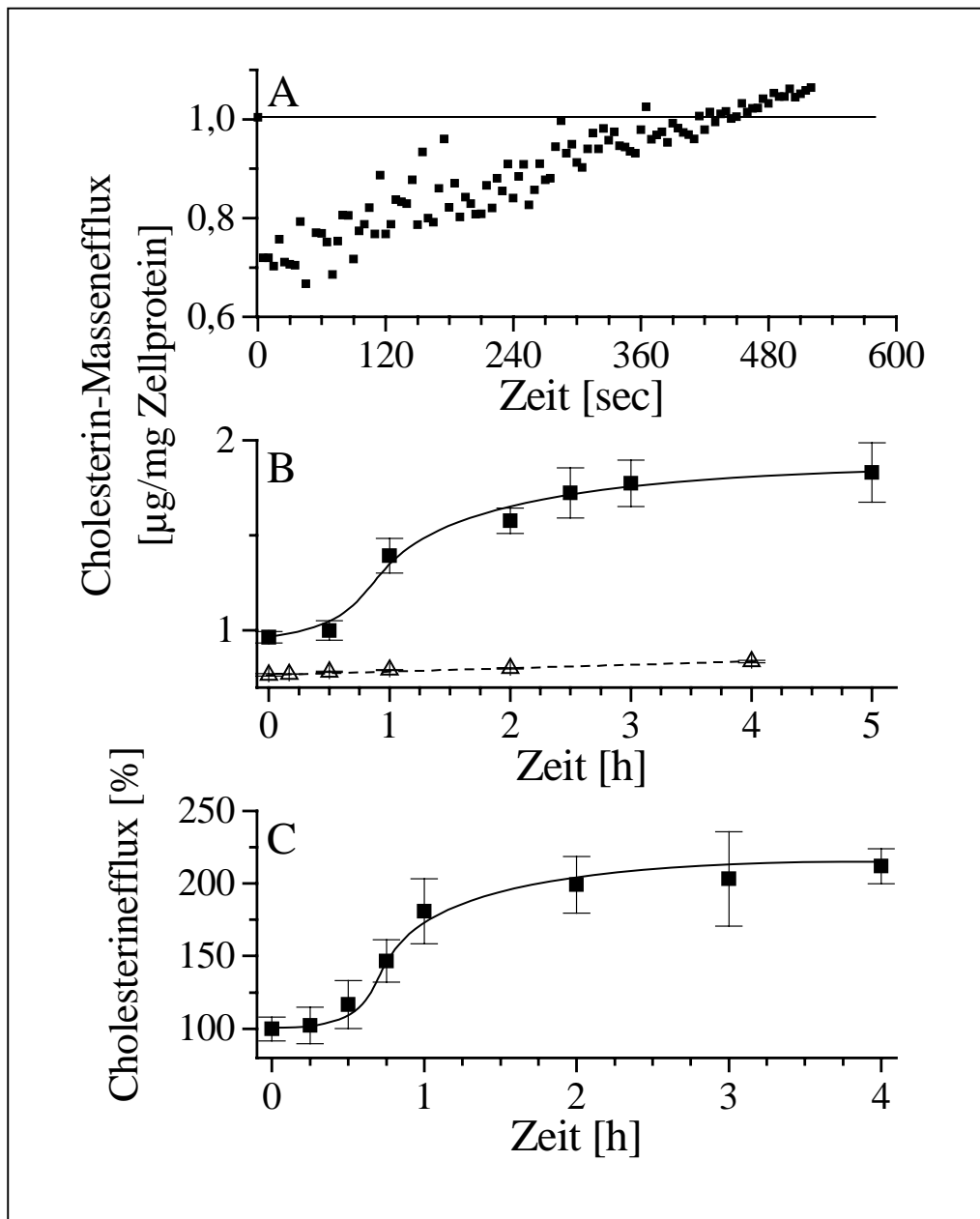


Abbildung 5.10: HDL-induzierter Cholesterinefflux aus Hautfibroblasten von Tangier-Patienten. Dargestellt ist die zeitabhängige Kinetik des Effluxes.

[A]: HDL-induzierter Cholesterin-Massenefflux bis 9 Minuten nach HDL-Zugabe ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) in Medium mit $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.7 beschrieben durchgeführt. Der HDL-Cholesterinwert wurde in der Darstellung bereits abgezogen.

[B]: HDL-induzierter Cholesterin-Massenefflux (gefüllte Quadrate) und Albumin-induzierter Cholesterin-Massenefflux (offene Dreiecke) bis 5 h nach HDL-Zugabe ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) in Medium mit $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[C]: HDL-induzierter Cholesterinefflux de-novo synthetisierten Cholesterins bis 4 h nach HDL-Zugabe ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) in Medium mit $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen in diesem Versuch dem Cholesterinefflux nach 4 h in Medium mit $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Albumin ohne Zugabe von HDL. Dies entspricht in diesem Versuch einem Wert von $4212,66 \pm 347,54 \text{ PSL}$.

In Abbildung 5.10 A erkennt man, daß der Cholesteringehalt im Medium in den ersten 30 Sekunden bis auf 70 % des Nullwertes, also dem Ausgangswert der Messungen, absinkt und

anschließend wieder kontinuierlich ansteigt. Erst nach circa 7 Minuten wird der Nullwert wieder erreicht.

Abbildung 5.10 B zeigt, daß der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux in den ersten 30 Minuten nur sehr schwach ansteigt. Im Zeitraum zwischen 30 Minuten und 2 Stunden Inkubation steigt er sehr stark an. Anschließend ist der Anstieg wieder geringer und erreicht nach ca. 6 Stunden ein Plateau.

Der Albumin-induzierte Cholesterin-Massenefflux steigt nur sehr langsam linear an. Ein Plateau konnte aufgrund des geringen Anstiegs nicht nachgewiesen werden. Als Nullwert für den HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux wurde das Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL ohne Inkubation mit Zellen gemessen. Der Nullwert des Albumin-induzierten Cholesterin-Masseneffluxes entspricht dem Cholesterinwert des Mediums mit 1 mg/ml Albumin.

In Abbildung 5.10 C ist zu sehen, daß der HDL-induzierte Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins einen sehr ähnlichen Verlauf wie der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux des Gesamtcholesterins in Abbildung 5.10 B aufweist. Hier steigt der Efflux in den ersten 15 bis 30 Minuten nur sehr schwach an, in den nächsten 45 Minuten sehr stark und erreicht danach ein Plateau. Ausgangswert (100%) ist der Efflux neusynthetisierten Cholesterins nach 4 Stunden in das Medium mit 1 mg/ml Albumin ohne Zugabe von HDL.

5.4.1.2. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Konzentration

Der durch HDL induzierte Cholesterin-Massenefflux wurde in Abhängigkeit von der Konzentration der HDL im Medium untersucht.

Hierbei wurde sowohl die Mobilisierung neusynthetisierten Cholesterins, wie auch die Mobilisierung des Gesamtcholesterins der Zellen untersucht.

Abbildung 5.11 zeigt die HDL-Konzentrationsabhängigkeit des Cholesterineffluxes aus Fibroblasten eines homozygoten Tangier-Patienten.

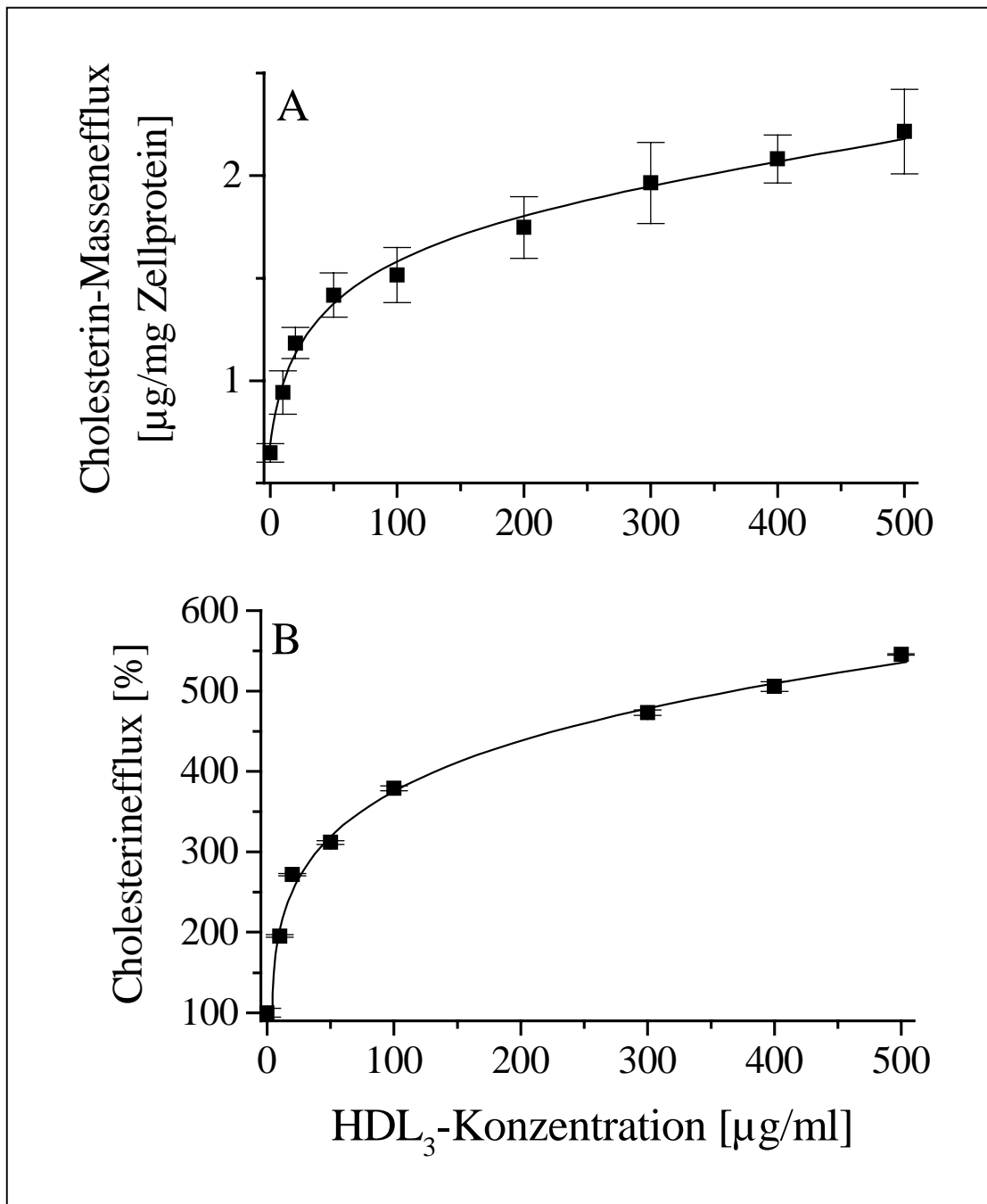


Abbildung 5.11: Cholesterinefflux von Hautfibroblasten eines Tangier-Patienten in Abhängigkeit der HDL₃-Konzentration.

[A]: Massenefflux des Gesamtcholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[B]: Mobilisierung de novo synthetisierten Cholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen dem Efflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin nach 4 h ohne Zugabe von HDL, in diesem Experiment entspricht dies einem Wert von $4905,11 \pm 275,25$ PSL.

Abbildung 5.11 A zeigt, daß der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux des Gesamtcholesterins bis zu einer Konzentration von etwa 50 µg/ml stark ansteigt (bis auf das 2,7-fache) und danach annähernd linear in Abhängigkeit der Akzeptorkonzentration langsam weiter ansteigt (bis auf das 4-fache bei 500 µg/ml HDL).

In Abbildung 5.11 B ist zu sehen, daß die Mobilisierung *de novo* synthetisierten Cholesterins ebenfalls bis zu einer Konzentration von etwa 50 µg/ml stark ansteigt (bis auf das 3-fache) und dann näherungsweise linear in Abhängigkeit der Konzentration langsam weiter ansteigt (bis auf das 5,2-fache bei 500 µg/ml HDL).

5.4.2. Apo-A-I-induzierter Cholesterinefflux

Im Plasma von Tangier-Patienten ist der Anteil von Apo-A-I auf 1-2% der Norm gesenkt. In diesem Kapitel wird der Einfluß von Apo-A-I im Hinblick auf den Cholesterinefflux bei Tangier-Patienten untersucht.

5.4.2.1. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Der durch Apo-A-I induzierte Cholesterinefflux bei Tangierzellen wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Dabei wurden zum einen sehr kurze Inkubationszeiten gewählt, zum anderen lange Inkubationszeiten bis maximal 5 h.

Abbildung 5.12 zeigt die Abhängigkeit des Apo-A-I-induzierten Cholesterineffluxes von der Inkubationszeit.

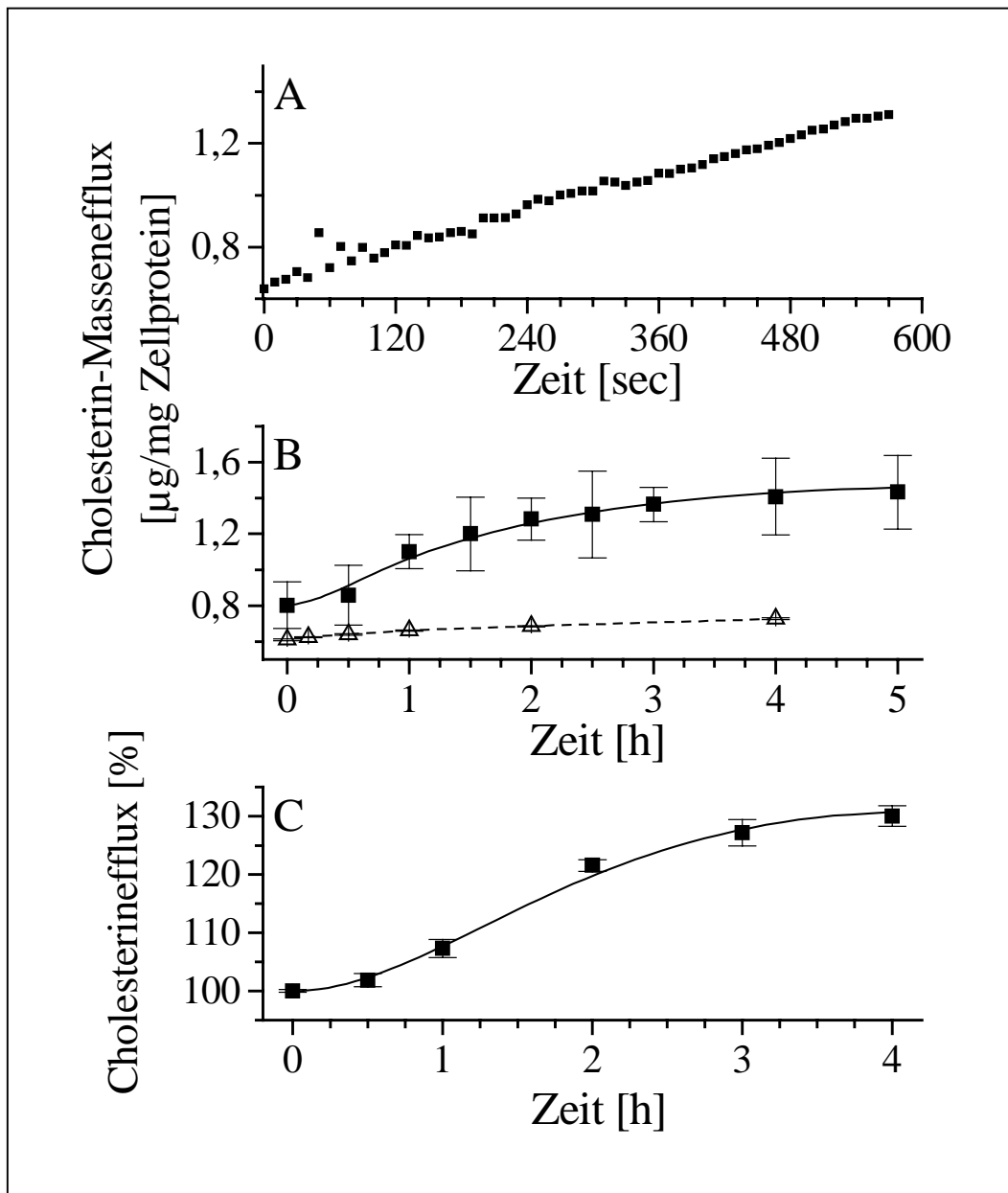


Abbildung 5.12: Apo-A-I-induzierter Cholesterinefflux bei Tangierfibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

[A]: Apo-A-I-induzierter Cholesterin-Massenefflux bis 9 Minuten nach Apo-A-I-Zugabe ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) in Medium mit $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.7 beschrieben durchgeführt.

[B]: Durch $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ Apo-A-I-induzierter Cholesterin-Massenefflux (gefüllte Quadrate) und Albumin-induzierter Cholesterin-Massenefflux (offene Dreiecke) in Medium mit $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[C]: Apo-A-I-induzierter Cholesterinefflux de-novo synthetisierten Cholesterins bis 4 h nach Apo-A-I-Zugabe ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) in Medium mit $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen in diesem Versuch dem Cholesterinefflux nach 4 h in Medium mit $1 \text{ mg}/\text{ml}$ Albumin ohne Zugabe von Apo-A-I. Dies entspricht in diesem Versuch einem Wert von $4987,22 \pm 11,30 \text{ PSL}$.

Abbildung 5.12 A zeigt, daß der Apo-A-I-induzierte Cholesterin-Massenefflux im Gegensatz zum HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux sofort nach Zugabe des Apo-A-I bereits über den Ausgangswert steigt. Der Efflux ist linear.

In Abbildung 5.12 B ist zu erkennen, daß der Apo-A-I-induzierte Cholesterin-Massenefflux in den ersten 30 Minuten nur langsam und in den nächsten 1,5 Stunden stark ansteigt. Nach zwei Stunden erreicht der Efflux ein Plateau. Der Albumin-induzierte Cholesterin-Massenefflux steigt nur sehr langsam linear an. Als Nullwert für den Apo-A-I-induzierten Cholesterin-Massenefflux wurde das Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml Apo-A-I ohne Inkubation mit Zellen gemessen. Der Nullwert des Albumin-induzierten Cholesterin-Masseneffluxes entspricht dem Cholesterinwert des Mediums mit 1 mg/ml Albumin. Vergleicht man die Abbildungen 5.12 A und B, sieht man, daß in Abbildung A bereits nach 9 Minuten der Cholesterinwert um 0,6 µg/mg Zellprotein angestiegen ist, während der Cholesterinwert in Abbildung B erst nach 2,5 h um diesen Wert angestiegen ist. Dieser Widerspruch wurde bereits in Kapitel 5.3.2.1 erklärt.

In Abbildung 5.12 C ist zu sehen, daß der Apo-A-I-induzierte Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins einen sehr ähnlichen Verlauf wie der Apo-A-I-induzierte Cholesterin-Massenefflux des Gesamtcholesterins in Abbildung 5.12 B aufweist. Auch hier steigt der Efflux in den ersten 30 Minuten zunächst langsam, in den nächsten zwei Stunden stark an und erreicht dann ein Plateau.

5.4.2.2. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Konzentration

Der durch Apo-A-I induzierte Cholesterinefflux bei Tangierfibroblasten wurde in Abhängigkeit von der Konzentration der Apo-A-I im Medium untersucht.

Hierbei wurde sowohl die Mobilisierung neusynthetisierten Cholesterins, wie auch der Massenefflux des Gesamtcholesterins der Zellen untersucht.

Abbildung 5.13 zeigt die Apo-A-I-Konzentrationsabhängigkeit des Cholesterineffluxes aus Fibroblasten von Tangier-Patienten.

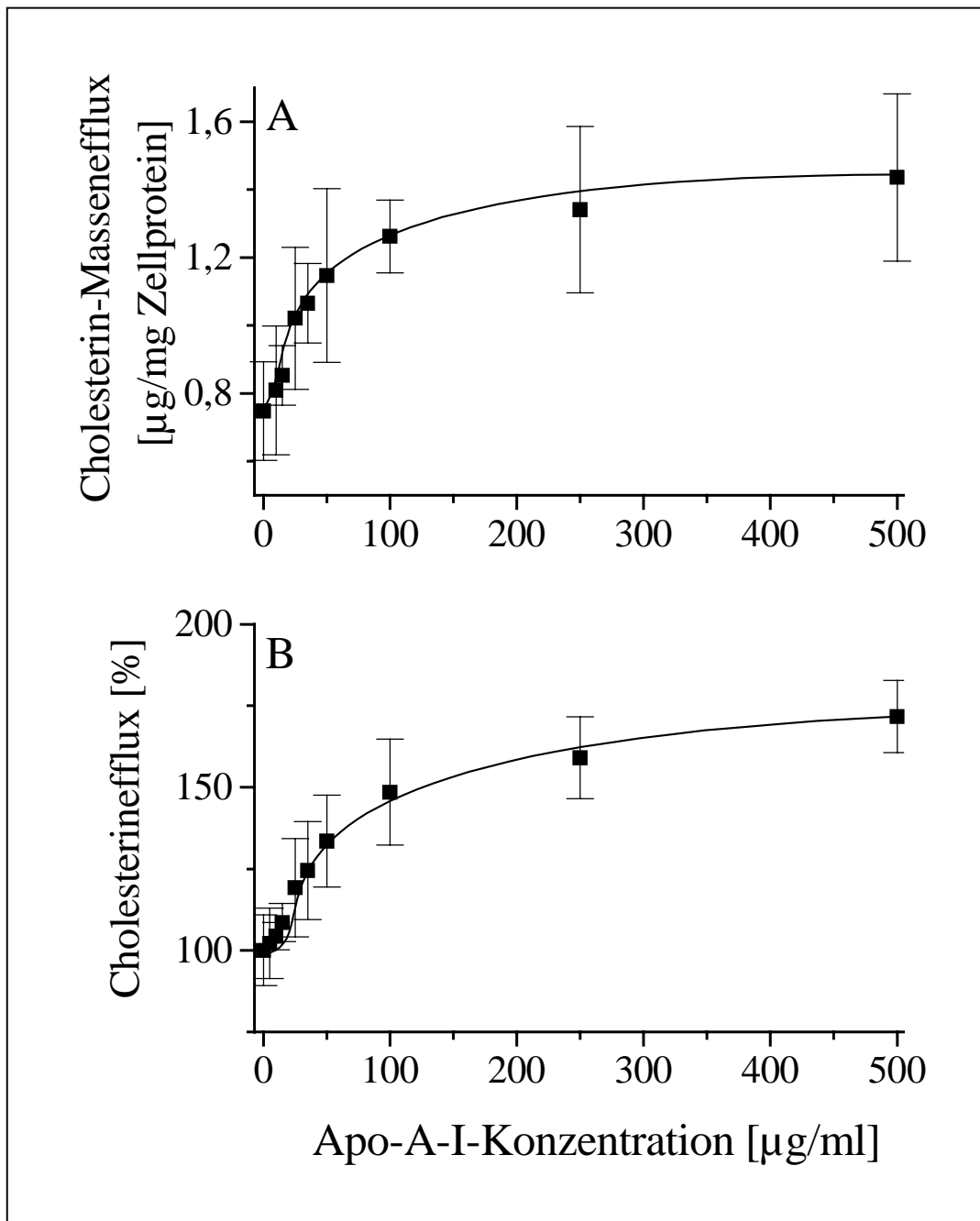


Abbildung 5.13: Abhängigkeit des Apo-A-I-induzierten Cholesterineffluxes von der Apo-A-I-Konzentration.
[A]: Massenefflux des Gesamtcholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.
[B]: Mobilisierung de novo synthetisierten Cholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen dem Efflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin nach 4 h ohne Zugabe von Apo-A-I, in diesem Experiment entspricht dies einem Wert von $3992,19 \pm 433,27$ PSL.

Abbildung 5.13 A zeigt, daß sich der Apo-A-I-induzierte Cholesterin-Massenefflux bei niedrigeren Konzentrationen bis ca. 50 µg/ml zunächst stark steigert (bis auf das 1,5-fache) und sich ab Konzentrationen von ca. 50 µg/ml annähernd linear zu der Konzentration der zugesetzten Apo-A-I weiter erhöht (bis auf das 1,9-fache bei 500µg/ml Apo-A-I).

In Abbildung 5.13 B kann man erkennen, daß auch der Apo-A-I-induzierte Efflux neusynthetisierten Cholesterins bei Konzentrationen bis ca. 50 µg/ml Apo-A-I zunächst stark ansteigt (bis auf das 1,3-fache), und sich ab Konzentrationen von ca. 50 µg/ml ebenfalls näherungsweise linear zu der Konzentration der zugesetzten Apo-A-I weiter steigert (bis auf das 1,6-fache bei 500 µg/ml Apo-A-I).

5.4.3. Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterinefflux

Wie schon in Kapitel 5.3.3 wird auch bei Fibroblasten von Tangier-Patienten der Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Cholesterinefflux untersucht.

5.4.3.1. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Der durch Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterinefflux bei Tangierfibroblasten wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Dabei wurden, wie in den vorhergehenden Experimenten, zum einen sehr kurze Inkubationszeiten gewählt, zum anderen lange Inkubationszeiten bis maximal 4 h.

Abbildung 5.14 zeigt die Abhängigkeit des Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierten Cholesterineffluxes von der Inkubationszeit.

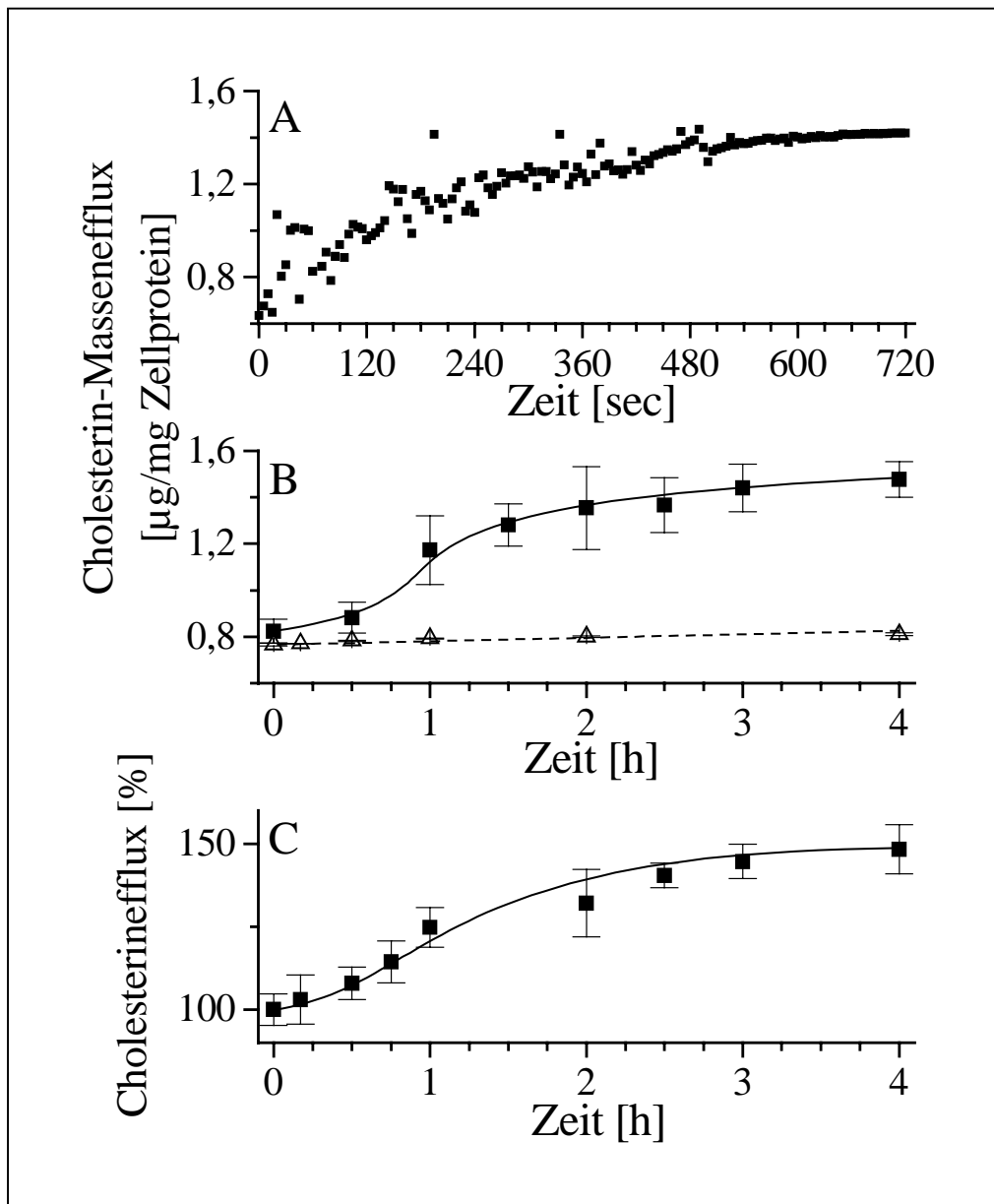


Abbildung 5.14: Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterinefflux aus Tangierfibroblasten in Abhängigkeit der Inkubationszeit.

[A]: Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterin-Massenefflux bis 12 min nach Apo-A-I-Proteoliposomen-Zugabe (20 µg/ml) in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.7 beschrieben durchgeführt.

[B]: Durch 20 µg/ml induzierter Apo-A-I-Proteoliposomen Cholesterin-Massenefflux (gefüllte Quadrate) und Albumin-induzierter Cholesterin-Massenefflux (offene Dreiecke) in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[C]: Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterinefflux de-novo synthetisierten Cholesterins bis 4 h nach Apo-A-I-Proteoliposomen-Zugabe (20 µg/ml) in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen in diesem Versuch dem Cholesterinefflux nach 4 h in Medium mit 1 mg/ml Albumin ohne Zugabe von Apo-A-I-Proteoliposomen. Dies entspricht in diesem Versuch einem Wert von $4401,61 \pm 208,46$ PSL.

Abbildung 5.14 A zeigt, daß der Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Cholesterin-Massenefflux genau wie der Apo-A-I-induzierte Efflux im Gegensatz zum HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux sofort nach Zugabe der Apo-A-I-Proteoliposomen über den Ausgangswert steigt. Der Efflux ist linear.

In Abbildung 5.14 B ist zu erkennen, daß der Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Cholesterin-Massenefflux zunächst sehr langsam ansteigt. Nach 30 Minuten steigert sich der Efflux stark und erreicht nach insgesamt zwei bis drei Stunden ein Plateau. Der Albumin-induzierte Cholesterin-Massenefflux steigt nur sehr langsam linear an. Als Ausgangswert für den Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierten Cholesterin-Massenefflux wurde das Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml Apo-A-I-Proteoliposomen ohne Inkubation mit Zellen gemessen. Der Nullwert des Albumin-induzierten Cholesterin-Masseneffluxes entspricht dem Cholesterinwert des Mediums mit 1 mg/ml Albumin.

In Abbildung 5.14 C ist zu sehen, daß der Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins einen sehr ähnlichen Verlauf wie der Apo-A-I-induzierte Cholesterinmassenefflux des Gesamtcholesterins in Abbildung 5.14 B aufweist. Auch hier steigt der Efflux in den ersten 15 Minuten zunächst sehr langsam, steigert sich in den nächsten 45 Minuten sehr stark und erreicht nach insgesamt ein bis zwei Stunden ein Plateau.

5.4.3.2. Cholesterinefflux: Abhängigkeit von der Konzentration

Der durch Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterinefflux wurde in Abhängigkeit von der Konzentration der Apo-A-I-Proteoliposomen im Medium untersucht.

Hierbei wurde sowohl die Mobilisierung neusynthetisierten Cholesterins, wie auch die Mobilisierung des Gesamtcholesterins der Zellen untersucht.

Abbildung 5.15 zeigt die Apo-A-I-Proteoliposomen-Konzentrationsabhängigkeit des Cholesterineffluxes aus humanen Kontrollfibroblasten.

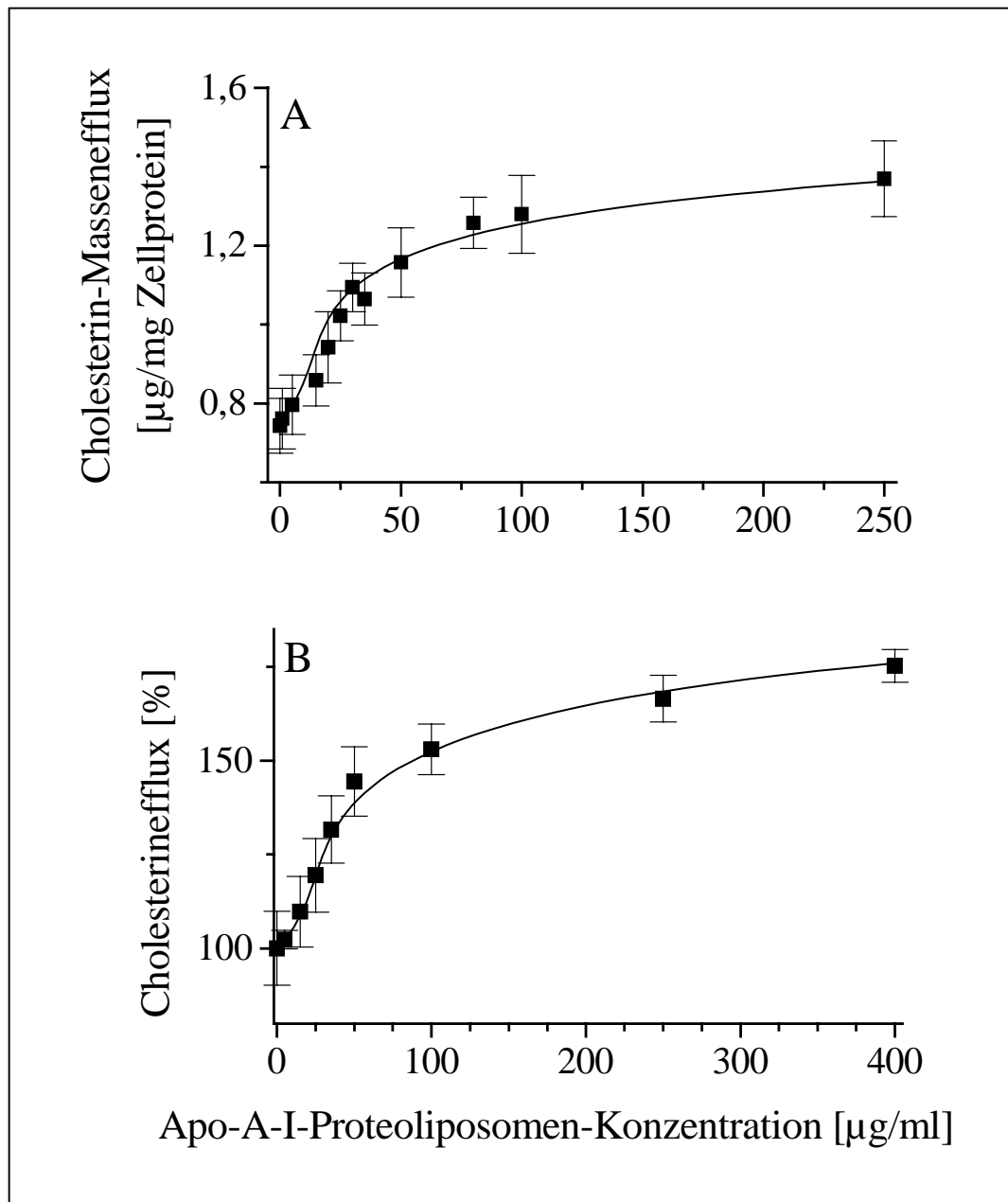


Abbildung 5.15: Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierter Cholesterinefflux bei Tangierfibroblasten in Abhängigkeit von der Apo-A-I-Proteoliposomen-Konzentration.

[A]: Massenefflux des Gesamtcholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin und unterschiedlichen Konzentrationen Apo-A-I-Proteoliposomen. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[B]: Mobilisierung radioaktiv markierten neusynthetisierten Cholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen dem Efflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin nach 4 h ohne Zugabe von Apo-A-I-Proteoliposomen, in diesem Experiment entspricht dies einem Wert von $4012,33 \pm 310,39$ PSL.

Abbildung 5.15 A zeigt, daß der Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Cholesterin-Massenefflux bei niedrigeren Konzentrationen bis ca. 50 µg/ml zunächst stark ansteigt (bis auf das 1,5-fache) und in höheren Konzentrationen ab ca. 50 µg/ml sich in etwa linear mit der Konzentration der zugesetzten Apo-A-I-Proteoliposomen erhöht (bis auf das 1,7-fache bei 250 µg/ml Apo-A-I-Proteoliposomen).

In Abbildung 5.15 B kann man erkennen, daß sich der Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Efflux neusynthetisierten Cholesterins ähnlich dem des Gesamtcholesterins verhält. Auch hier steigt der Efflux bei Konzentrationen bis ca. 50 µg/ml Apo-A-I-Proteoliposomen zunächst stark an (bis auf das 1,4-fache), und steigert sich anschließend annähernd linear mit der Konzentration der zugesetzten Apo-A-I-Proteoliposomen weiter (bis auf das 1,7-fache bei 400 µg/ml Apo-A-I-Proteoliposomen).

5.4.4. Cholesterinefflux bei Tangierfibroblasten: Vergleich von HDL, Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen

Zum besseren Vergleich der unterschiedlichen Wirkungen von HDL, freiem Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen werden in diesem Kapitel die Ergebnisse der Kapitel 5.4.1 bis 5.4.3 noch einmal direkt gegenübergestellt.

Abbildung 5.16 zeigt den Vergleich der Effluxkinetiken des durch HDL, Apo-A-I, und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterineffluxes. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Kapiteln 5.4.1.1, 5.4.2.1 und 5.4.3.1.

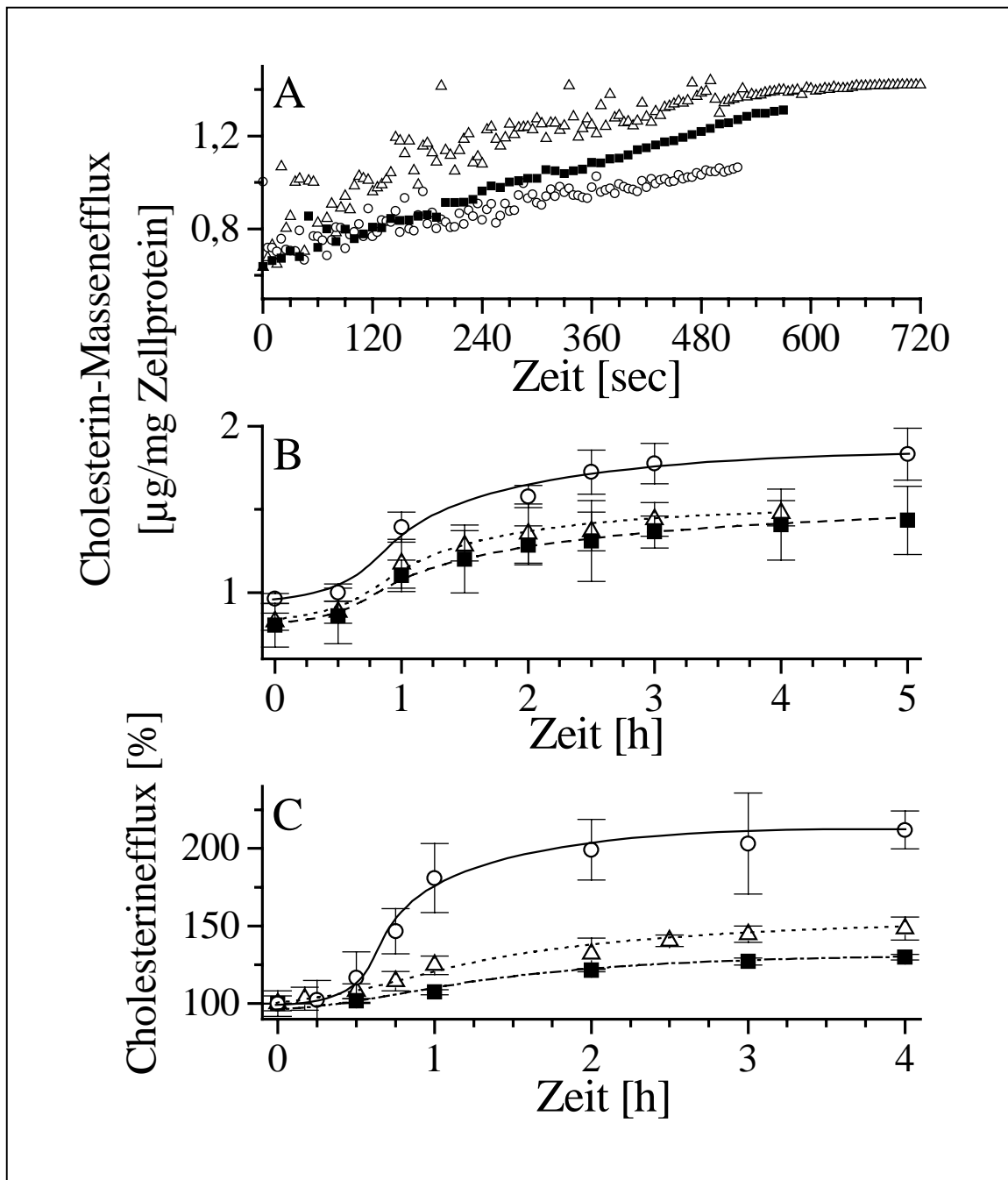


Abbildung 5.16: Vergleich der Effluxkinetiken des durch HDL, Apo-A-I, und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterineffluxes in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei Fibroblasten von Tangier-Patienten.

[A]: Durch HDL (offene Kreise), Apo-A-I (geschlossene Quadrate) und Apo-A-I-Proteoliposomen (offene Dreiecke) induzierter Cholesterin-Massenefflux aus Fibroblasten eines Tangier-Patienten bei Inkubationszeiten bis 12 min. nach Zugabe der Agonisten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.7 beschrieben durchgeführt.

[B]: Durch HDL (offene Kreise mit durchgängiger Linie), Apo-A-I (geschlossene Quadrate mit gestrichelter Linie) und Apo-A-I-Proteoliposomen (offene Dreiecke mit gepunkteter Linie) induzierter Cholesterin-Massenefflux aus Tangierfibroblasten bei Inkubationszeiten bis 4 bzw. 6 h nach Zugabe der Agonisten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[C]: Durch HDL (offene Kreise mit durchgängiger Linie), Apo-A-I (geschlossene Quadrate mit gestrichelter Linie) und Apo-A-I-Proteoliposomen (offene Dreiecke mit gepunkteter Linie) induzierter Efflux neusynthetisierten Cholesterins bei Inkubationszeiten bis 4 h nach Zugabe der Agonisten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen dem Cholesterinwert des Mediums mit 1 mg/ml Albumin nach 4 h Inkubation ohne Zugabe der Agonisten. Die Ausgangswerte (100 %) betragen: HDL: $4212,66 \pm 347,54$ PSL, Apo-A-I: $4987,22 \pm 11,30$ PSL und Apo-A-I-Proteoliposomen: $4401,61 \pm 208,46$ PSL.

Abbildung 5.16 A zeigt, daß der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux bei Tangierzellen erst nach einigen Minuten einen Netto-Efflux aufweist, während der Apo-A-I- und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterin-Massenefflux sofort über den Ausgangswert steigt. Der Anstieg des HDL-induzierten Cholesterin-Masseneffluxes ist wesentlich flacher als der Anstieg des durch Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterin-Masseneffluxes. Eine mögliche Erklärung könnte die bei dem Ansatz mit HDL höhere Ausgangskonzentration von Cholesterin im Medium sein. Dadurch ist, wie zuvor schon beschrieben das Konzentrationsgefälle für Cholesterin von der Plasmamembran zu Akzeptoren im Medium sehr viel kleiner, wodurch der Cholesterinefflux gehemmt wird.

In Abbildung 5.16 B ist zu sehen, daß der HDL-, der Apo-A-I- und der Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterin-Massenefflux einen sehr ähnlichen Verlauf zeigen.

In Abbildung 5.16 C ist zu erkennen, daß der Apo-A-I- und Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins geringer ist, als der durch HDL induzierte.

Abbildung 5.17 zeigt den Vergleich der Effluxkinetiken des durch HDL, Apo-A-I, und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterineffluxes bei Zellen eines Tangier-Patienten. Dargestellt sind die Ergebnisse der Konzentrationsabhängigkeit des Cholesterineffluxes aus den Kapiteln 5.4.1.2, 5.4.2.2 und 5.4.3.2.

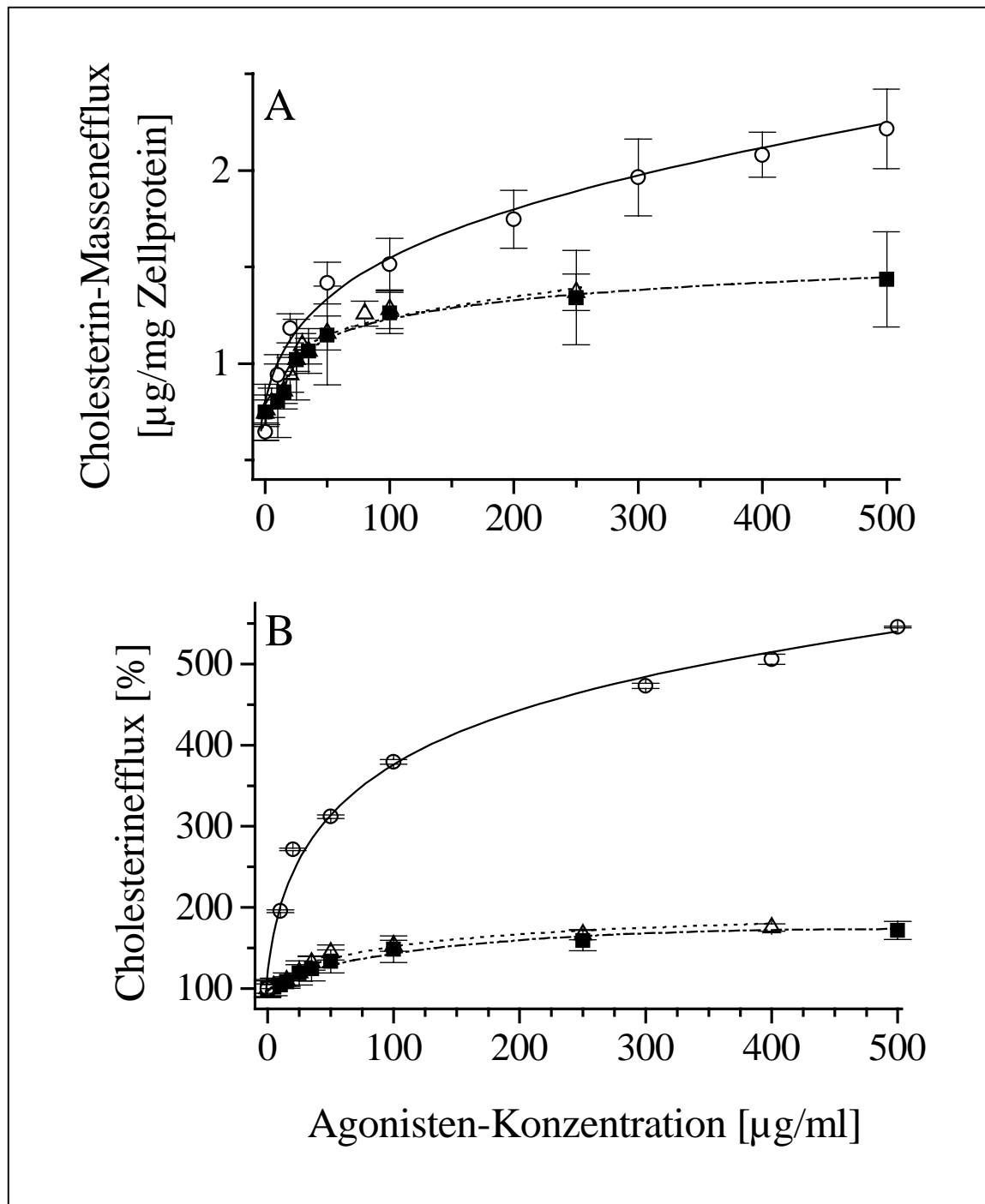


Abbildung 5.17: Vergleich der Effluxkinetiken des durch HDL, Apo-A-I, und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterineffluxes bei Tangierfibroblasten in Abhängigkeit der Konzentration der zugesetzten Agonisten.

[A]: Durch HDL (offene Kreise mit durchgängiger Linie), Apo-A-I (geschlossene Quadrate mit gestrichelter Linie) und Apo-A-I-Proteoliposomen (offene Dreiecke mit gepunkteter Linie) induzierter Cholesterin-Massenefflux aus Hautfibroblasten eines Tangier-Patienten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[B]: Durch HDL (offene Kreise mit durchgängiger Linie), Apo-A-I (geschlossene Quadrate mit gestrichelter Linie) und Apo-A-I-Proteoliposomen (offene Dreiecke mit gepunkteter Linie) induzierter Efflux neusynthetisierten Cholesterins aus Tangierfibroblasten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen dem Cholesterinwert des Mediums mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml Agonisten vor der Inkubation mit Zellen. Die Ausgangswerte (100 %) betragen: HDL: $4005,11 \pm 244,25$ PSL, Apo-A-I: $3992,19 \pm 433,27$ PSL und Apo-A-I-Proteoliposomen: $4012,33 \pm 310,39$ PSL.

Abbildung 5.17 A zeigt, daß der durch alle drei Agonisten induzierte Cholesterin-Massenefflux eine zweiphasige Kinetik aufweist: Zunächst steigt der Efflux bis Konzentrationen von etwa 50 µg/ml stark an, und steigert sich danach ab Konzentrationen von über 50 µg/ml nur noch annähernd linear mit der Konzentration des jeweiligen Agonisten. Es zeigt sich, daß HDL einen wesentlich stärkeren Cholesterin-Massenefflux induzieren als Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen. Die durch Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterineffluxkinetik weicht nicht signifikant voneinander ab.

Abbildung 5.17 B zeigt, daß auch die Mobilisierung neugebildeten Cholesterins durch HDL, Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen in allen drei Ansätzen eine zweiphasige Kinetik aufweist. Zunächst kommt es bei niedrigeren Konzentrationen bis ca. 50 µg/ml zu einem starken Efflux, während es bei Konzentrationen über 50 µg/ml zu einem weiteren, schwächeren linearen Ansteigen des Effluxes neusynthetisierten Cholesterins mit der Konzentration des Agonisten kommt. Der durch HDL induzierte Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins ist stärker, als der durch Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte.

Weiterhin kann man anhand der Steigungen des linearen Teils der Effluxkinetiken erkennen, daß HDL auch in höheren Konzentrationen den Efflux neusynthetisierten Cholesterins noch mit sehr viel stärkerer Affinität induzieren als Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen.

5.4.5. Cholesterinefflux: Vergleich von Tangierzellen und Kontrollzellen

Zum besseren Vergleich der unterschiedlichen Wirkungen von HDL, freiem Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen bei Tangier- und Kontrollzellen werden in diesem Kapitel die Ergebnisse der Kapitel 5.3.4 und 5.4.4 noch einmal direkt gegenübergestellt.

Abbildung 5.18 zeigt den Vergleich der Effluxkinetiken des durch HDL, Apo-A-I, und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterineffluxes bei Kontroll- und Tangierzellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit.

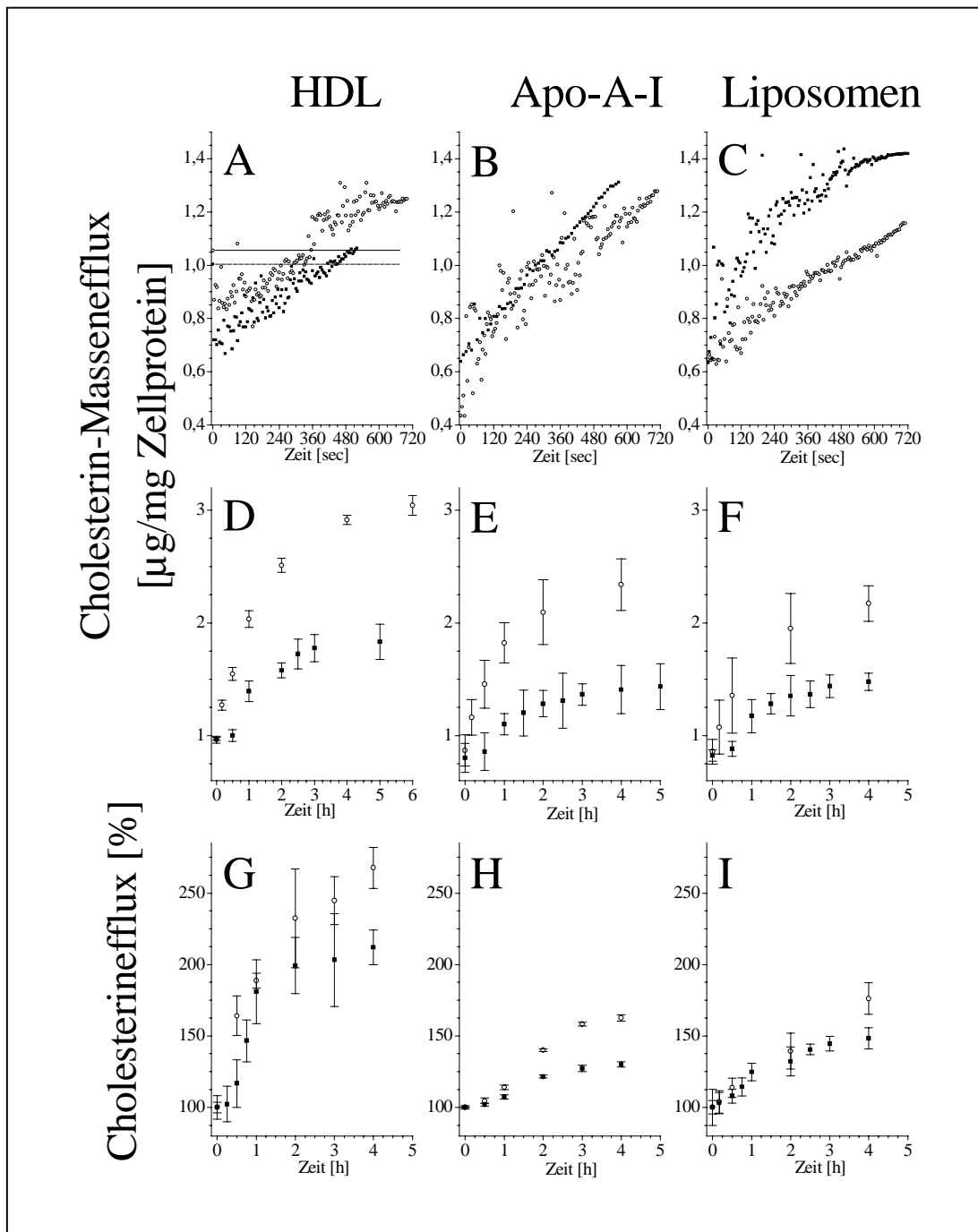


Abbildung 5.18: Vergleich der Effluxkinetiken des durch HDL, Apo-A-I, und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterineffluxes bei Fibroblasten von normolipidämischen und Tangier-Patienten.

[A], [B] und [C]: Durch HDL [A], Apo-A-I [B] und Apo-A-I-Proteoliposomen [C] induzierter Cholesterin-Massenefflux aus Kontrollfibroblasten (offene Kreise) und Tangierfibroblasten (geschlossene Quadrate) bei Inkubationszeiten bis 12 Minuten nach Zugabe der Agonisten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.7 beschrieben durchgeführt.

[D], [E] und [F]: Durch HDL [D], Apo-A-I [E] und Apo-A-I-Proteoliposomen [F] induzierter Cholesterin-Massenefflux aus Kontrollfibroblasten (offene Kreise) und Tangierfibroblasten (geschlossene Quadrate) bei Inkubationszeiten bis 4 bzw. 6 h nach Zugabe der Agonisten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[G], [H] und [I]: Durch HDL [G], Apo-A-I [H] und Apo-A-I-Proteoliposomen [I] induzierter Efflux radioaktiv markierten neusynthetisierten Cholesterins von Kontrollfibroblasten (offene Kreise) und Tangierfibroblasten (geschlossene Quadrate) bei Inkubationszeiten bis 4 h nach Zugabe der Agonisten in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. Die Ausgangswertewerte (100 %) betragen bei Kontrollzellen: HDL: $3994,37 \pm 148,91$ PSL, Apo-A-I: $4578,13 \pm 56,08$ PSL und Apo-A-I-Proteoliposomen: $3987,16 \pm 502,06$ PSL, bei Tangier-Zellen: HDL: $4212,66 \pm 347,54$ PSL, Apo-A-I: $4987,22 \pm 11,30$ PSL und Apo-A-I-Proteoliposomen: $4401,61 \pm 208,46$ PSL.

Abbildungen 5.18 A, B und C zeigen, daß der durch HDL, Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterin-Massenefflux in den ersten 12 Minuten nach Zugabe der Agonisten bei Kontrollfibroblasten und Tangierfibroblasten einen ähnlichen Verlauf ausweist. Der durch HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux zeigt sowohl bei Kontrollzellen, wie auch bei Tangierzellen erst nach einigen Minuten einen Netto-Efflux, während der Apo-A-I- und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterin-Massenefflux sofort über den Ausgangswertwert steigt. Der durch Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterin-Massenefflux ist bei Tangierzellen sogar etwas stärker, als bei Kontrollzellen. Ebenso ist der scheinbare Cholesterin-Influx in den ersten 30 Sekunden nach Zugabe der HDL bei Tangierzellen größer als bei Kontrollzellen.

In den Abbildungen 5.18 D, E und F ist zu sehen, daß der HDL-, Apo-A-I- und der Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterin-Massenefflux bei Kontroll- und Tangierzellen unterschiedlich ist. Es fällt auf, daß der Cholesterinefflux bei Tangierzellen, verglichen mit Kontrollzellen, mit einer zeitlicher Verzögerung von fast 30 Minuten beginnt und auch insgesamt etwa 30 bis 60 % geringer ist.

In den Abbildungen 5.18 G, H und I ist zu erkennen, daß der HDL-, Apo-A-I- und Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Efflux radioaktiv markierten neusynthetisierten Cholesterins eine ähnliche Kinetik aufweist wie der entsprechende Cholesterin-Massenefflux. Auch hier setzt der Cholesterinefflux bei Tangierzellen verzögert ein und ist insgesamt um etwa 15 bis 25 % geringer. Der Unterschied zwischen Kontrollzellen und Tangierzellen ist somit nicht so groß wie bei dem Cholesterin-Massenefflux.

Abbildung 5.19 zeigt den Vergleich der Effluxkinetiken des durch HDL, Apo-A-I, und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterineffluxes bei Zellen von Kontroll- und Tangier-Patienten. Dargestellt sind die Ergebnisse der Konzentrationsabhängigkeit des Cholesterineffluxes aus den Kapiteln 5.3.4 und 5.4.4.

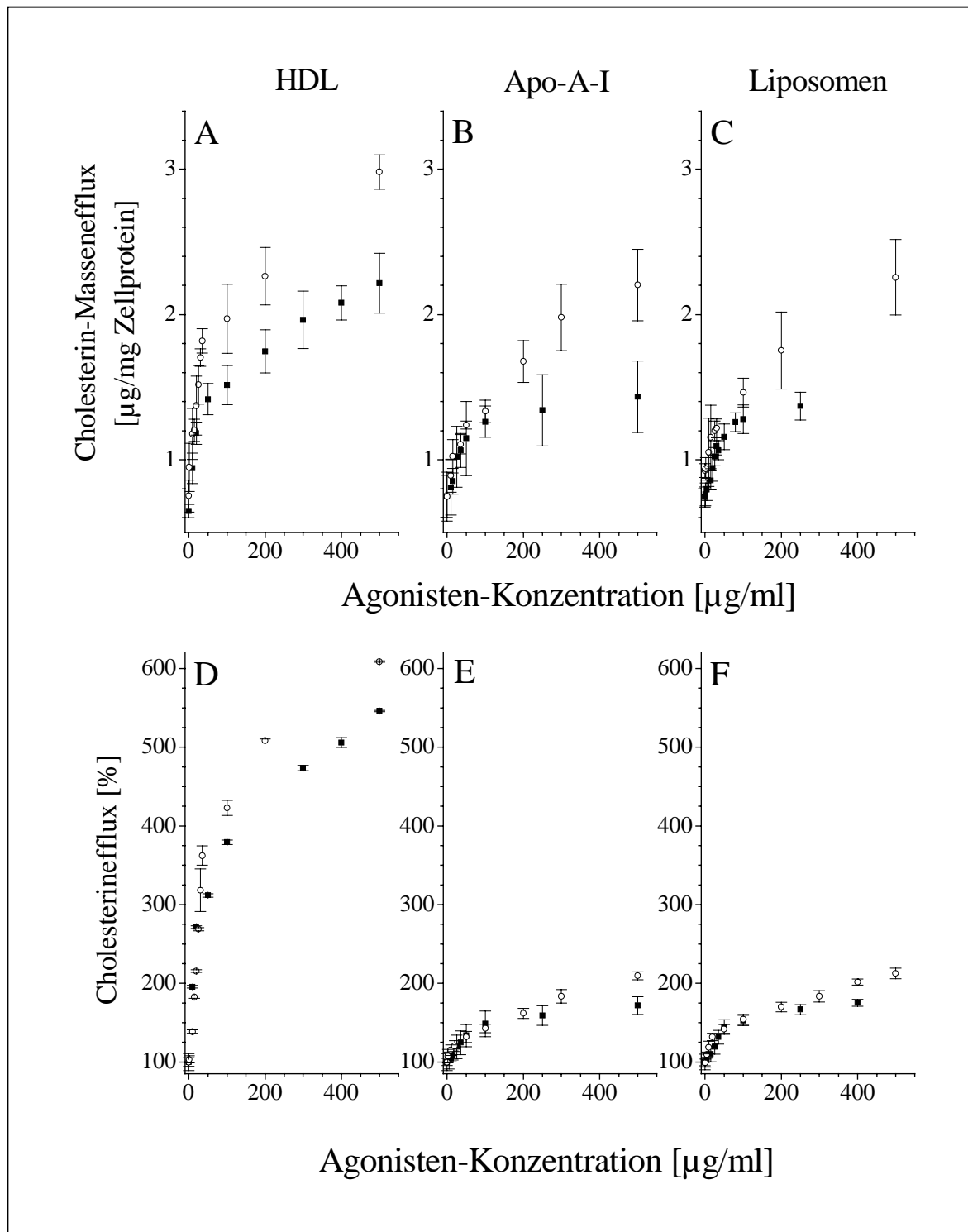


Abbildung 5.19: Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit des durch HDL, Apo-A-I, und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierten Cholesterineffluxes bei Kontroll- und Tangierfibroblasten.

[A], [B] und [C]: Durch HDL [A], Apo-A-I [B] und Apo-A-I-Proteoliposomen [C] induzierter Cholesterin-Massenefflux aus Kontrollfibroblasten [offene Kreise] und Tangierfibroblasten [geschlossene Quadrate] in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt.

[D], [E] und [F]: Durch HDL [D], Apo-A-I [E] und Apo-A-I-Proteoliposomen [F] induzierter Efflux radioaktiv markierten, neusynthetisierten Cholesterins aus Hautfibroblasten von normalipidämischen (offene Kreise) und Tangier-Patienten (geschlossene Quadrate) in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. 100% entsprechen dem Cholesterinwert des Mediums mit 1 mg/ml Albumin und 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Agonisten vor der Inkubation mit Zellen. Die Ausgangswerte (100 %) betragen: Kontrollzellen: HDL: $4943,95 \pm 502,30$ PSL, Apo-A-I: $4836,22 \pm 215,12$ PSL und Apo-A-I-Proteoliposomen: $3422,89 \pm 178,81$ PSL. Tangier-Zellen: HDL: $4005,11 \pm 244,25$ PSL, Apo-A-I: $3992,19 \pm 433,27$ PSL und Apo-A-I-Proteoliposomen: $4012,33 \pm 310,39$ PSL.

Abbildungen 5.19 A, B und C zeigen, daß der durch HDL, Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen induzierte Cholesterin-Massenefflux bei Tangierzellen geringer ist, als bei Kontrollzellen.

Die Abbildungen 5.19 D, E und F zeigen, daß sich auch die Mobilisierung neugebildeten Cholesterins durch HDL, Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen bei Kontrollzellen und Tangierzellen ähnlich wie der Cholesterin-Massenefflux verhält.

Der HDL-, Apo-A-I- und Apo-A-I-Proteoliposomen-induzierte Efflux bei Tangierzellen ist verglichen mit Kontrollzellen zu höheren Konzentrationen hin verschoben und der maximale Efflux geringer. Weiterhin kann man anhand der Steigungen des linearen Teils der Effluxkinetiken erkennen, daß HDL auch in höheren Konzentrationen den Efflux neusynthetisierten Cholesterins sowohl bei Kontrollzellen als auch bei Tangierzellen noch mit stärkerer Affinität induzieren, als Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen.

5.5. Cholesterin-Massenefflux: HDL-induzierte Signaltransduktionswege

Über die Existenz spezifischer Cholesterineffluxmechanismen ist in der Literatur mehrfach berichtet worden [150, 185, 198, 225, 249, 252, 293]. Der Signaltransduktionsweg, der durch HDL ausgelöst wird und zu Cholesterinefflux aus Zellen in das umgebende Medium führt, ist jedoch nur ansatzweise verstanden. Es wurde beschrieben, daß an diesem Signaltransduktionsweg eine Proteinkinase C beteiligt sei [224, 240, 313]. In unserer Arbeitsgruppe war in Voruntersuchungen gezeigt worden, daß HDL drei verschiedene Phospholipasen aktiviert: Die Phosphatidylinositol (PI)-spezifische Phospholipase C, sowie die Phosphatidylcholin (PC)-spezifischen Phospholipasen C und D. Hierdurch kommt es zu einer Bildung von Diacylglycerol, welches ein Aktivator der Proteinkinase C ist. Auch die bei der PC-Hydrolyse entstehende Phosphatidsäure (PA) ist an spezifischen Cholesterineffluxmechanismen beteiligt. Weitere Schritte in diesem Stoffwechselweg sind jedoch noch nicht bekannt. Die in diesem Kapitel aufgeführten Versuche sollen weitere daran beteiligte Faktoren aufzeigen.

5.5.1. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung der Proteinkinase C

Die Beteiligung der PKC an den durch HDL ausgelösten Signaltransduktionsprozessen wurde mit Hilfe radioaktiver Cholesterinvorstufen gezeigt. Daher wurde der Einfluß des Proteinkinase C-Inhibitors RO 31-8220 und des Proteinkinase C-Aktivators Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) auf den Cholesterin-Massenefflux untersucht.

Abbildung 5.20 zeigt die Strukturformeln von RO 31-8220 und PMA:

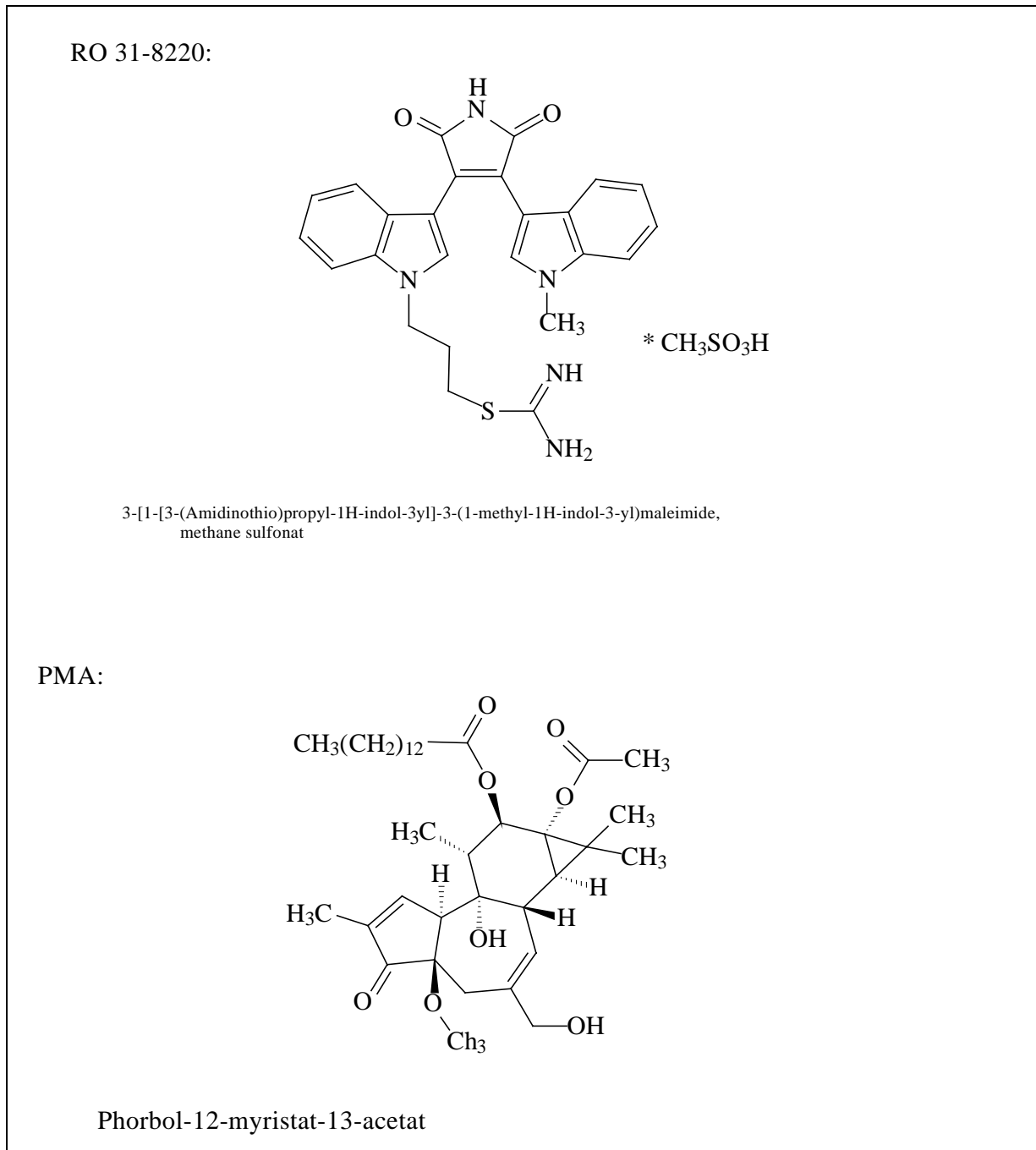


Abbildung 5.20: Strukturformeln von RO 31-8220 und PMA.

In Abbildung 5.21 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt.

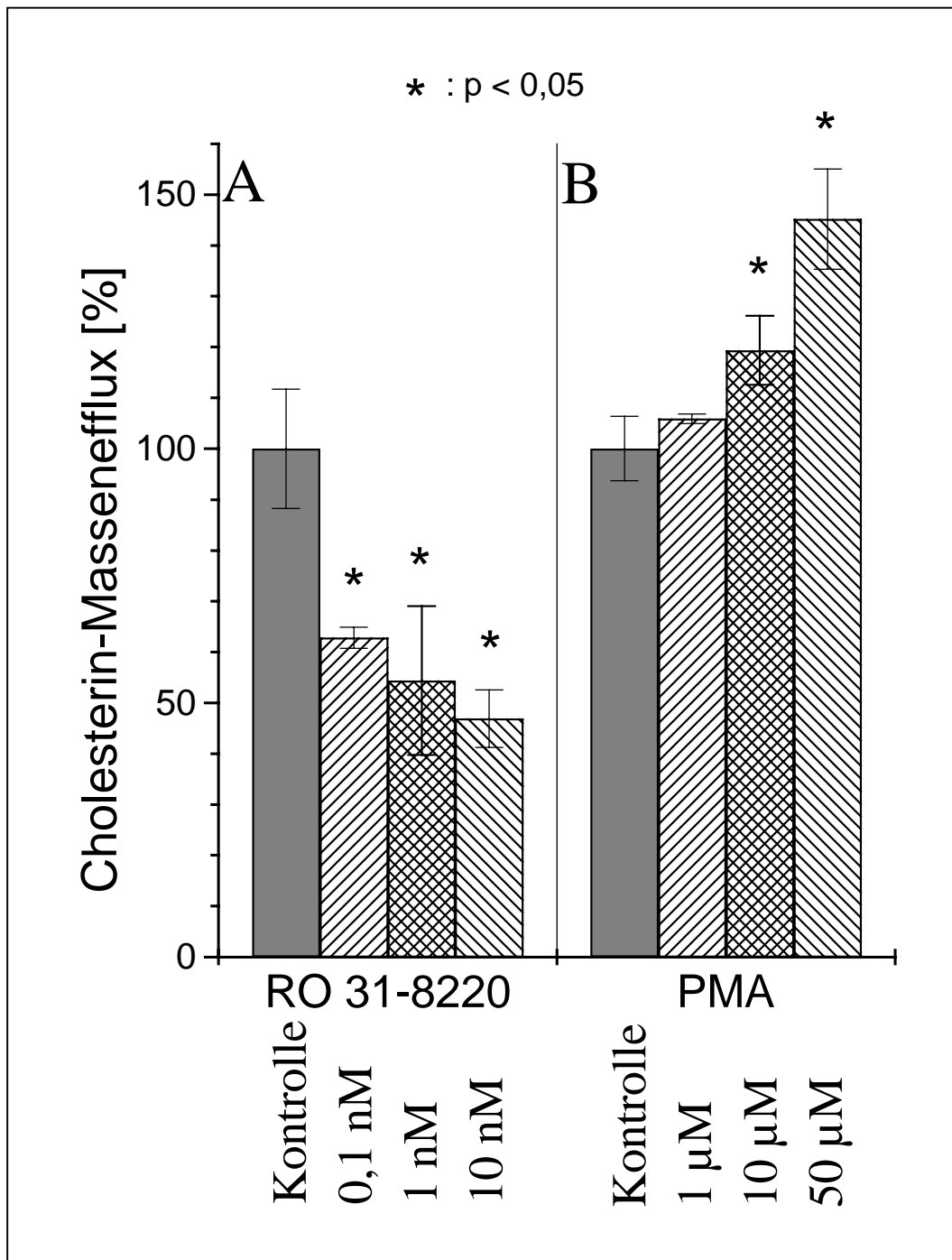


Abbildung 5.21: Cholesterin-Massenefflux in Abhängigkeit Proteinkinase C.

[A]: Inhibition der PKC durch RO 31-8220. Dargestellt ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin nach 2-stündiger Inkubation mit jeweils 20 µg/ml HDL. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt. Direkt vor der Zugabe der HDL wurde RO 31-8220 in den unter den Säulen jeweils angegebenen Konzentrationen von 0,1, 1 und 10 nM zu den Ansätzen hinzugegeben. 100% entsprechen dem HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux nach 2 h in Medium mit 1 mg/ml Albumin ohne Zugabe des Inhibitors. In diesem Versuch entspricht dies $0,9 \pm 0,11$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein. Bei diesem Wert wurde das im HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen.

[B]: Aktivierung der PKC durch PMA. Dargestellt ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin nach 1,5-stündiger Inkubation mit jeweils 20 µg/ml HDL. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt. 15 Minuten vor der Zugabe der HDL wurde PMA in den unter den Säulen jeweils angegebenen Konzentrationen von 2, 4 und 6 µM zu den Ansätzen hinzugegeben. 100% entsprechen dem HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux nach 1,5 h in Medium mit 1 mg/ml Albumin ohne Zugabe des Inhibitors. In diesem Versuch entspricht dies $1,1 \pm 0,07$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein. Bei diesem Wert wurde das im HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen.

Die mit * gekennzeichneten Werten zeigen eine signifikante Abweichung von $p < 0,05$ vom jeweiligen Ausgangswert (100 %).

Man erkennt in Abbildung 5.21 A, daß bereits 0,1 nM RO 31-8220 den Cholesterin-Massenefflux signifikant um ca. 35 % hemmen. Bei einer Hemmung mit 10 nM RO 31-8220 fällt der Cholesterin-Massenefflux auf ca. 45 % des Ausgangswertes ab.

In Abbildung 5.21 B werden die Ergebnisse eines typischen Versuchs zur Aktivierung der PKC mittels PMA dargestellt. Dazu wurden die Zellen vor der Inkubation mit HDL zunächst 15 Minuten mit PMA inkubiert. Eine Langzeit-Inkubation mit PMA über mehrere Stunden führt zu einer verminderten Expression der PKC [36], so daß die Gesamtinkubationszeit mit PMA kurz gehalten werden muß. Daher wurden die Zellen bei diesem Experiment nur 1,5 Stunden mit HDL und PMA inkubiert.

Man erkennt, daß durch 10 µM PMA der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux signifikant um ca. 20 % gesteigert werden kann. Die maximale Steigerung von 50 % wird ab PMA-Konzentrationen von 50 µM erreicht.

5.5.2. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung der PI-PLC

In unserer Arbeitsgruppe [328] und durch Drobnik et al. [96] wurde gefunden, daß HDL ebenfalls eine Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) aktivieren. Die Aktivität der PI-PLC war jedoch – im Gegensatz zur PC-Hydrolyse – in einem weiten HDL-Konzentrationsbereich sichtbar, was auf eine mögliche andere Funktion hindeutete. Eine Inhibition der PI-PLC durch U 73122 führte zu einer vollständigen Hemmung des PI-Umsatzes nach HDL-Zugabe [328]. Um den Effekt dieser Hemmung auf den HDL-induzierten Cholesterinefflux zu untersuchen, wurde der Cholesterinefflux in Abhängigkeit von der Inhibition der PI-PLC untersucht. Bei der PI-Hydrolyse wird u. a. auch eine Phospholipase A₂ aktiviert. Daher wurden auch AACOCF₃ und Aristolochic Acid zur Inhibition der Phospholipase A₂ eingesetzt und der Einfluß auf den Cholesterin-Massenefflux untersucht.

Abbildung 5.22 zeigt die Strukturformel von U 73122, AACOCF₃ und Aristolochic Acid.

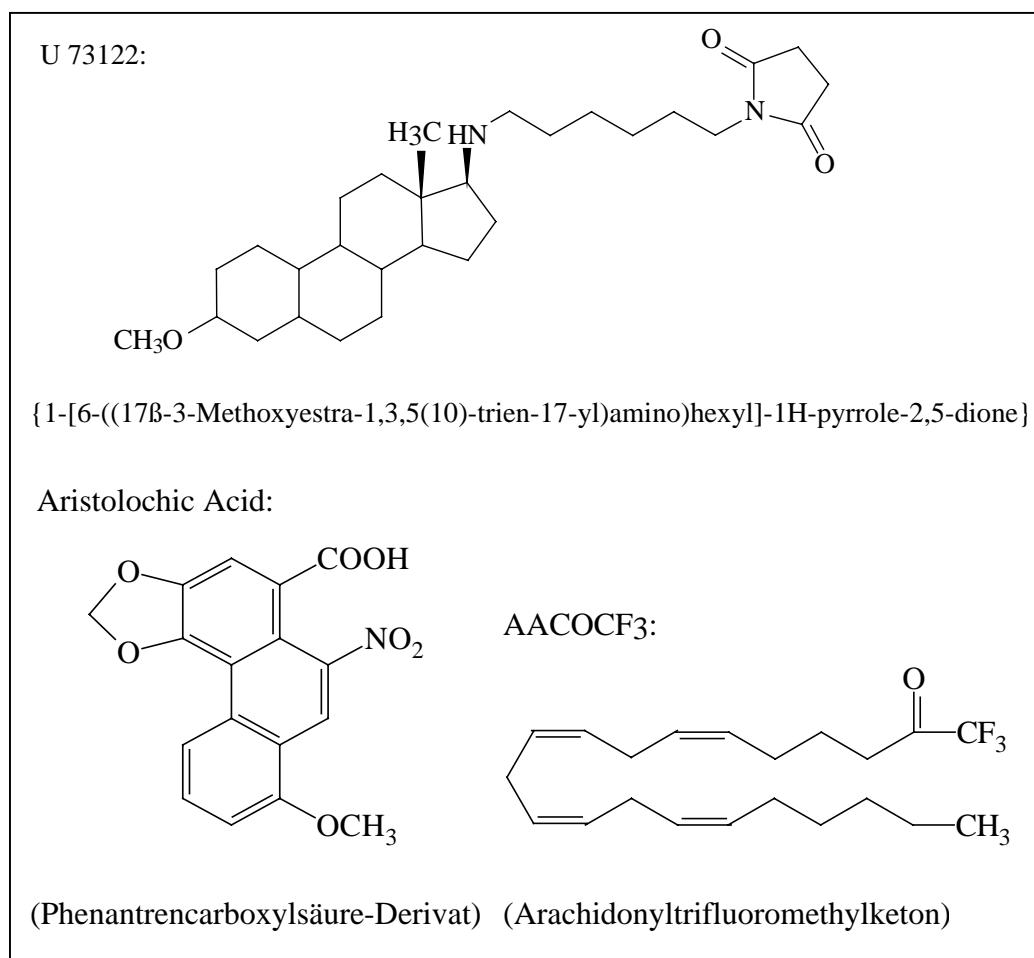


Abbildung 5.22: Strukturformeln von U 73122, Aristolochic Acid und AACOCF₃

Abbildung 5.23 zeigt das Ergebnis eines typischen Versuchs zur Hemmung der PI-PLC.

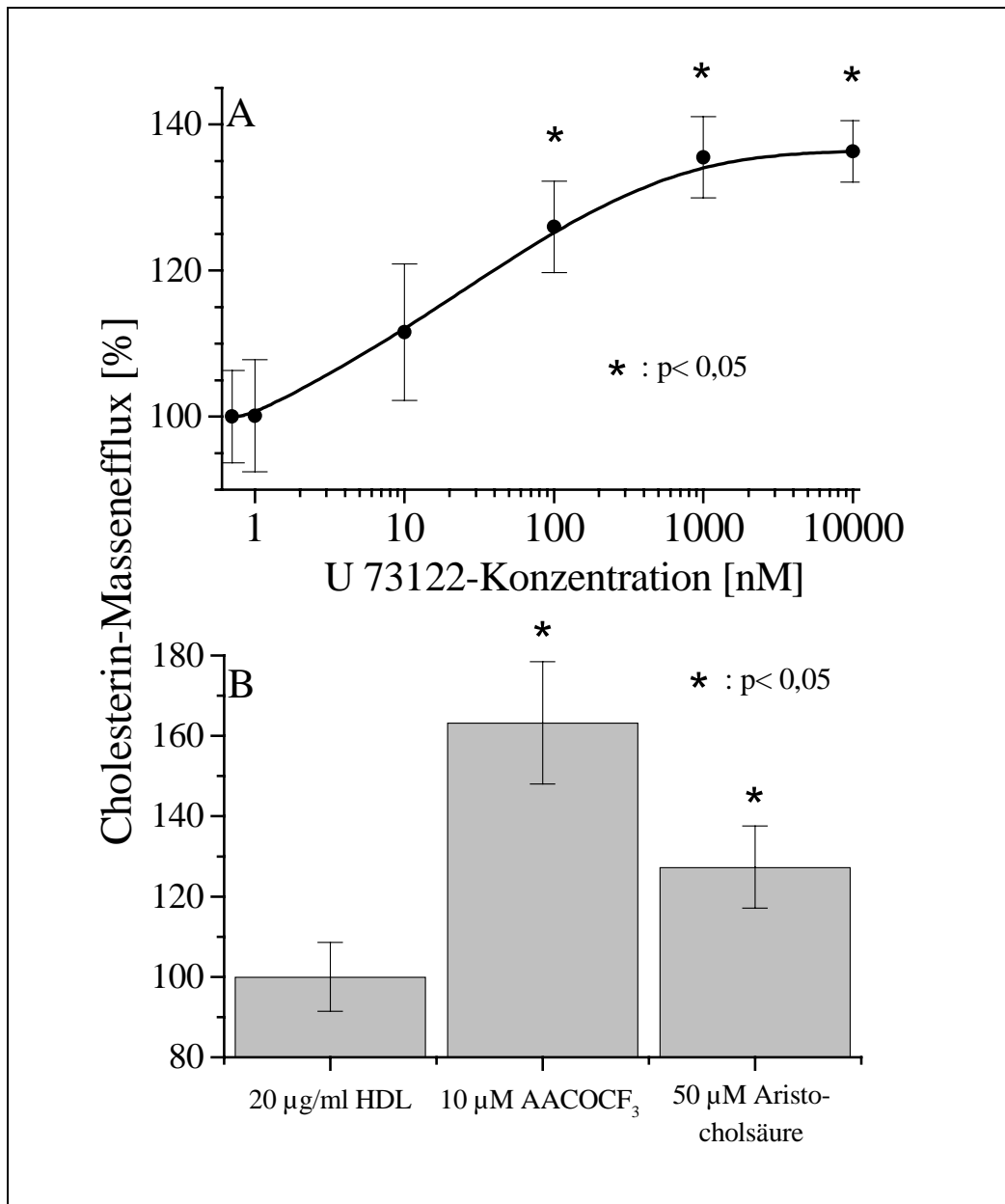


Abbildung 5.23: [A]: Cholesterin-Massenefflux in Abhängigkeit der Inhibition der PI-PLC. Dargestellt ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL. Direkt vor Zugabe der HDL wurde U 73122 in den entsprechenden Konzentrationen zu den Ansätzen hinzugegeben. Anschließend wurde der Versuch wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt. Ausgangswert (100%) ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL ohne Zugabe des Inhibitors U 73122. Dies entspricht in diesem Versuch $0,9 \pm 0,05$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein. Bei diesem Wert wurde das in den HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen.

[B]: Cholesterin-Massenefflux in Abhängigkeit der Inhibition der Phospholipase A₂. Dargestellt ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL. Direkt vor Zugabe der HDL wurden 10 µM AACOCF₃ und 50 µM Aristolochic Acid zu den Ansätzen hinzugegeben. Anschließend wurde der Versuch wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt. Ausgangswert (100%) ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL ohne Zugabe der Inhibitoren. Dies entspricht in diesem Versuch $1,2 \pm 0,10$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein. Bei diesem Wert wurde das in den HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen.

Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen signifikante ($p < 0,05$) Abweichungen vom Ausgangswert (100%).

Abbildung 5.23 A zeigt, daß eine Hemmung der PI-PLC durch U 73122 zu einem erhöhten Cholesterin-Massenefflux führt. Die Inhibition war konzentrationsabhängig und ab 100 nM signifikant vom Nullwert (100%) verschieden. Bei Inhibitor-Konzentrationen von 1 bis 10 μM erreicht der Efflux eine Sättigung bei etwa 135 % des Cholesterin-Masseneffluxes ohne Zugabe des Inhibitors.

In Abbildung 5.23 B ist zu sehen, daß eine Inhibition der Phospholipase A_2 einen ähnlichen Effekt aufweist, wie die Inhibition der PI-PLC. Auch hier ist eine signifikante Erhöhung des HDL-induzierten Cholesterin-Masseneffluxes zu beobachten, die sich bei Aristolochic Acid im Bereich von 130 % des Ausgangswertes (100 %) bewegt, bei AACOCF₃ jedoch mit 160 % wesentlich größer ist.

5.5.3. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung der PC-PLC

Ebenso wurde in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe radioaktiver Cholesterinvorläufer festgestellt, daß HDL in humanen Hautfibroblasten eine Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC) aktivieren [328]. Eine Inhibition der PC-PLC durch D 609 führte zu einer verminderten Diacylglycerin-Bildung nach HDL-Zugabe [328]. Um den Effekt dieser Hemmung eines durch HDL ausgelösten Signaltransduktionsweges auf den Cholesterin-Massenefflux zu untersuchen, wurde der Cholesterin-Massenefflux in Abhängigkeit von der Inhibition der PC-PLC untersucht.

Abbildung 5.24 zeigt die Strukturformel von D 609.

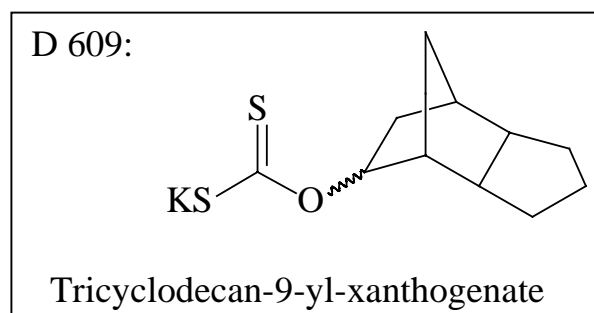


Abbildung 5.24: Strukturformel von D 609.

Abbildung 5.25 zeigt das Ergebnis eines typischen Versuchs.

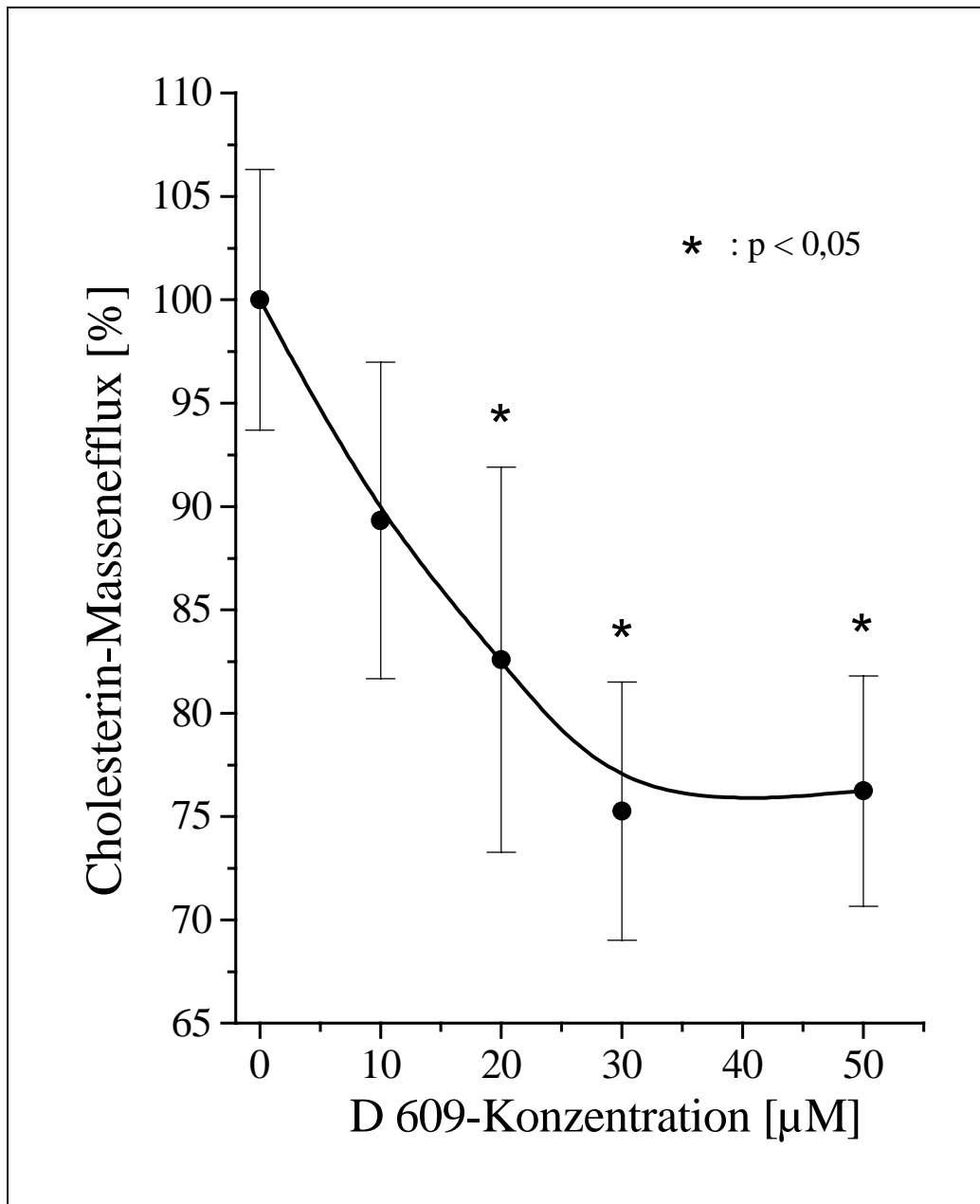


Abbildung 5.25: Cholesterin-Massenefflux in Abhängigkeit der Inhibition der PC-PLC. Dargestellt ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL. Direkt vor Zugabe der HDL wurde D 609 in den entsprechenden Konzentrationen zu den Ansätzen hinzugegeben. Anschließend wurde der Versuch wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt. Ausgangswert (100%) ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL ohne Zugabe des Inhibitors D 609. Dies entspricht in diesem Versuch $1,1 \pm 0,07$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein. Bei diesem Wert wurde das in den HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen. Die mit * gekennzeichneten Werte weichen signifikant ($p < 0,05$) vom Ausgangswert (100%) ab.

In Abbildung 5.25 ist zu erkennen, daß eine Hemmung der PC-PLC durch D 609 konzentrationsabhängig zu einem verminderten Cholesterin-Massenefflux führt. Bei Inhibitor-Konzentrationen ab etwa 30 µM erreicht die Verminderung des Effluxes ein Plateau bei etwa 75 % des Effluxes ohne Zugabe des Inhibitors.

5.5.4. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung der PC-PLD

Auch eine Aktivierung einer G-Protein-abhängigen Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase D (PC-PLD) durch HDL konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden [328]. Eine Inhibition der HDL-abhängigen Aktivierung der PC-PLD durch Pertussis Toxin führte zu einer um etwa 35 % verminderten Phosphatidatbildung [328]. Um den Effekt dieser Hemmung auf den Cholesterin-Massenefflux zu untersuchen, wurde der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux in Abhängigkeit von Pertussis Toxin untersucht.

Abbildung 5.26 zeigt das Ergebnis eines Versuchs zur Inhibierung der HDL-abhängigen Aktivierung der PC-PLD durch Pertussis Toxin.

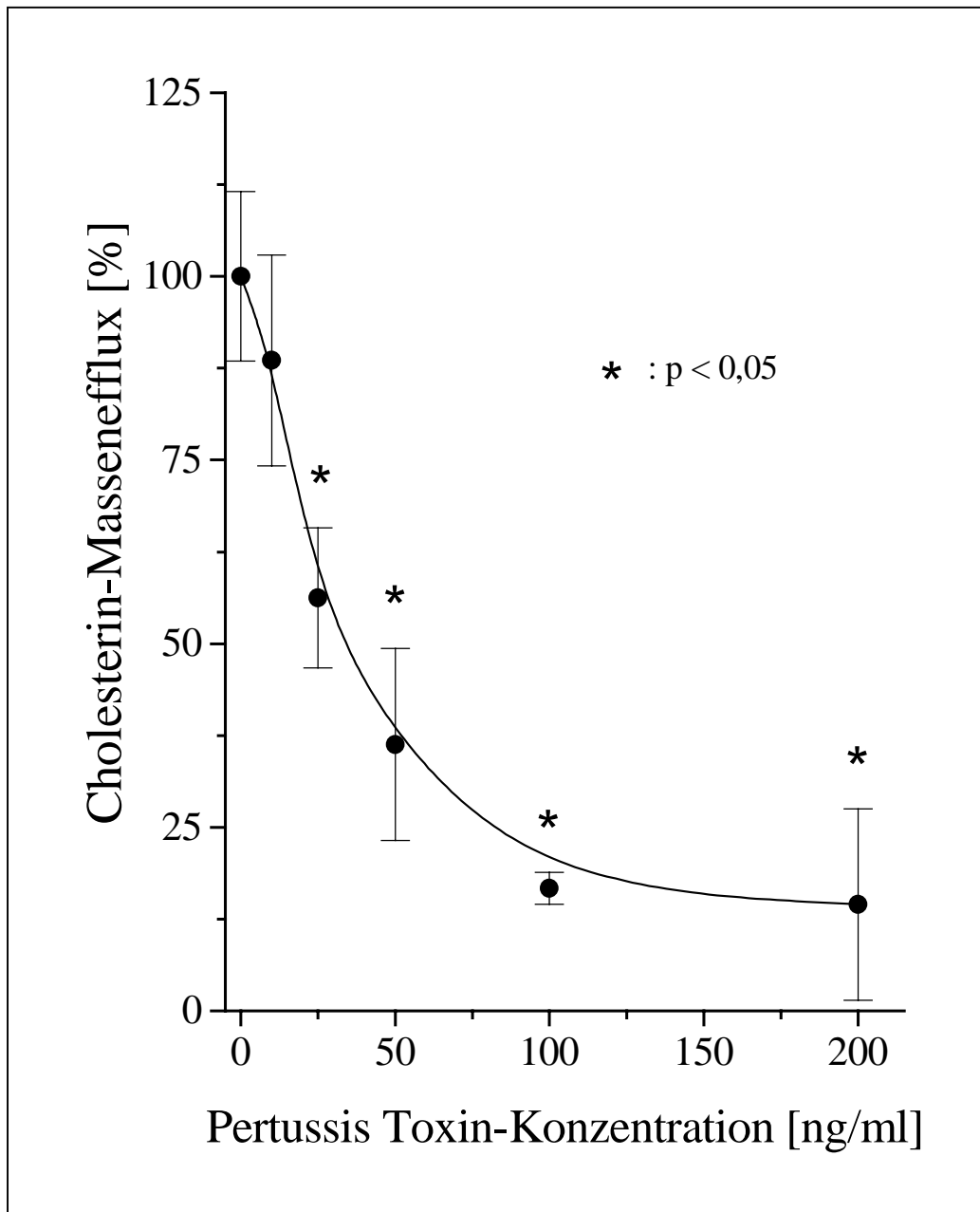


Abbildung 5.26: Cholesterin-Massenefflux in Abhängigkeit der Inhibition der PC-PLD. Dargestellt ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL. Die Zellen wurden vor Zugabe der HDL 12 h mit Pertussis Toxin in den entsprechenden Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde der Versuch wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt. Ausgangswert (100%) ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL ohne Zugabe des Inhibitors. Dies entspricht in diesem Versuch $0,9 \pm 0,03$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein. Bei diesem Wert wurde das in den HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen. Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen eine signifikante ($p < 0,05$) Abweichung vom Ausgangswert (100%).

Die Abbildung zeigt, daß eine Inkubation der Zellen mit Pertussis-Toxin zu einem um etwa 80 % verminderten Cholesterin-Massenefflux führt.

5.5.5. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung von Lysosulphatiden

Lysosulphatide sind glykolisierte Lipide, die auf HDL vorkommen. Eine Beteiligung von Lysosulphatiden an der mitogenen Wirkung der HDL wird in Kapitel 5.8. gezeigt. Daher untersuchten wir auch, wie in Abbildung 5.27 gezeigt, die Wirkung von Lysosulphatiden auf den Cholesterin-Massenefflux ohne Beteiligung von HDL.

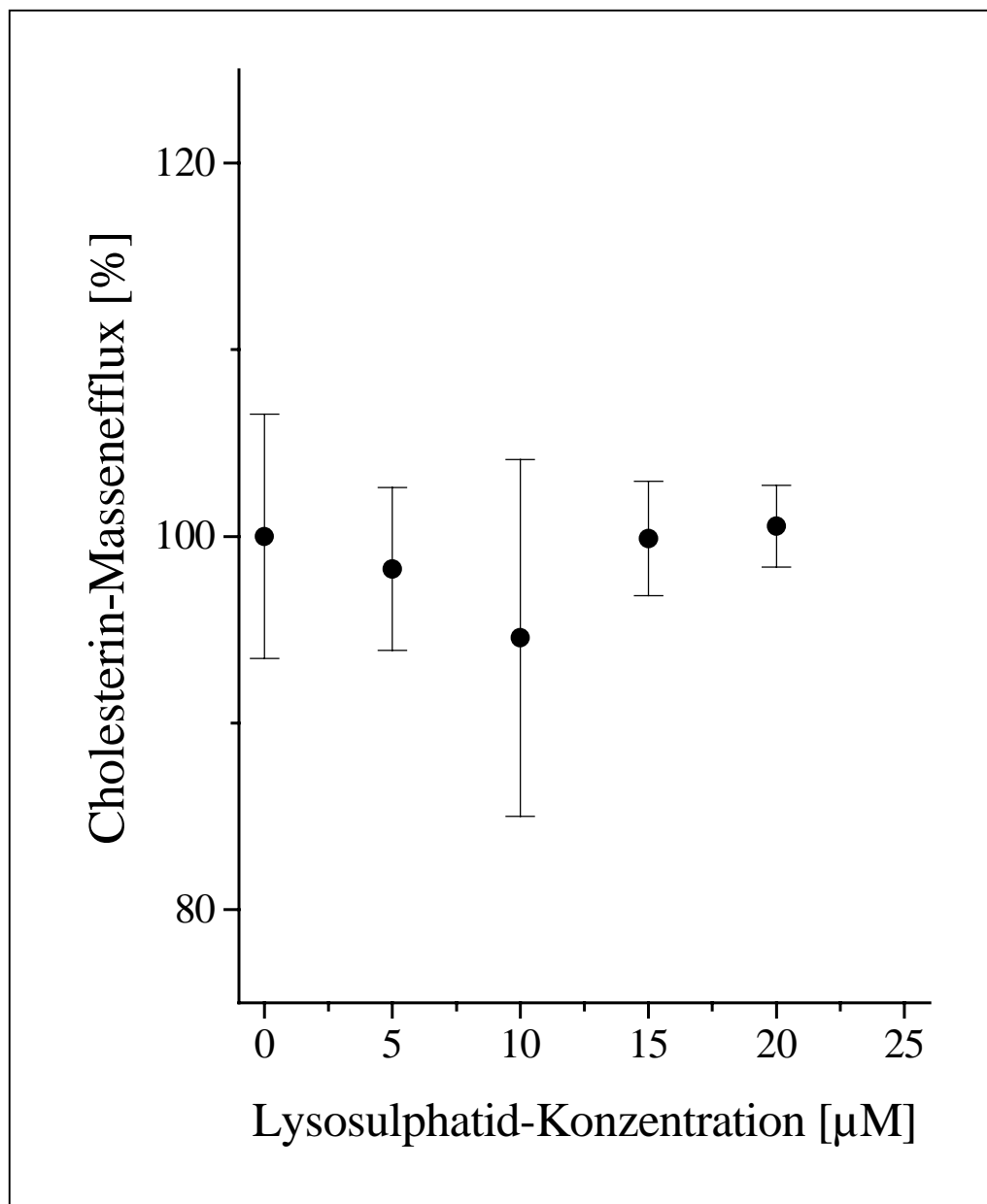


Abbildung 5.27: Cholesterin-Massenefflux in Abhängigkeit der Lysosulphatid-Konzentration. Dargestellt ist der Efflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt. Ausgangswert (100%) ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin ohne Zugabe von Lysosulphatid. Dies entspricht in diesem Versuch $0,5 \pm 0,03$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein.

Die Abbildung zeigt, daß Lysosulphatide keinen Einfluß auf den Cholesterin-Massenefflux ausüben.

5.5.5. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung weiterer Proteinkinasen

Durch eine Inhibition anderer Proteinkinasen als der PKC soll überprüft werden, ob auch andere Proteinkinasen an der Signaltransduktion des HDL-induzierten Cholesterin-Masseneffluxes beteiligt sind. Dazu wurden Inhibitoren für verschiedene Proteinkinasen zu den Zellen hinzugegeben. Untersucht wurden die Tyrosinkinase-Inhibitoren Tyrphostin A 25 und Tyrphostin A 51, sowie der Tyrosinkinase-Inhibitor Lavendustin A, der zusätzlich einen geringen inhibierenden Effekt auf die Proteinkinasen A und C hat.

Abbildung 5.28 zeigt die Strukturformeln von Tyrphostin A 25, Tyrphostin A 51 und Lavendustin A.

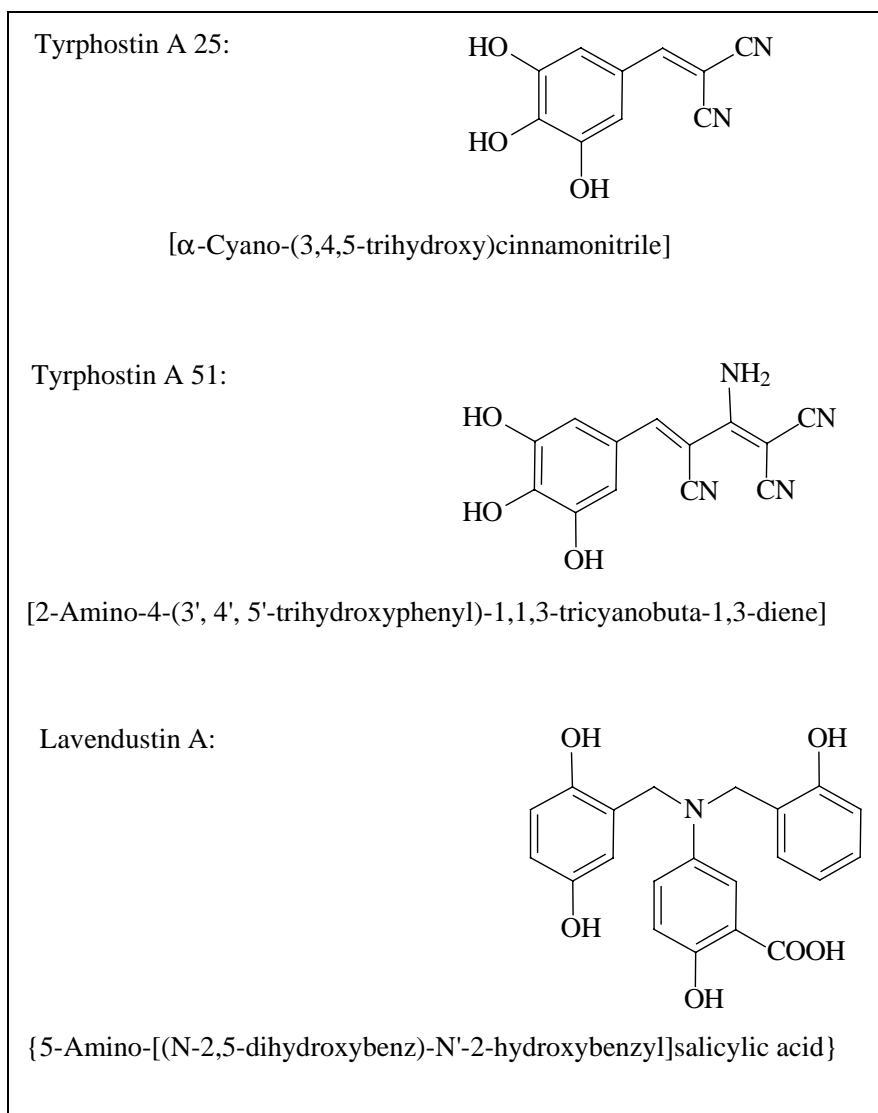


Abbildung 5.28: Strukturformeln von Tyrphostin A 25, Tyrphostin A 51 und Lavendustin A.

Abbildung 5.29 zeigt ein Ergebnis eines typischen Versuchs.

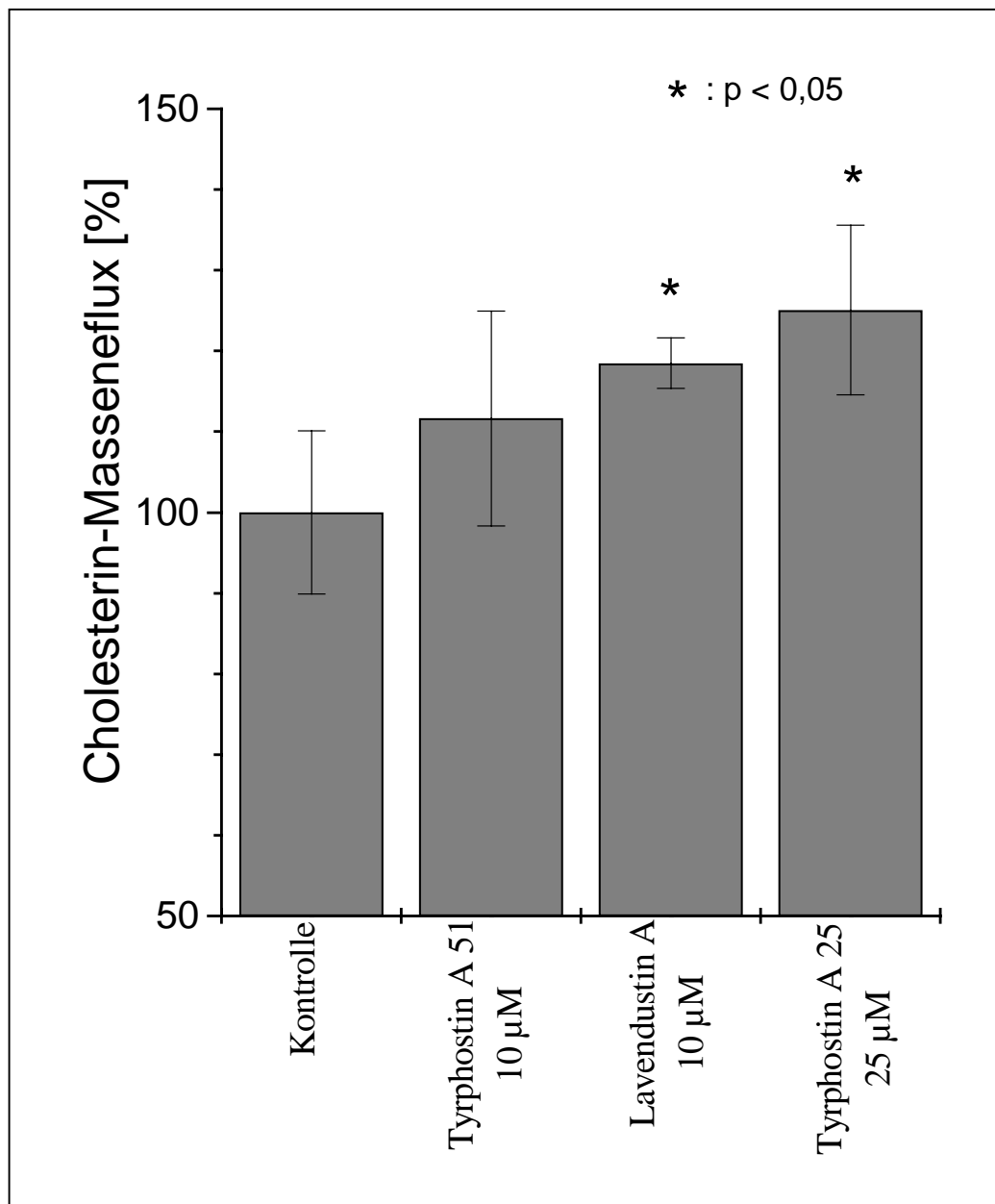


Abbildung 5.29: Cholesterin-Massenefflux in Abhängigkeit der Inhibition verschiedener Proteinkinasen. Dargestellt ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL. Direkt vor Zugabe der HDL wurden die Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen zu den Ansätzen hinzugegeben. Anschließend wurde der Versuch wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle und Ausgangswert (100%) wurde der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL ohne Zugabe eines Inhibitors genommen. Dies entspricht in diesem Versuch $1,1 \pm 0,11$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein. Bei diesem Wert wurde das in den HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen. Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen eine signifikante ($p < 0,05$) Abweichung vom Ausgangswert (100%).

Eine Hemmung von Tyrosinkinase hatte nur einen geringen Einfluß auf den HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux. Bei allen drei Tyrosinkinase-Inhibitoren kam es zu einer geringen, aber nur bei Tyrphostin A25 und Lavendustin A signifikanten ($p < 0,05$) Erhöhung des Cholesterin-Masseneffluxes auf 110 bis 120 % des Kontrollwertes (Abbildung 5.29).

5.5.6. Cholesterin-Massenefflux: Beteiligung von Guanylat-Cyclasen

Tyrphostin A 25 inhibiert nicht nur Tyrosinkinasen, sondern aktiviert außerdem noch Guanylat-Cyclasen bzw. die GTP-Aktivität des Transducins. Zur Kontrolle, ob die Wirkung von Tyrphostin A 25 auf den Cholesterin-Massenefflux durch die Aktivierung der Guanylat-Cyclasen zustande kommt, wurden zusätzlich zu Tyrphostin A 25 noch Guanylin und Protoporphyrin IX getestet. Guanylin aktiviert membrangebundene Guanylat-Cyclasen, Protoporphyrin IX aktiviert Guanylat-Cyclasen im Zytoplasma.

Abbildung 5.30 zeigt die Strukturformel von Protoporphyrin IX.

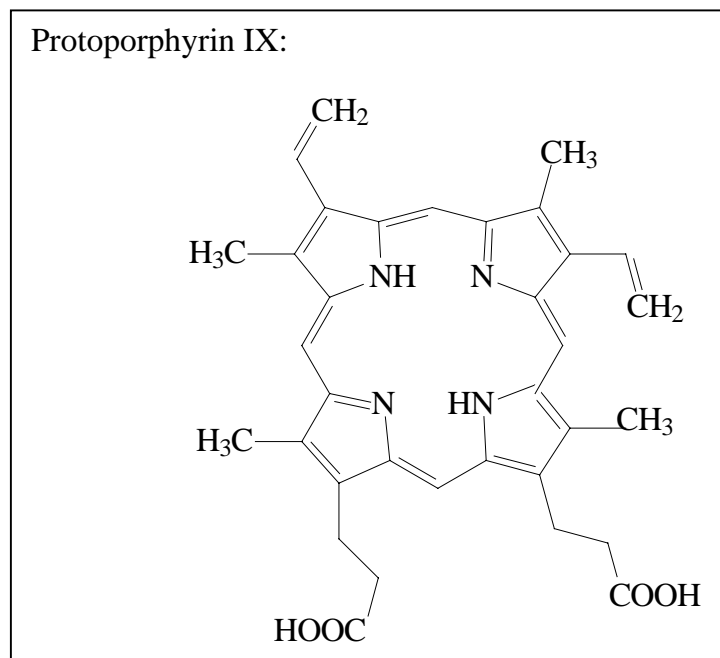


Abbildung 5.30: Strukturformel von Protoporphyrin IX.

Abbildung 5.31 zeigt das Ergebnis eines typischen Versuchs.

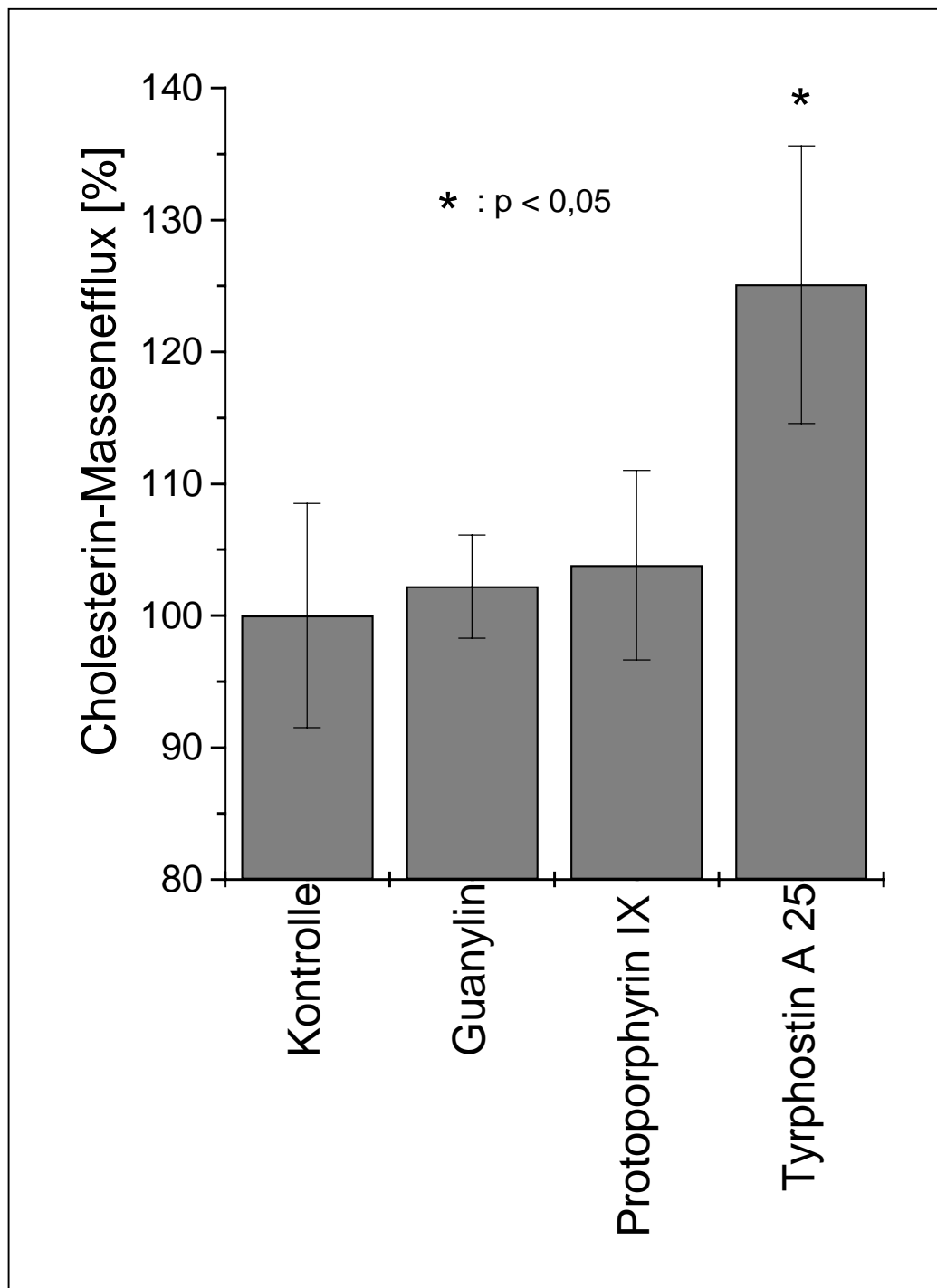


Abbildung 5.31: Cholesterin-Massenefflux in Abhängigkeit der Aktivierung von Guanylat-Cyclasen. Dargestellt ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL. Direkt vor Zugabe der HDL wurden die Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen zu den Ansätzen hinzugegeben. Dies waren für Guanylin: 100 nM, für Protoporphyrin IX: 1 µM und für Tyrphostin A 25: 25 µM. Anschließend wurde der Versuch wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle und Nullwert (100%) wurde der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL ohne Zugabe eines Inhibitors genommen. Dies entspricht in diesem Versuch für Guanylin und Protoporphyrin IX: $0,9 \pm 0,21$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein und für Tyrphostin A 25: $0,9 \pm 0,09$ µg / mg. Bei diesen Werten wurde das in den HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen. Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen eine signifikante ($p < 0,05$) Abweichung vom Ausgangswert (100%).

Abbildung 5.31 verdeutlicht, daß der Effekt von Tyrphostin A 25 vermutlich nicht auf die Aktivierung der Guanylat-Cyclasen zurückzuführen ist. Die beiden Guanylat-Cyclase-

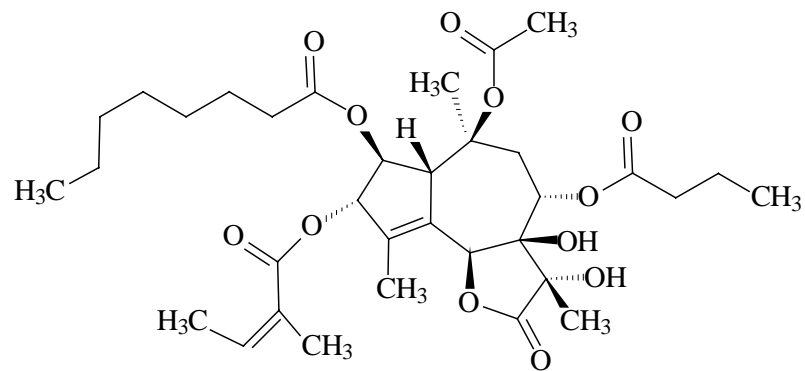
Aktivatoren Guanylin und Protoporphyrin IX hatten keinen Effekt auf den Cholesterin-Massenefflux (Abbildung 5.31).

5.5.7. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Ca^{2+}

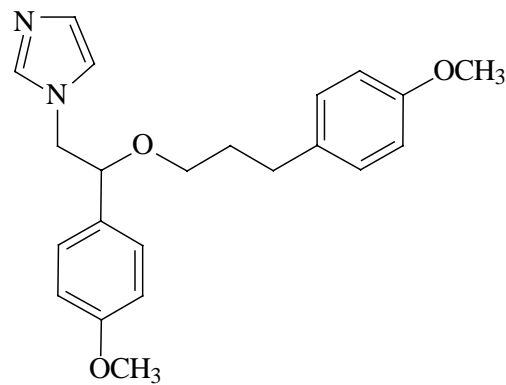
Viele Signaltransduktionswege verlaufen über eine Freisetzung von intrazellulärem Calcium. Es wurden daher Experimente durchgeführt, die überprüfen sollten, ob auch der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux Calcium-abhängig ist. Dazu wurde Thapsigargin, das Calcium aus intrazellulären Pools freisetzt und SKF 96365 eingesetzt. SKF 96365 inhibiert spannungsabhängige Calcium-Kanäle, bei niedrigen Konzentrationen den Rezeptor-vermittelten Calcium-Influx und in höheren Konzentrationen die intrazelluläre Calcium-Freisetzung. Zudem wurde noch der Einfluß von Nickel-Ionen überprüft, die Calciumkanäle der Zellwand blockieren, sowie EGTA, das Calcium im Medium komplexiert.

Abbildung 5.32 zeigt die Strukturformeln von Thapsigargin, SKF 96365 und EGTA.

Thapsigargin:

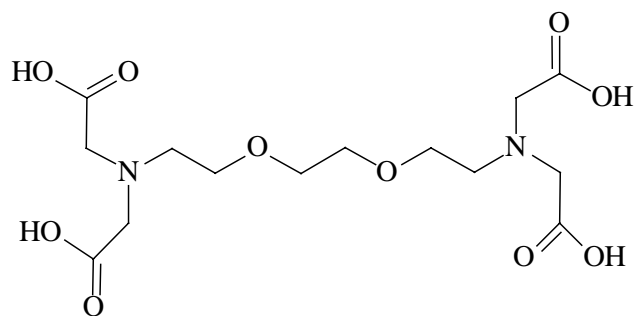


SKF 96365:



{1-[β-[3-(4-Methoxyphenyl)propoxy]-4-methoxyphenethyl]-1H-imidazole}

EGTA:



[Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid]

Abbildung 5.32: Strukturformeln von Thapsigargin, SKF 96365 und EGTA.

Abbildung 5.33 zeigt ein typisches Ergebnis dieser Versuche.

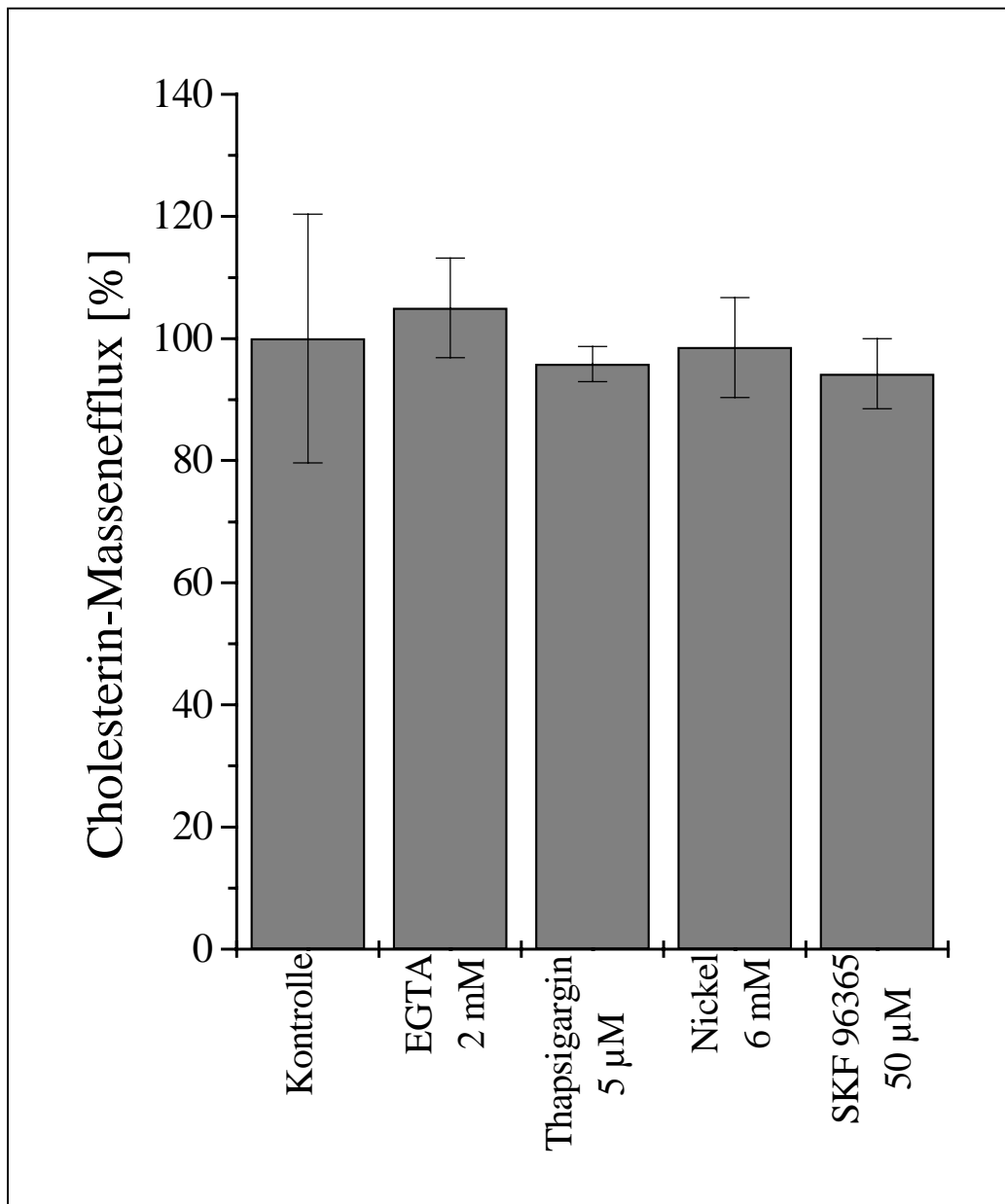


Abbildung 5.33: Cholesterin-Massenefflux in Abhängigkeit der Calcium-Ionen-Konzentration. Dargestellt ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL. Direkt vor Zugabe der HDL wurden die Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen zu den Ansätzen hinzugegeben. Anschließend wurde der Versuch wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle und Nullwert (100%) wurde der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL ohne Zugabe eines Inhibitors genommen. Dies entspricht in diesem Versuch $1,1 \pm 0,22$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein. Bei diesem Wert wurde das in den HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen.

In Abbildung 5.33 ist zu erkennen, daß keiner der verwendeten Inhibitoren des Calcium-Stoffwechsel der Zelle Einfluß auf den HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux hat. Gezeigt werden die jeweils maximalen Konzentrationen aus Versuchen mit steigenden Konzentrationen der Inhibitoren. Dabei wurden die in der Literatur angegebenen Konzentrationsbereiche gewählt und leicht überschritten.

5.5.8. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Proteinphosphatasen der PPP- und PPM-Familie

In Kapitel 5.5.1 war gezeigt worden, daß die Proteinkinase C am Cholesterin-Massenefflux beteiligt ist. Es sollten nun die antagonistisch zu den Kinasen wirkenden Proteinphosphatasen untersucht werden. Proteinphosphatasen werden in drei Familien gegliedert. Zwei dieser Familien, die PPP- und PPM-Familie dephosphorylieren Phosphothreonin- und Phosphoserinreste. Die Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen PP1, PP2A und PP2B der PPP-Familie, sowie die PP2C der PPM-Familie sind für den Großteil aller Protein-Serin/Threonin-Phosphataseaktivität *in vivo* verantwortlich. Inhibitoren, die spezifisch nur die Phosphatasen der PPP-Familie bzw. der PPM-Familie hemmen, sind nicht bekannt. Es gibt Inhibitoren, die spezifisch PP1- bzw. PP2-Phosphatasen des Glykogenstoffwechsels hemmen, aber für Phosphatasen, die an anderen Stoffwechselwegen beteiligt sind, wurden bisher keine spezifischen Inhibitoren beschrieben. Okadasäure hemmt je nach Konzentration die Phosphatasen der PPP- und der PPM-Familie. Es sind weitere Inhibitoren bekannt, die je nach Konzentration Phosphatasen dieser beiden Familien hemmen können: Calyculin A, Cantharidin und Endothall. Die in den folgenden Abbildungen dargestellten Ergebnisse zeigen den Einfluß dieser Inhibitoren auf den Cholesterin-Massenefflux.

5.5.8.1. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Okadasäure

Okadasäure inhibiert Protein-Phosphatasen der PPP- und PPM-Familie. Abbildung 5.34 zeigt die Strukturformel von Okadasäure.

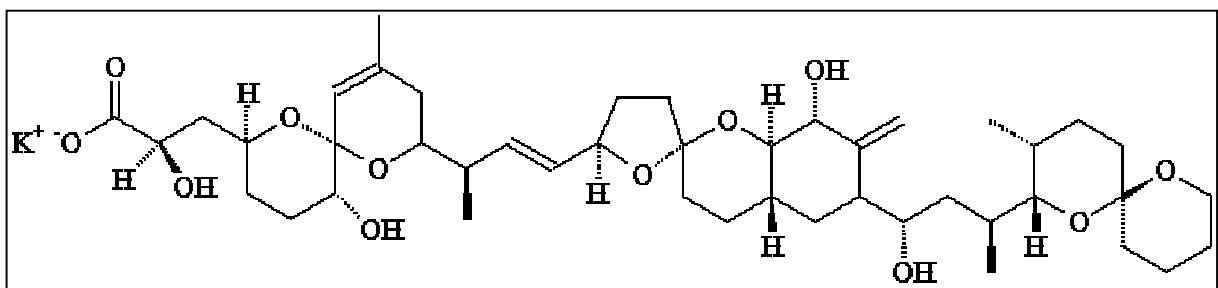


Abbildung 5.34: Strukturformel von Okadasäure

Abbildung 5.35 zeigt die Wirkung von steigenden Konzentrationen Okadasäure auf den Cholesterin-Massenefflux.

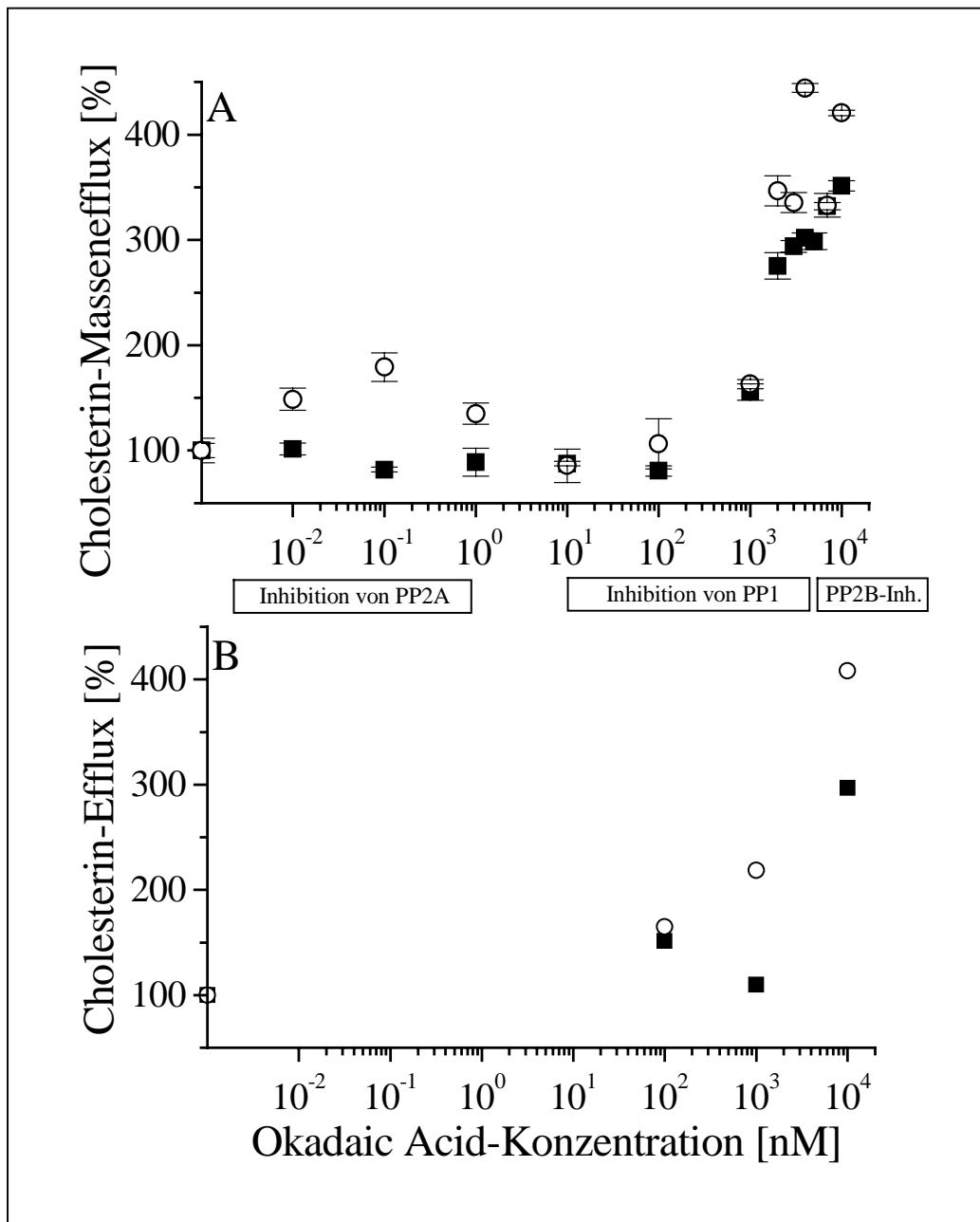


Abbildung 5.35: Cholesterinefflux in Abhängigkeit der Okadasäure-Konzentration. Dargestellt ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin (geschlossene Quadrate) bzw. in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL (offene Kreise). [A]: Cholesterin-Massenefflux. [B]: Efflux radioaktiv markierten *de novo* synthetisierten Cholesterins. Direkt vor Zugabe der HDL wurde Okadasäure in den angegebenen Konzentrationen zu den Ansätzen hinzugegeben. Anschließend wurde der Versuch wie in Kapitel 4.2.4.5 (A) bzw. Kapitel 4.2.4.6. (B) durchgeführt. Als Kontrolle und Nullwert (100%) wurde der Cholesterinefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin bzw. 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL ohne Zugabe eines Inhibitors genommen. Dies entspricht in Abbildung A bei dem Ansatz mit HDL $1,0 \pm 0,12$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein bzw. $0,6 \pm 0,04$ µg bei dem Ansatz ohne HDL. Bei diesem Wert wurde das in den HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen. In Abbildung B entspricht dies einem Wert von 3709 PSL ohne Zugabe von HDL und 5228 PSL mit HDL. Die Angaben „Inhibition von PP2A“, „Inhibition von PP1“ und „PP2B-Inh.“ kennzeichnen die Konzentrationen, bei denen Okadasäure in anderen Zelltypen laut Literatur diesen Typ von Phosphatasen jeweils hemmt.

Die Abbildung verdeutlicht, daß es sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von HDL zu einer erheblichen Steigerung sowohl des Cholesterin-Masseneffluxes als auch des Effluxes *de novo* synthetisierten, radioaktiv markierten Cholesterins in Anwesenheit von Okadasäure

kommt. Mit HDL ist der maximale Efflux geringfügig verstärkt (Abb. 5.35 A: 450 % des Basalwert verglichen mit 350 % des Basalwerts; Abb. 5.35 B: 400 % des Basalwerts verglichen mit 300 % des Basalwerts. Dabei entsprechen 100 % dem Efflux von Cholesterin in Anwesenheit von 1 mg / ml Albumin, jeweils mit und ohne Zugabe von HDL). Bei niedrigen Inhibitor-Konzentrationen, die den Cholesterinefflux ohne Zugabe von HDL nicht beeinflussen, kommt es in Anwesenheit von HDL bereits zu einer deutlichen Verstärkung des Cholesterin-Masseneffluxes.

5.5.8.2. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Calyculin A

Calyculin A ist wie Okadasäure ein Inhibitor von Protein-Phosphatasen der PPP- und PPM-Familie.

Abbildung 5.36 zeigt die Strukturformel von Calyculin A.

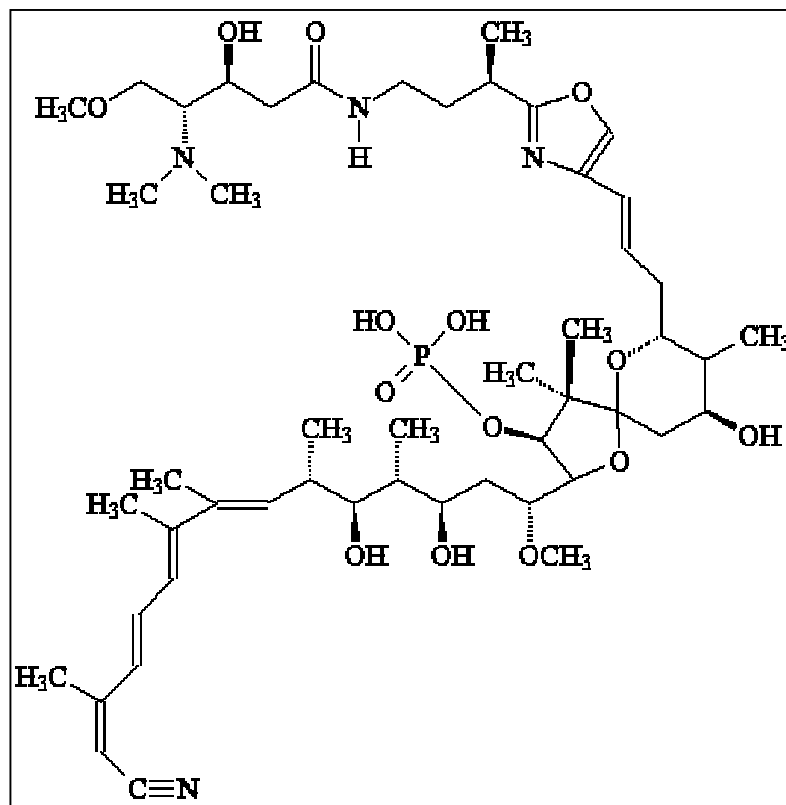


Abbildung 5.36: Strukturformel von Calyculin A.

Abbildung 5.37 zeigt die Wirkung von steigenden Konzentrationen Calyculin A auf den Cholesterin-Massenefflux in Anwesenheit von Albumin.

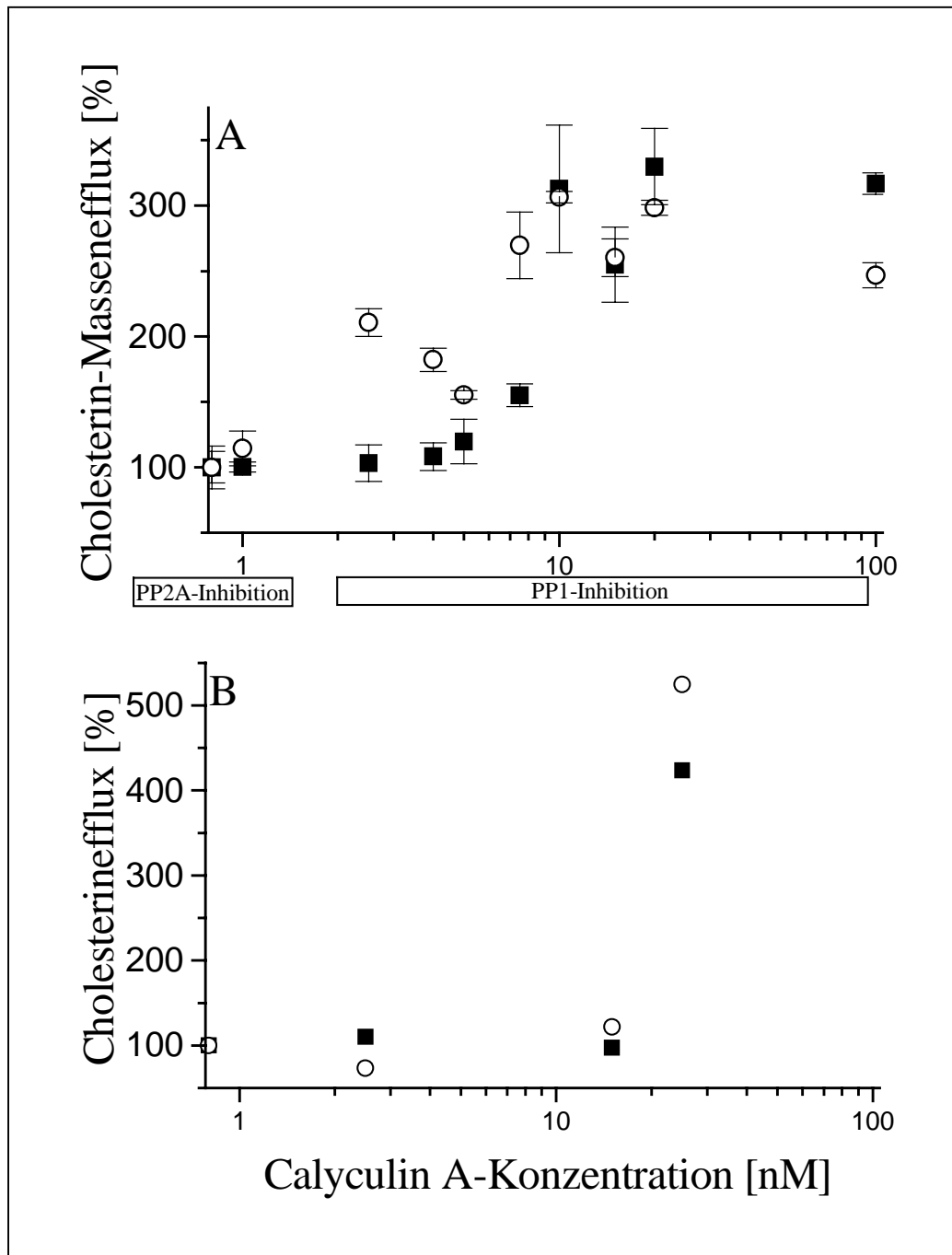


Abbildung 5.37: Cholesterinefflux in Abhängigkeit der Calyculin A-Konzentration. Dargestellt ist der Cholesterin-Massenefflux (A) und der Efflux radioaktiv markierten, de novo synthetisierten Cholesterins (B) in Medium mit 1mg/ml Albumin (geschlossene Quadrate) bzw. in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL (offene Kreise). Direkt vor Zugabe der HDL wurde Calyculin A in den angegebenen Konzentrationen zu den Ansätzen hinzugegeben. Anschließend wurde der Versuch wie in Kapitel 4.2.4.5 (A) bzw. 4.2.4.6. (B) beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle und Nullwert (100%) wurde der Cholesterinefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin bzw. 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL ohne Zugabe eines Inhibitors genommen. Dies entspricht in Abb. A bei dem Ansatz ohne Zugabe von HDL $0,3 \pm 0,03$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein bzw. $0,9 \pm 0,14$ µg bei dem Ansatz mit HDL und in Abb. B 3612 PSL ohne Zugabe von HDL und 7644 PSL mit HDL. Bei den Werten in Abb. A wurde das in den HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen. Die Angaben „PP2A-Inhibition“ bzw. „PP1-Inhibition“ kennzeichnen die Konzentrationen, bei denen Calyculin A in anderen Zelltypen laut Literatur diesen Typ von Phosphatasen jeweils hemmt.

Die Abbildung verdeutlicht, daß es sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von HDL zu einer erheblichen Steigerung sowohl des Cholesterin-Masseneffluxes, wie auch des Effluxes *de novo* synthetisierten Cholesterins in Anwesenheit von Calyculin A kommt. Mit und ohne HDL ist der maximale Efflux nicht signifikant unterschiedlich (Abb. A: um 25 % des Basalwerts (100 %) geringer; Abb. B um 80 % des Basalwerts erhöht. Dabei entsprechen 100 % dem Efflux von Cholesterin in Anwesenheit von 1 mg / ml Albumin). Bei niedrigen Inhibitor-Konzentrationen, die den Cholesterinefflux ohne Zugabe von HDL nicht beeinflussen, kommt es in Anwesenheit von HDL bereits zu einer deutlichen Verstärkung des Cholesterin-Masseneffluxes, der jedoch bei der Messung des Effluxes *de novo* synthetisierten Cholesterins nicht sichtbar ist.

5.5.8.3. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Cantharidin

Auch Cantharidin ist ein Inhibitor von Protein-Phosphatasen der PPP- und PPM-Familie.

Abbildung 5.38 zeigt die Strukturformel von Cantharidin.

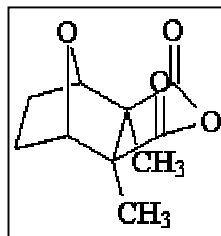


Abbildung 5.38: Strukturformel von Cantharidin.

Abbildung 5.39 zeigt die Wirkung von steigenden Konzentrationen Cantharidin auf den Cholesterin-Massenefflux.

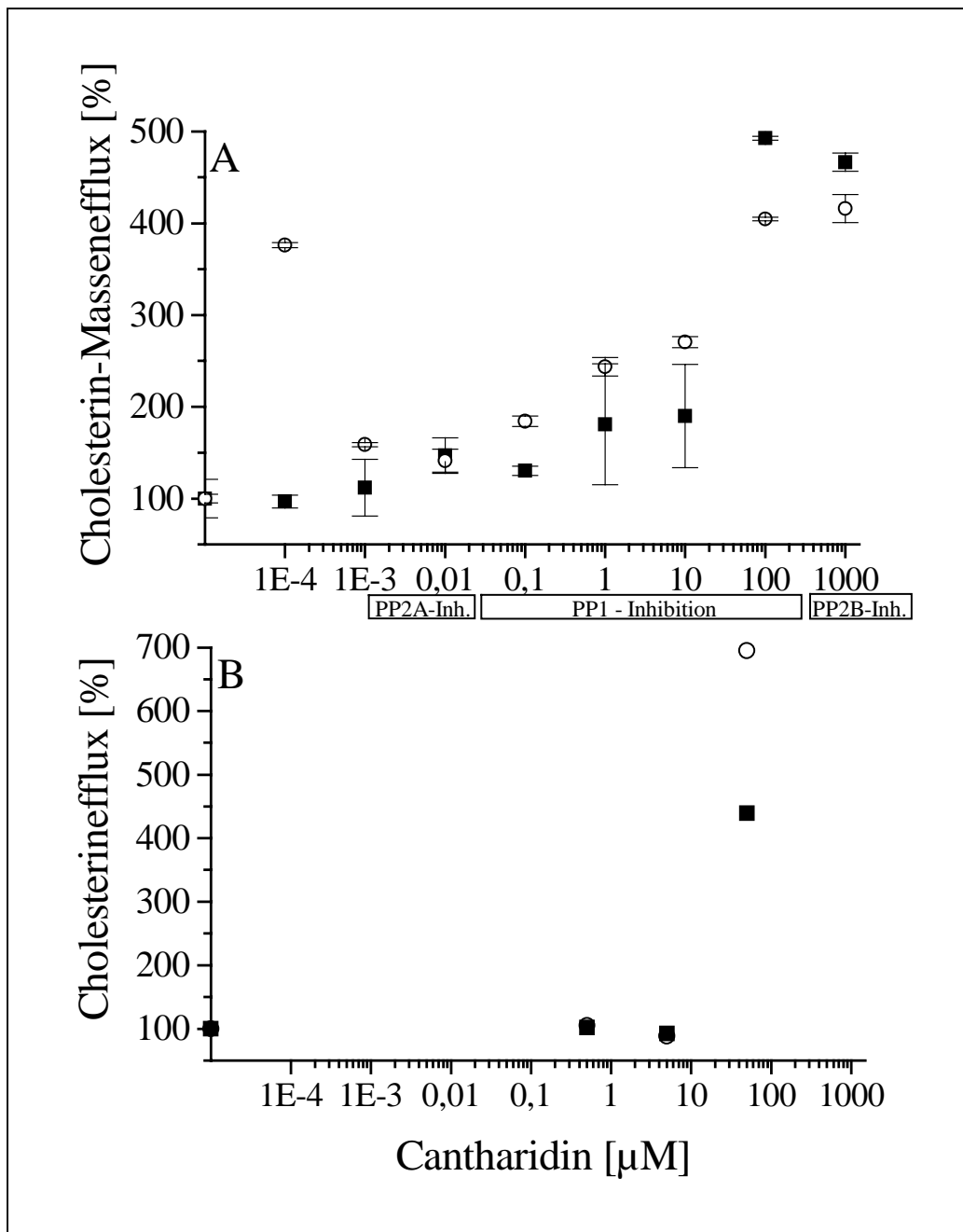


Abbildung 5.39: Cholesterinefflux in Abhängigkeit der Cantharidin-Konzentration. Dargestellt ist in Abb. A der Cholesterin-Massenefflux und in Abb. B der Efflux de novo synthetisierten Cholesterins jeweils in Medium mit 1mg/ml Albumin (geschlossene Quadrate) bzw. in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL (offene Kreise). Direkt vor Zugabe der HDL wurde Calyculin A in den angegebenen Konzentrationen zu den Ansätzen hinzugegeben. Anschließend wurde der Versuch wie in Kapitel 4.2.4.5 bzw. 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle und Nullwert (100 %) wurde der Cholesterinefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin bzw. 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL ohne Zugabe eines Inhibitors genommen. Dies entspricht in Abb. A bei dem Ansatz ohne Zugabe von HDL $0,3 \pm 0,01$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein bzw. $0,8 \pm 0,13$ µg bei dem Ansatz mit HDL. Bei diesem Wert wurde das in den HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen. In Abb. B entspricht dies 4365 PSL ohne Zugabe der HDL und 7956 PSL mit HDL. Die Angaben zur Inhibition der PP1, PP2A und PP2B sind der Literatur entnommen und kennzeichnen die Konzentrationen, bei denen Cantharidin in anderen Zelltypen diesen Typ von Phosphatasen jeweils hemmt.

Die Abbildung verdeutlicht, daß es auch durch die Anwesenheit von Cantharidin, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von HDL, zu einer erheblichen Steigerung des

Cholesterineffluxes kommt. Mit HDL ist der maximale Cholesterin-Massenefflux nicht stärker als der ohne HDL (nur in Anwesenheit des Phosphatase-Inhibitors). In den in Abbildung 5.39 dargestellten Ergebnissen ist der Efflux in Anwesenheit von HDL sogar geringfügig geringer (um 40 % des Basalwerts von 100 %. Dabei entsprechen 100 % dem Efflux von Cholesterin in Anwesenheit von 1 mg / ml Albumin). Bei niedrigen Inhibitor-Konzentrationen, die den Cholesterinefflux ohne Zugabe von HDL nicht beeinflussen, kommt es, wie schon mit Calyculin A und Okadasäure, in Anwesenheit von HDL zu einer deutlichen Verstärkung des Cholesterin-Masseneffluxes. Der Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins wird durch Cantharidin-Konzentrationen bis 50 μM in Anwesenheit von HDL ebenfalls stärker gesteigert als ohne HDL.

5.5.8.4. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Endothall

Auch Endothall ist ein Inhibitor der Protein-Phosphatasen der PPP- und PPM-Familie. Allerdings ist Endothall spezifisch für Phosphatasen der Gruppe PP2A [200]. Erst in sehr hohen Konzentrationen werden auch Phosphatasen der Gruppe PP1 durch Endothall gehemmt [201]. Über eine Wirkung von Endothall auf Phosphatasen der Gruppe PP2B ist nichts bekannt.

Abbildung 5.40 zeigt die Strukturformel von Endothall.

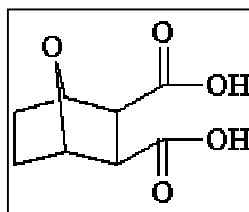


Abbildung 5.40: Strukturformel von Endothall.

Abbildung 5.41 zeigt die Wirkung von steigenden Konzentrationen Endothall auf den Cholesterin-Massenefflux.

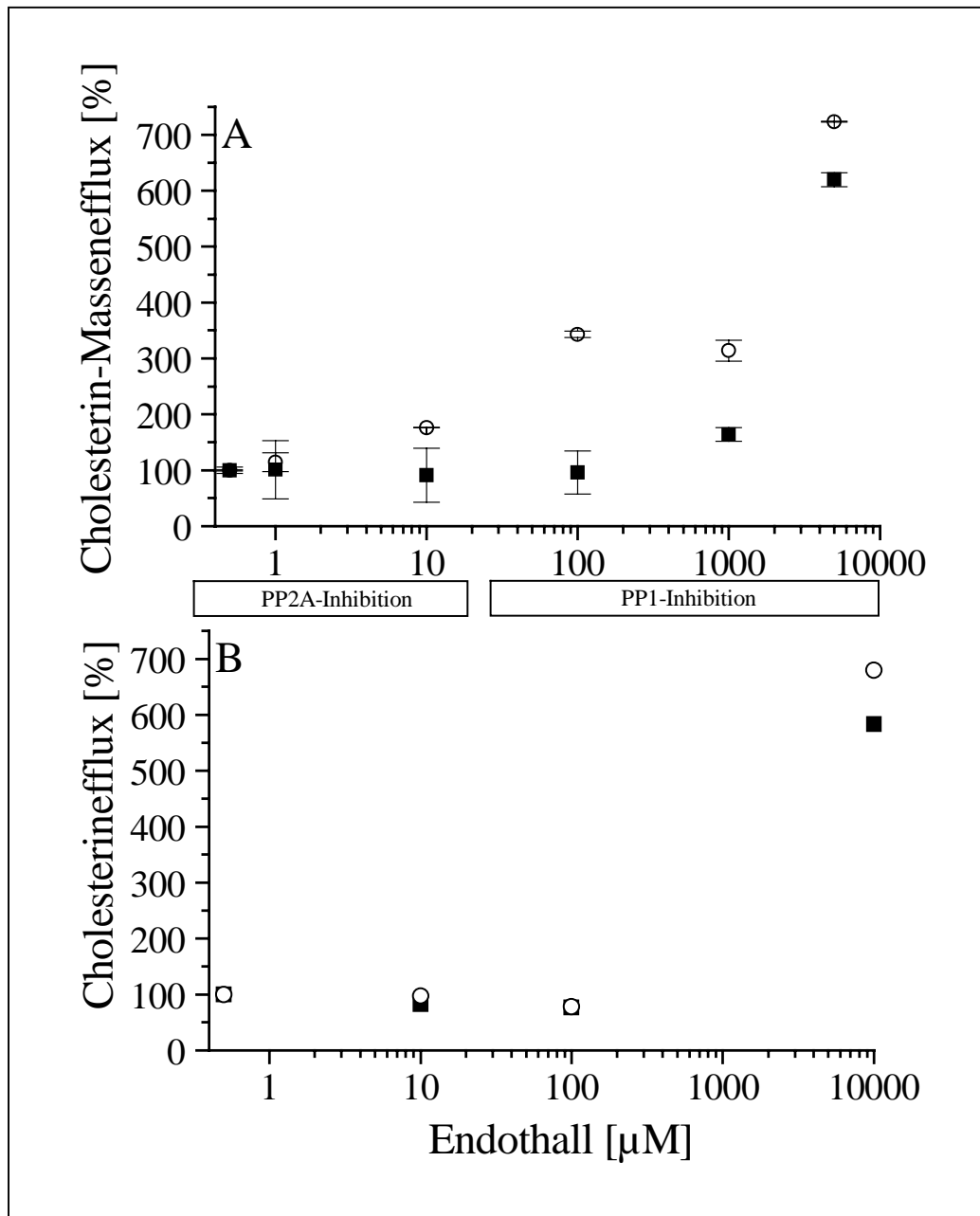


Abbildung 5.41: Cholesterinefflux in Abhängigkeit der Endothall-Konzentration. Dargestellt ist in Abb. A der Cholesterin-Massenefflux und in Abb. B der Efflux de novo synthetisierten Cholesterins in Medium mit 1 mg/ml Albumin (geschlossene Quadrate) bzw. in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL (offene Kreise). Direkt vor Zugabe der HDL wurde Endothall in den angegebenen Konzentrationen zu den Ansätzen hinzugegeben. Anschließend wurde der Versuch wie in Kapitel 4.2.4.5 bzw. 4.2.4.6 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle und Nullwert (100 %) wurde der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin bzw. 1 mg/ml Albumin und 20 µg/ml HDL ohne Zugabe eines Inhibitors genommen. Dies entspricht bei dem Ansatz ohne Zugabe von HDL $0,3 \pm 0,01$ µg Cholesterin pro mg Zellprotein (Abb. A) bzw. 3491 PSL (Abb. B) und $0,8 \pm 0,01$ µg bei dem Ansatz mit HDL (Abb. A) bzw. 8387 PSL in Abb. B. Bei den Werten in Abb. A wurde das in den HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen. Die Angaben zur Inhibition der PP1 und PP2A kennzeichnen die Konzentrationen, bei denen Endothall in anderen Zelltypen laut Literatur diesen Typ von Phosphatasen jeweils hemmt.

Die Abbildung verdeutlicht, daß es sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von HDL zu einer erheblichen Steigerung des Cholesterineffluxes durch Endothall kommt. Mit HDL ist der maximale relative Efflux geringfügig stärker (Abb. A: 730 % des Basalwert verglichen

mit 620 % des Basalwerts; Abb. B: 680 % verglichen mit 580 %. Dabei entsprechen 100 % dem Efflux von Cholesterin in Anwesenheit von 1 mg / ml Albumin ohne bzw. mit HDL). Bei niedrigen Inhibitor-Konzentrationen, die den Cholesterin-Massenefflux ohne Zugabe von HDL nicht beeinflussen, kommt es auch durch Endothall (wie schon in den vorherigen Kapiteln bei Okadasäure, Calyculin A und Cantharidin) zusammen mit HDL bereits zu einer deutlichen Verstärkung des Cholesterin-Masseneffluxes. Auch der Efflux *de novo* synthetisierten Cholesterins wird durch Cantharidin deutlich verstärkt (bis auf das 7-fache des Ausgangswertes).

5.5.9. Cholesterin-Massenefflux: Einfluß von Proteinphosphatasen der PTP-Familie

Proteinphosphatasen der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Familie dephosphorylieren Phosphotyrosinreste. Ihre Aktivität läßt sich durch Orthovanadat-Ionen hemmen [197]. Der folgende Versuch sollte überprüfen, ob auch Tyrosin-Phosphorylierungen bei dem HDL-induzierten Cholesterinefflux eine Rolle spielen.

Abbildung 5.42 zeigt das Ergebnis eines typischen Versuchs.

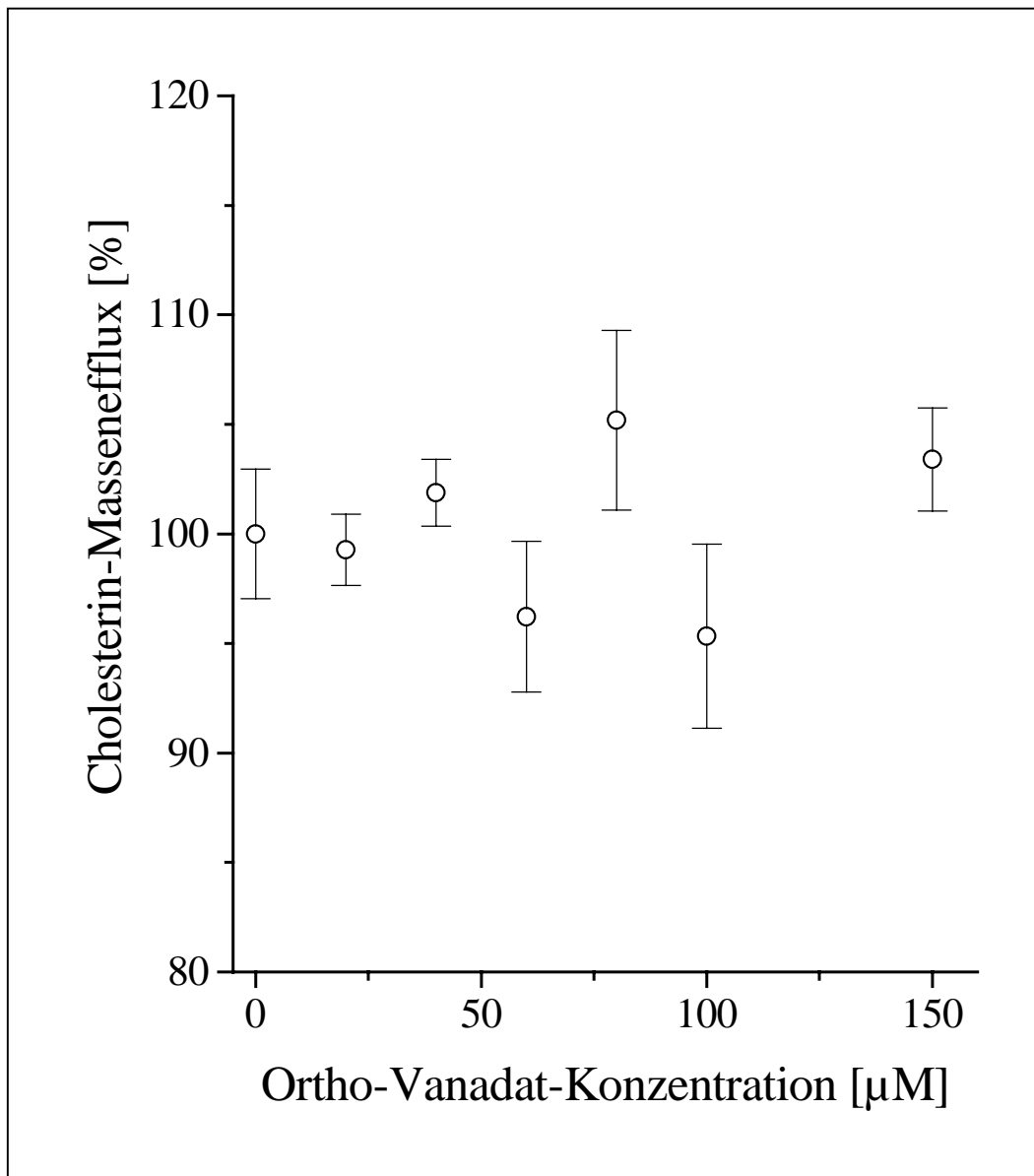


Abbildung 5.42: Cholesterin-Massenefflux in Abhängigkeit der Orthovanadat-Konzentration. Dargestellt ist der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1mg/ml Albumin und 20 $\mu\text{g/ml}$ HDL. Direkt vor Zugabe der HDL wurde Orthovanadat in den angegebenen Konzentrationen zu den Ansätzen hinzugegeben. Anschließend wurde der Versuch wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle und Nullwert (100%) wurde der Cholesterin-Massenefflux in Medium mit 1 mg/ml Albumin und 20 $\mu\text{g/ml}$ HDL ohne Zugabe von Ortho-Vanadat genommen. Dies entspricht bei diesem Versuch $0,9 \pm 0,03 \mu\text{g}$ Cholesterin pro mg Zellprotein. Bei diesem Wert wurde das in den HDL enthaltene Cholesterin bereits abgezogen.

Die Abbildung zeigt, daß sich der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux durch die Zugabe von Orthovanadat-Ionen nicht signifikant ändert.

5.6. Phosphataseaktivität in Fibroblasten

Zu den Wirkungen der meisten in dieser Arbeit durch Inhibitoren und Aktivatoren untersuchten Enzyme, wie z.B. PKC oder Phospholipasen, gibt es in der Literatur detaillierte Untersuchungen an humanen Hautfibroblasten. Eine Ausnahme hiervon bilden die Phosphatasen. Zwar gibt es Untersuchungen zu den Wirkungen der Phosphatase-Inhibitoren in humanen Hautfibroblasten, doch wurde hierbei nur die indirekte Wirkung der Phosphatase-Inhibitoren auf Genexpression [245, 335], Zellzyklus und -wachstum [3, 165], Proteinsynthese [181] und Zell-Zellverbindungen [297] beschrieben, also nur der jeweilige Effekt bei Anwesenheit eines Inhibitors. Nur wenig wurde über die Dephosphorylierung von definierten Proteinen in humanen Hautfibroblasten berichtet [106, 143]. Wir haben zunächst Voruntersuchungen durchgeführt, um die Aktivität der Phosphatasen in humanen Hautfibroblasten zu untersuchen. Hierzu haben wir den bekannten Einfluß der Phosphatase-Inhibitoren auf ubiquitär vorhandene Enzyme des Glykogenstoffwechsels untersucht.

Abbildung 5.43 zeigt die Hemmwirkung von Okadasäure, Calyculin A und Cantharidin auf zelluläre Phosphatasen menschlicher Hautfibroblasten.

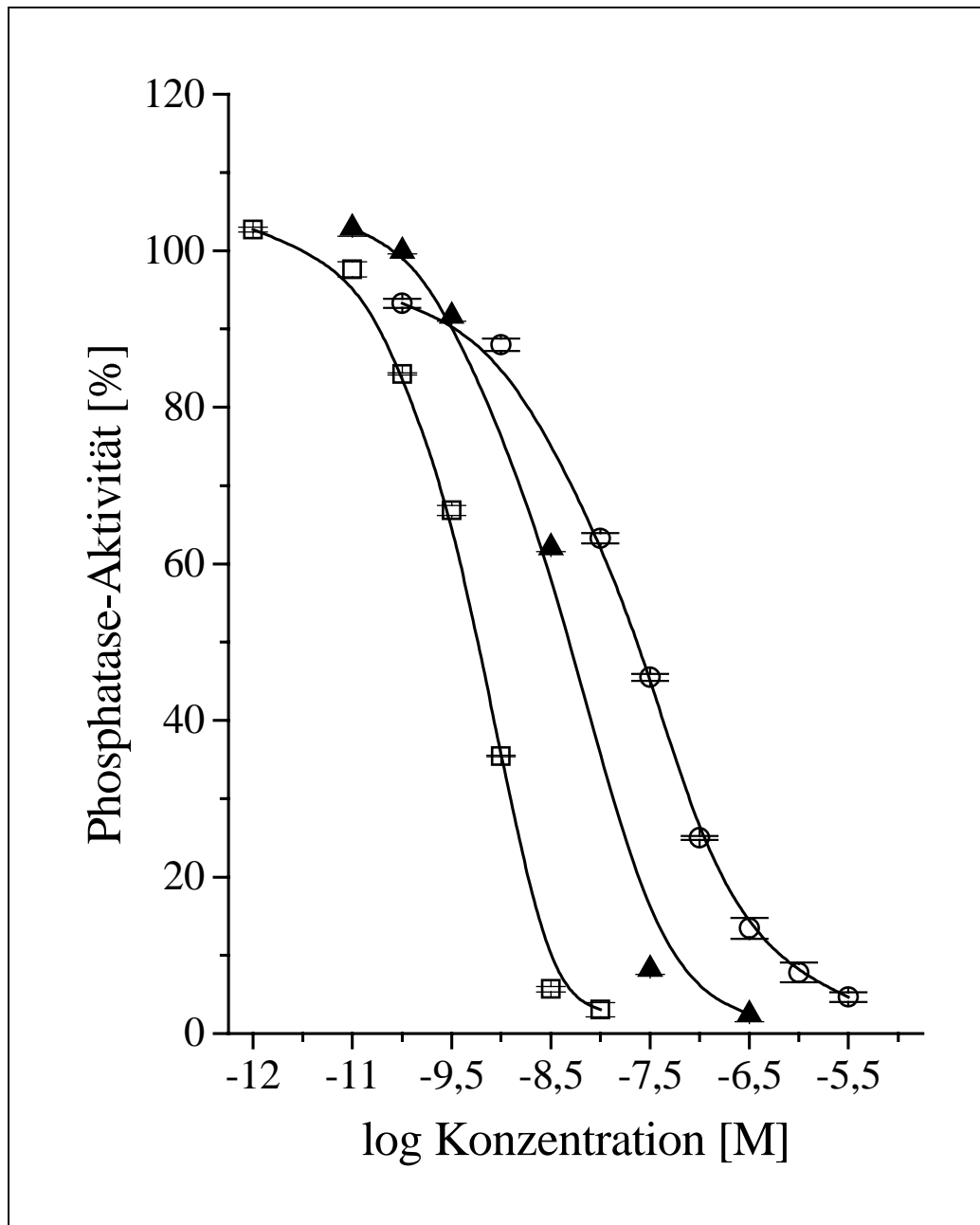


Abbildung 5.43: Inhibition zellulärer Phosphatasen menschlicher Hautfibroblasten durch Okadasäure, Cantharidin und Calyculin A. Dargestellt ist die Radioaktivität in der Zellmasse nach Inhibition der Proben mit Calyculin A (offene Quadrate), Okadasäure (geschlossene Dreiecke) und Cantharidin (offene Kreise). Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.5. beschrieben durchgeführt. Nullwert (100 %) entspricht der Radioaktivität in Ansätzen ohne Zugabe eines Inhibitors. Die IC_{50} -Werte der einzelnen Inhibitoren entsprechen: Cantharidin: 5×10^{-8} M; Calyculin A: 5×10^{-10} M; Okadasäure: 10^{-8} M.

Die Ergebnisse bestätigen, daß in humanen Hautfibroblasten Phosphatasen der PPP- und PPM-Familie vorkommen, die durch Calyculin A, Cantharidin und Okadasäure inhibiert werden (Abb. 5.34). Dabei ist die Wirkung von Calyculin A am größten: Es hemmt die Phosphatasen bereits bei einer Konzentration von 10^{-8} M vollständig. Okadasäure hemmt Phosphatasen bei einer Konzentration von 5×10^{-7} vollständig, Cantharidin bei einer Konzentration von 5×10^{-5} .

5.6.1. Phosphataseaktivität: Phosphorylierung zellulärer Proteine

Da zuvor gezeigt werden konnte, daß sowohl eine Protein-Kinase (Kapitel 5.5.1.) als auch Proteinphosphatasen (Kapitel 5.5.8.) am HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux beteiligt sind, wurde die Proteinphosphorylierung durch HDL, Apo-A-I und Phosphatase-Inhibitoren näher untersucht und miteinander verglichen.

Nachdem an Zellhomogenaten die Aktivität der Phosphatasen an Hand ubiquitär vorkommender Enzyme des Glykogenstoffwechsels nachgewiesen werden konnte (Kap. 5.6.), sollte nun die Phosphorylierung der zellulären Proteine *in vitro* gezeigt und mit der durch HDL und Apo-A-I induzierten Phosphorylierung verglichen werden.

5.6.1.1. Phosphataseaktivität: HDL-abhängige Proteinphosphorylierung

Abbildung 5.44 zeigt die Radioaktivitätsverteilung in einem Polyacrylamidgel nach Inkubation mit $\text{H}_3[^{32}\text{P}]\text{O}_4$ und HDL. Zur Verdeutlichung der Konzentrationsabhängigkeit der HDL-Wirkung wird die Phosphorylierung eines 18 kDa großen Proteins dargestellt.

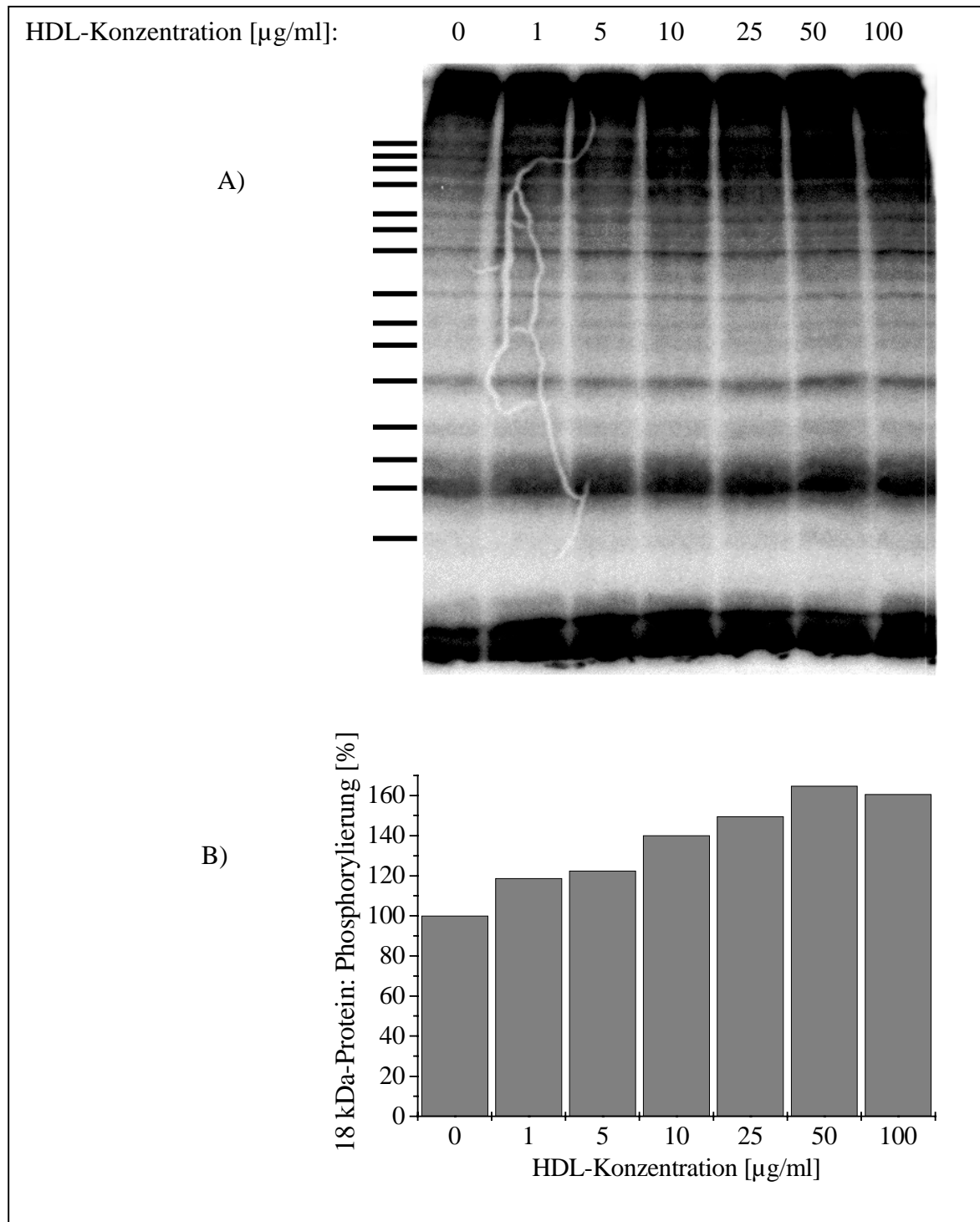


Abbildung 5.44: Phosphorylierung von Proteinen menschlicher Hautfibroblasten durch HDL. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.6. beschrieben durchgeführt. A) Polyacrylamidgel. Dargestellt ist die Radioaktivitätsverteilung der phosphorylierten Proteine. Dabei wurden die Zellen mit den über den Auftragsstellen angegebenen HDL-Konzentrationen inkubiert. Auf der linken Seite der Darstellung sind die Molekulargewichte 14, 18, 20, 23, 29, 34, 38, 42, 47, 51, 59, 65, 71, 75 und 81 kDa markiert. B) Graphische Darstellung der Radioaktivität innerhalb der Bande eines 18 kDa großen Proteins. 100 % entsprechen der Radioaktivität des Proteins in einer Probe ohne Zusatz von HDL.

Die Abbildung zeigt, daß der Phosphorylierungsgrad von vielen Proteinen durch HDL gesteigert wird. Die Phosphorylierung des 18 kDa-Proteins wird durch 100 $\mu\text{g/ml}$ HDL um das 1,6-fache gesteigert. Die Phosphorylierung von Proteinen mit anderem Molekulargewicht ist unterschiedlich stark. In Abbildung 5.44 wird die HDL-abhängige Phosphorylierung von

allen Proteinen dargestellt, deren Phosphorylierung sich um mehr als 40 % nach Zugabe von 100 µg/ml HDL gesteigert hat. Ein Phosphorylierungsgrad mit geringerer Steigerung wurde als nicht signifikant angesehen, weil die Varianz der Phosphorylierung ohne HDL maximal diesen Wert erreichte.

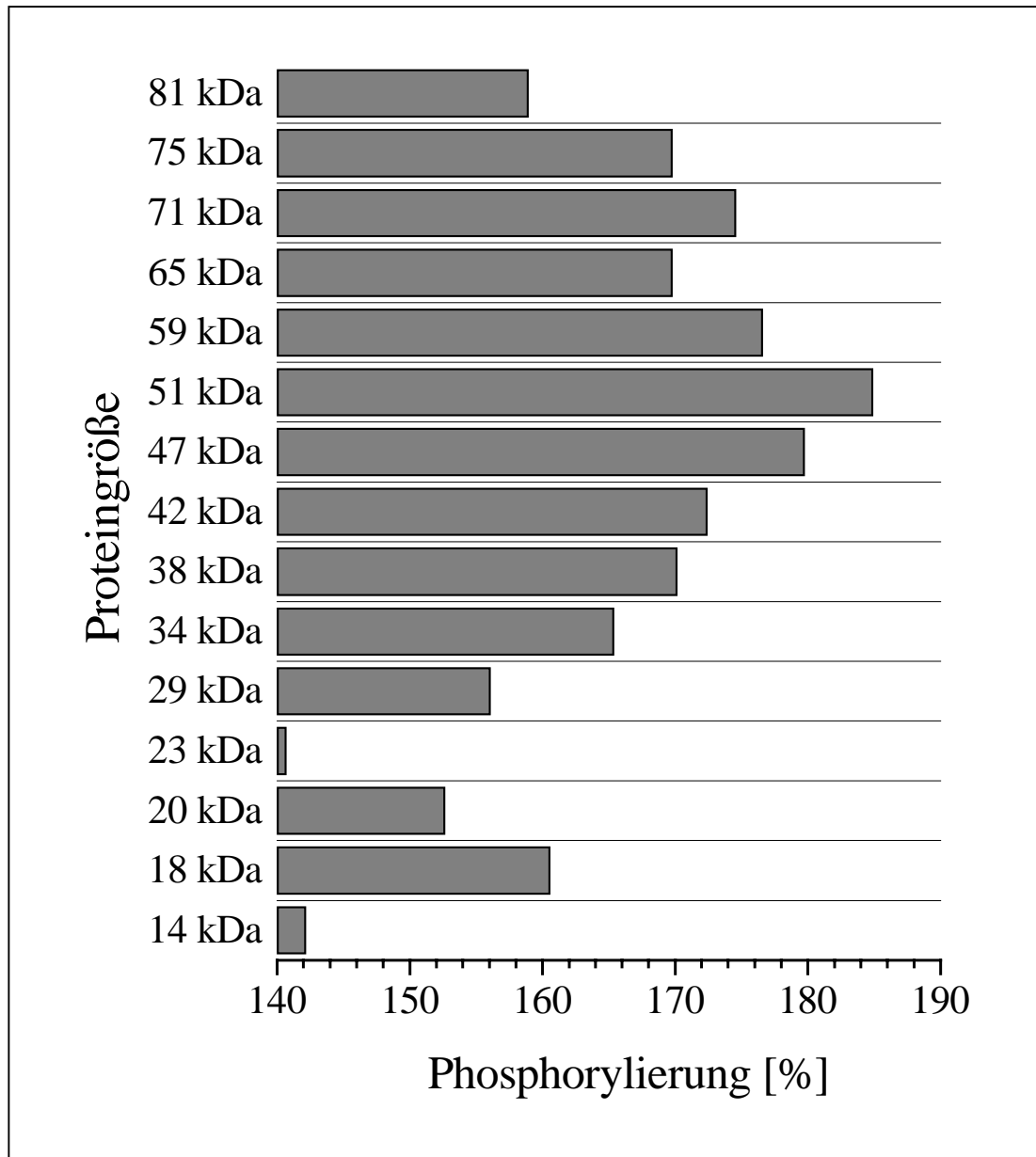


Abbildung 5.45: Phosphorylierung der Proteine in menschlichen Hautfibroblasten nach Zugabe von 100 µg/ml HDL. Der Versuch wurde wie Kapitel 4.2.6. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen in dieser Abbildung der Phosphorylierung ohne Zugabe von HDL. Aufgeführt sind nur die Proteine, deren Phosphorylierung sich um mehr als 40 % durch Zugabe von 100 µg/ml HDL gesteigert hat. Dargestellt ist jeweils nur die Phosphorylierung durch 100 mg/ml HDL.

Die Abbildung zeigt, daß HDL die Phosphorylierung von mindestens 15 Proteinen um mehr als 40 % steigern.

5.6.1.2. Phosphataseaktivität: TNM-HDL-abhängige Proteinphosphorylierung

Mittels Modifizierung der HDL durch Tetranitromethan wird die spezifische Interaktion der HDL mit den Zellen inhibiert [55]. Die Wirkung von TNM wurde bereits in Kapitel 4.2.2.2.1 beschrieben. Abbildung 5.46 zeigt die Radioaktivitätsverteilung in einem Polyacrylamidgel nach Inkubation mit $\text{H}_3[^{32}\text{P}]\text{O}_4$ und TNM-modifizierten HDL. Beispielhaft wird wieder die Phosphorylierung eines 18 kDa großen Proteins graphisch dargestellt.

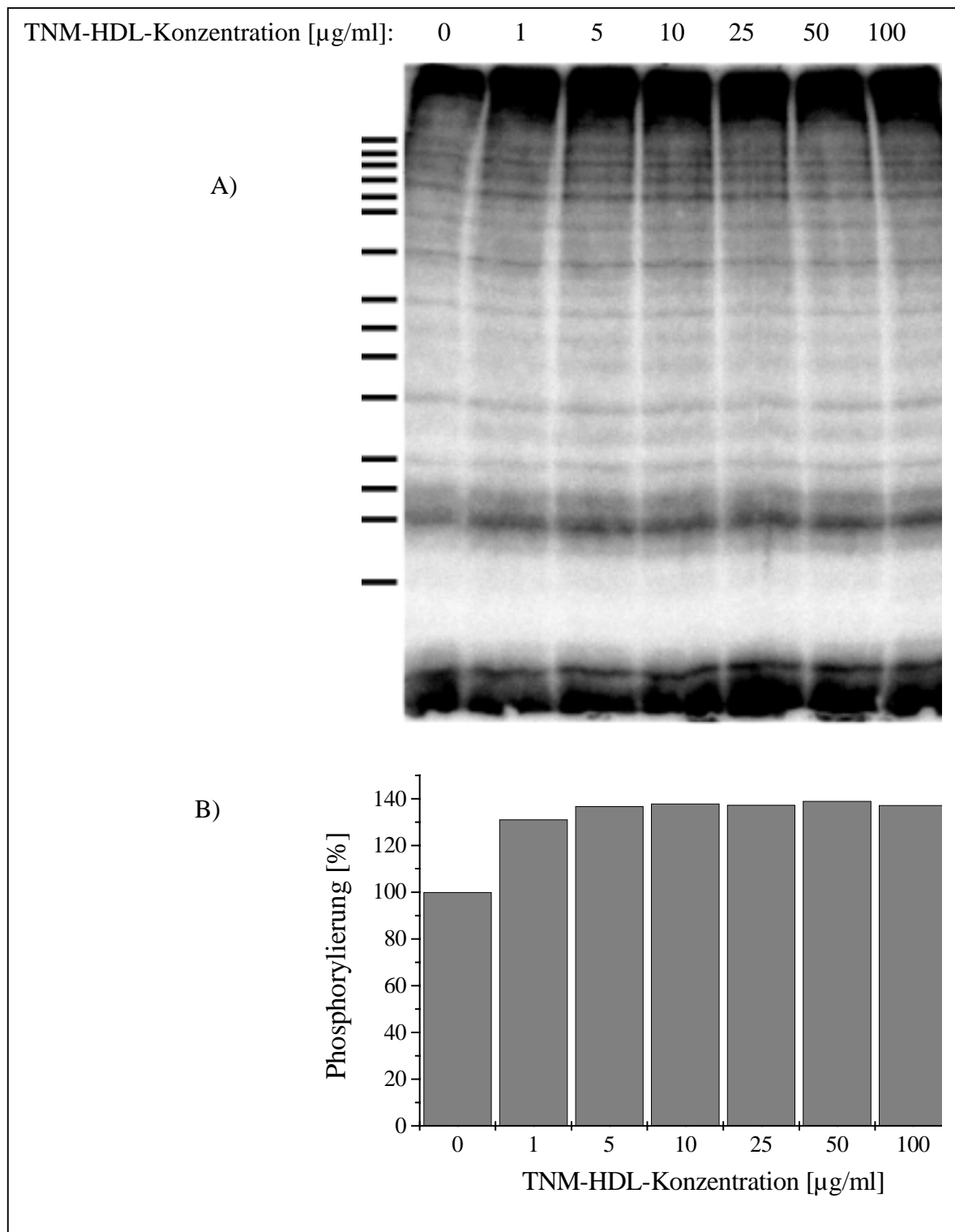


Abbildung 5.46: Phosphorylierung von Proteinen menschlicher Hautfibroblasten durch TNM-modifiziertes HDL. Die TNM-Modifizierung erfolgte wie in Kapitel 4.2.2.2.1. beschrieben. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.6. beschrieben durchgeführt. A) Polyacrylamidgel. Dargestellt ist die Radioaktivitätsverteilung der phosphorylierten Proteine. Dabei wurden die Zellen mit den über den Auftragungstellen angegebenen TNM-HDL-Konzentrationen inkubiert. Auf der linken Seite der Darstellung sind die Molekulargewichte 14, 18, 20, 23, 29, 34, 38, 42, 47, 51, 59, 65, 71, 75 und 81 kDa markiert. B) Graphische Darstellung der Radioaktivität innerhalb der Bande eines 18 kDa großen Proteins. 100 % entsprechen der Radioaktivität des Proteins in einer Probe ohne Zusatz von TNM-HDL.

Die Abbildung zeigt, daß der Phosphorylierungsgrad von nur sehr wenigen Proteinen durch TNM-HDL gesteigert wird. Die Phosphorylierung des 18 kDa-Proteins wird durch TNM-

HDL auf das 1,4-fache gesteigert. Die Phosphorylierung von Proteinen mit anderem Molekulargewicht ist noch schwächer. In Abbildung 5.47 wird die TNM-HDL-abhängige Phosphorylierung von allen Proteinen dargestellt, deren Phosphorylierung sich durch nicht modifizierte HDL um mehr als 40 % nach Zugabe von 100 µg/ml HDL gesteigert hat. Dabei entsprechen 100 % der Phosphorylierung des jeweiligen Proteins ohne Zugabe von TNM-HDL.

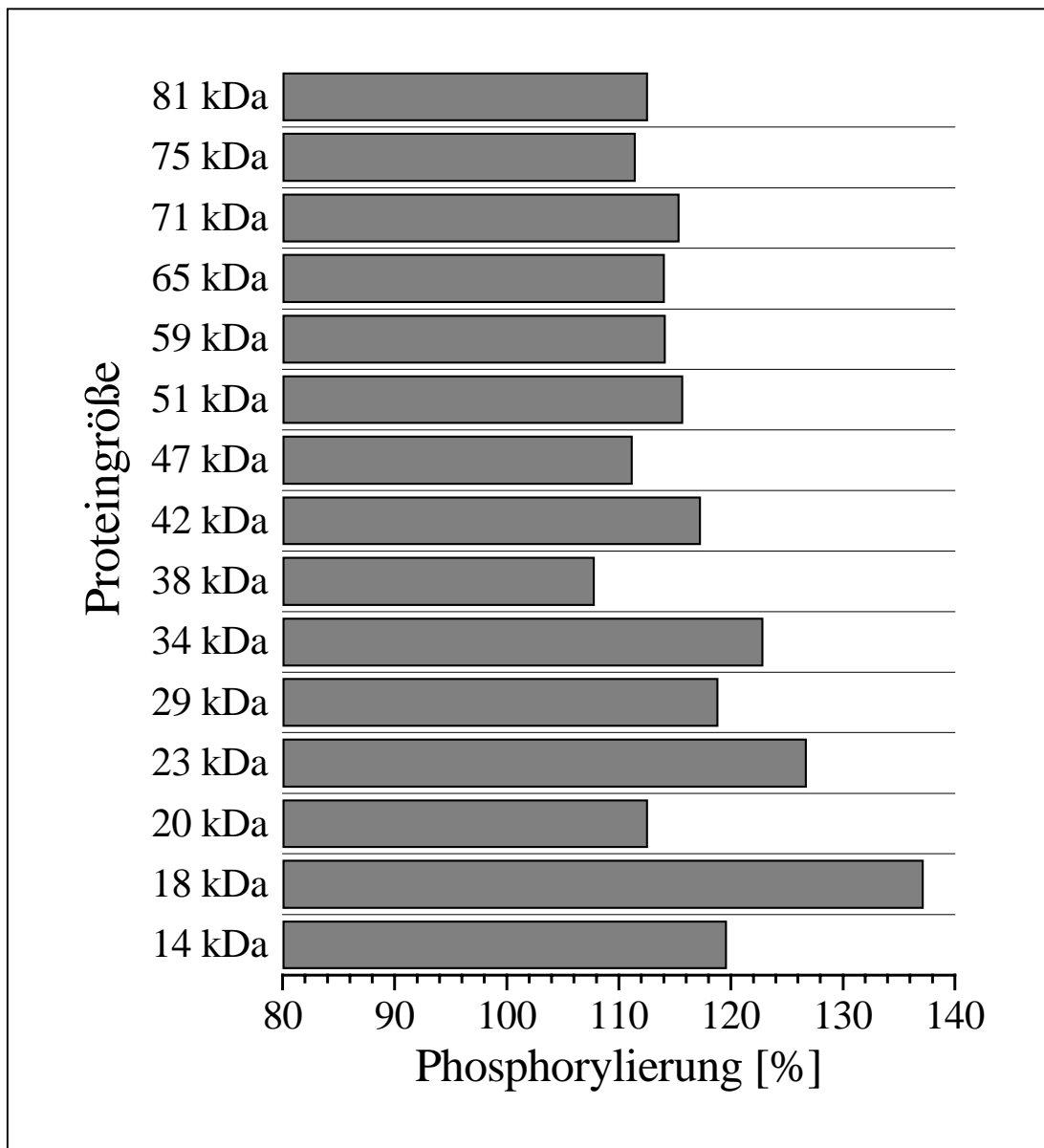


Abbildung 5.47: Phosphorylierung der Proteine in menschlichen Hautfibroblasten nach Zugabe von 100 µg/ml TNM-modifizierter HDL. Der Versuch wurde wie Kapitel 4.2.6. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen in dieser Abbildung der Phosphorylierung ohne Zugabe von TNM-HDL. Aufgeführt sind alle Proteine, die entsprechend in Abbildung 5.45 aufgeführt wurden. Dargestellt ist jeweils nur die Phosphorylierung durch 100 mg/ml TNM-HDL.

Die Abbildung zeigt, daß TNM-HDL die Phosphorylierung eines Proteins um mehr als 40 % steigert. Die tatsächliche Steigerung der Phosphorylierung liegt zwischen 7 und 37 %, also noch unterhalb des von uns definierten signifikanten Anstiegs.

5.6.1.3. Phosphataseaktivität: Apo-A-I-abhängige Proteinphosphorylierung

Abbildung 5.48 zeigt die entsprechende Grafik der Apo-A-I-abhängigen Proteinphosphorylierung. Auch hier wird zur Verdeutlichung der Konzentrationsabhängigkeit der Apo-A-I-Wirkung die Proteinbande eines 18 kDa großen Proteins dargestellt.

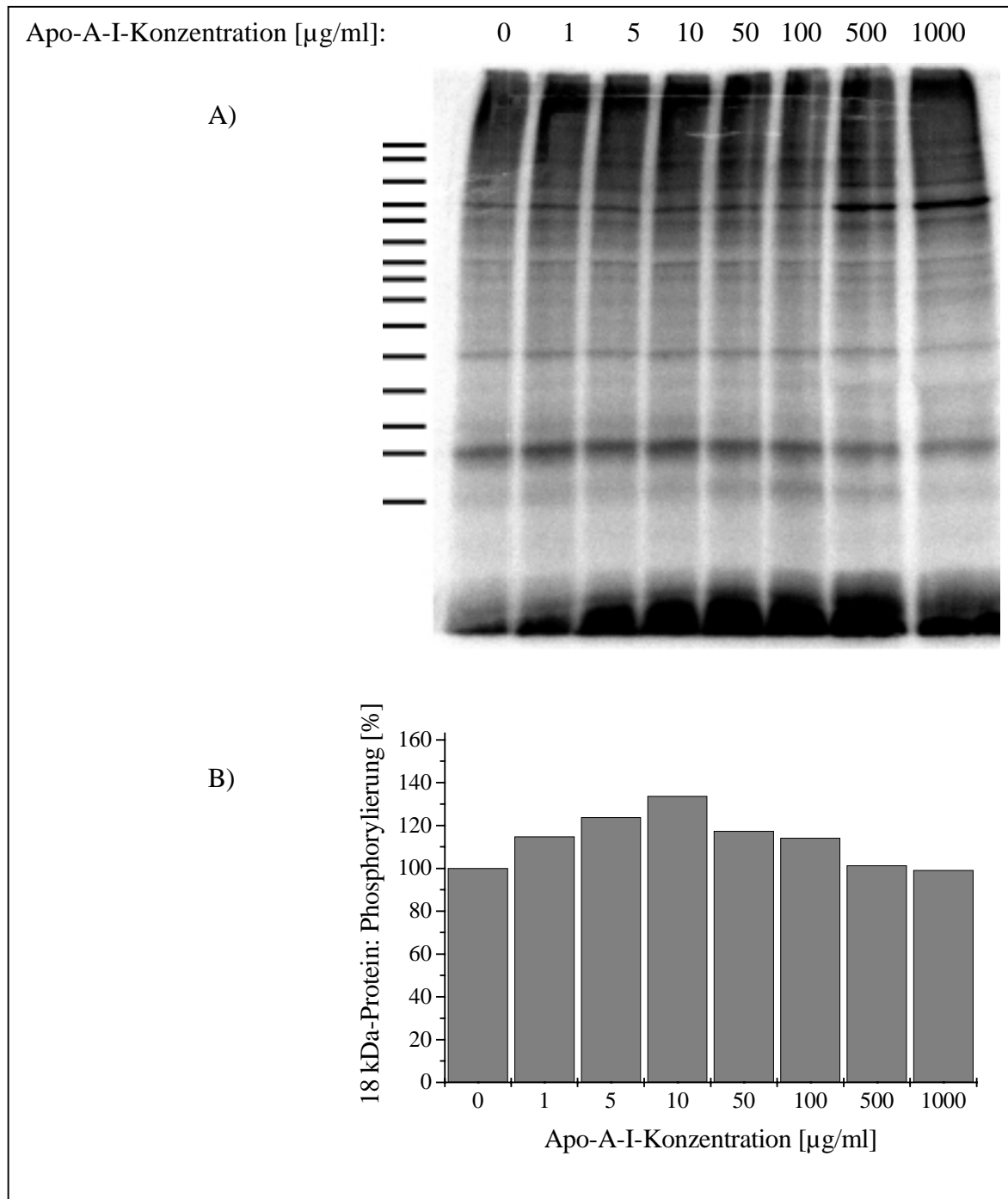


Abbildung 5.48: Phosphorylierung von Proteinen menschlicher Hautfibroblasten durch Apo-A-I. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.6. beschrieben durchgeführt. A) Polyacrylamidgel. Dargestellt ist die Radioaktivitätsverteilung der phosphorylierten Proteine. Dabei wurden die Zellen mit den über den Auftragungstellen angegebenen Apo-A-I-Konzentrationen inkubiert. Auf der linken Seite der Darstellung sind die Molekulargewichte 14, 18, 20, 23, 29, 34, 38, 42, 47, 51, 59, 65, 71, 75 und 81 kDa markiert. B) Graphische Darstellung der Radioaktivität innerhalb der Bande eines 18 kDa großen Proteins. 100 % entsprechen der Radioaktivität des Proteins in einer Probe ohne Zusatz von Apo-A-I.

In der Abbildung ist zu erkennen, daß mehrere Proteine durch Apo-A-I stärker phosphoryliert werden. Dabei fällt auf, daß die Phosphorylierung der Proteine mit Molekulargewichten bis 47 kDa bei 50 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ Apo-A-I am stärksten ist, und bei höheren Konzentrationen wieder sinkt, während die Phosphorylierung der Proteine ab einem Molekulargewicht von 51

kDa bei einer Apo-A-I-Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ am stärksten ist. Die Phosphorylierung des 18 kDa-Proteins wird durch Apo-A-I auf das 1,3-fache des Basalwertes (in Abwesenheit von Apo-A-I) gesteigert, was nach der obigen Definition nicht signifikant ist. Durch Apo-A-I werden Proteine mit folgendem Molekulargewicht signifikant im Konzentrationsbereich bis 100 $\mu\text{g/ml}$ phosphoryliert: 14 kDa, 65 kDa und 71 kDa. Dabei schwankt die Steigerung der Phosphorylierung dieser Proteine in diesem Konzentrationsbereich zwischen 45 und 260 %. Bei sehr hohen (unphysiologischen) Apo-A-I-Konzentrationen war die Phosphorylierung dieser drei Proteine noch stärker. In Abbildung 5.49 wird die Apo-A-I-abhängige Phosphorylierung von allen Proteinen dargestellt, deren Phosphorylierung sich um mehr als 40 % nach Zugabe von 100 $\mu\text{g/ml}$ Apo-A-I gesteigert hat. Dabei entsprechen 100 % der Phosphorylierung des jeweiligen Proteins ohne Zugabe von Apo-A-I.

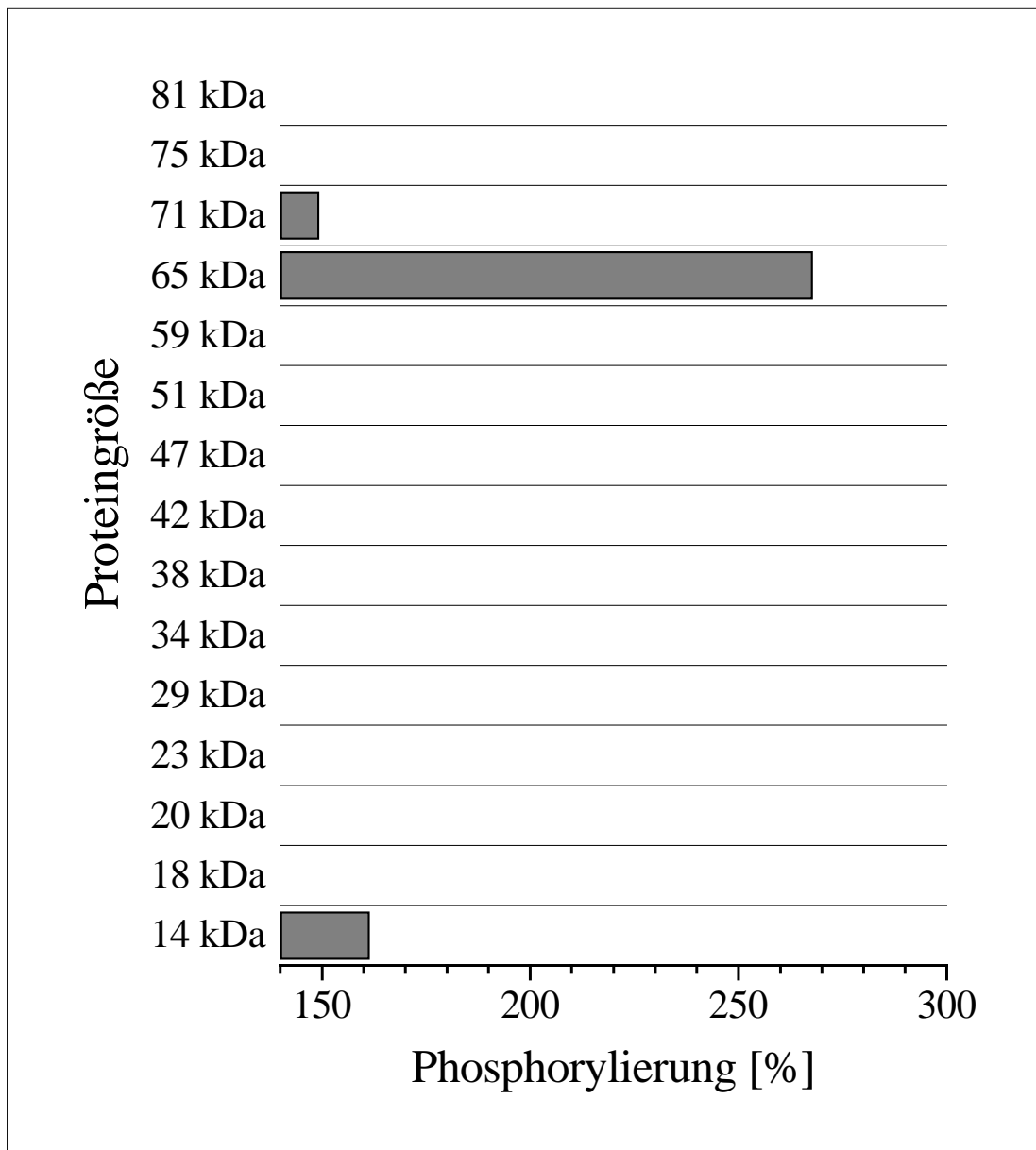


Abbildung 5.49: Phosphorylierung der Proteine in menschlichen Hautfibroblasten nach Zugabe von 100 µg/ml Apo-A-I. Der Versuch wurde wie Kapitel 4.2.6. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen in dieser Abbildung der Phosphorylierung ohne Zugabe von Apo-A-I. Aufgeführt sind nur die Proteine, deren Phosphorylierung sich um mehr als 40 % durch Zugabe von 100 µg/ml Apo-A-I gesteigert hat. Zum besseren Vergleich mit Kapitel 5.6.1.1. werden die Spalten der Proteine, die durch HDL aber nicht durch Apo-A-I um mehr als 40 % gesteigert wurden, mit angegeben.

Die Abbildung verdeutlicht, daß Apo-A-I die Phosphorylierung von 3 Proteinen um mehr als 40 % im Konzentrationsbereich von 100 µg/ml steigert. Verglichen mit der durch HDL induzierten Phosphorylierung, induziert Apo-A-I insgesamt eine schwächere Phosphorylierung von weniger Proteinen. Ausnahme hiervon ist die Phosphorylierung eines 65 kDa großen Proteins, daß durch sehr große Apo-A-I-Konzentrationen stark phosphoryliert wird.

5.6.1.4. Phosphataseaktivität: Calyculin A-abhängige Proteinphosphorylierung

Nachdem in Kapitel 5.5.8. gezeigt werden konnte, daß Phosphatase-Inhibitoren den Cholesterin-Massenefflux stark beeinflussen, sollte die Phosphorylierung zellulärer Proteine nach Zugabe von HDL, Apo-A-I und Phosphatase-Inhibitoren verglichen werden.

Abbildung 5.50 A zeigt die Radioaktivitätsverteilung in einem Polyacrylamidgel nach Inkubation mit $\text{H}_3[^{32}\text{P}]\text{O}_4$ und Calyculin A. In Abbildung 5.50 B wird die Phosphorylierung eines 65 kDa großen Proteins dargestellt, um die Calyculin A-Konzentrationsabhängigkeit der Phosphorylierung zu zeigen.

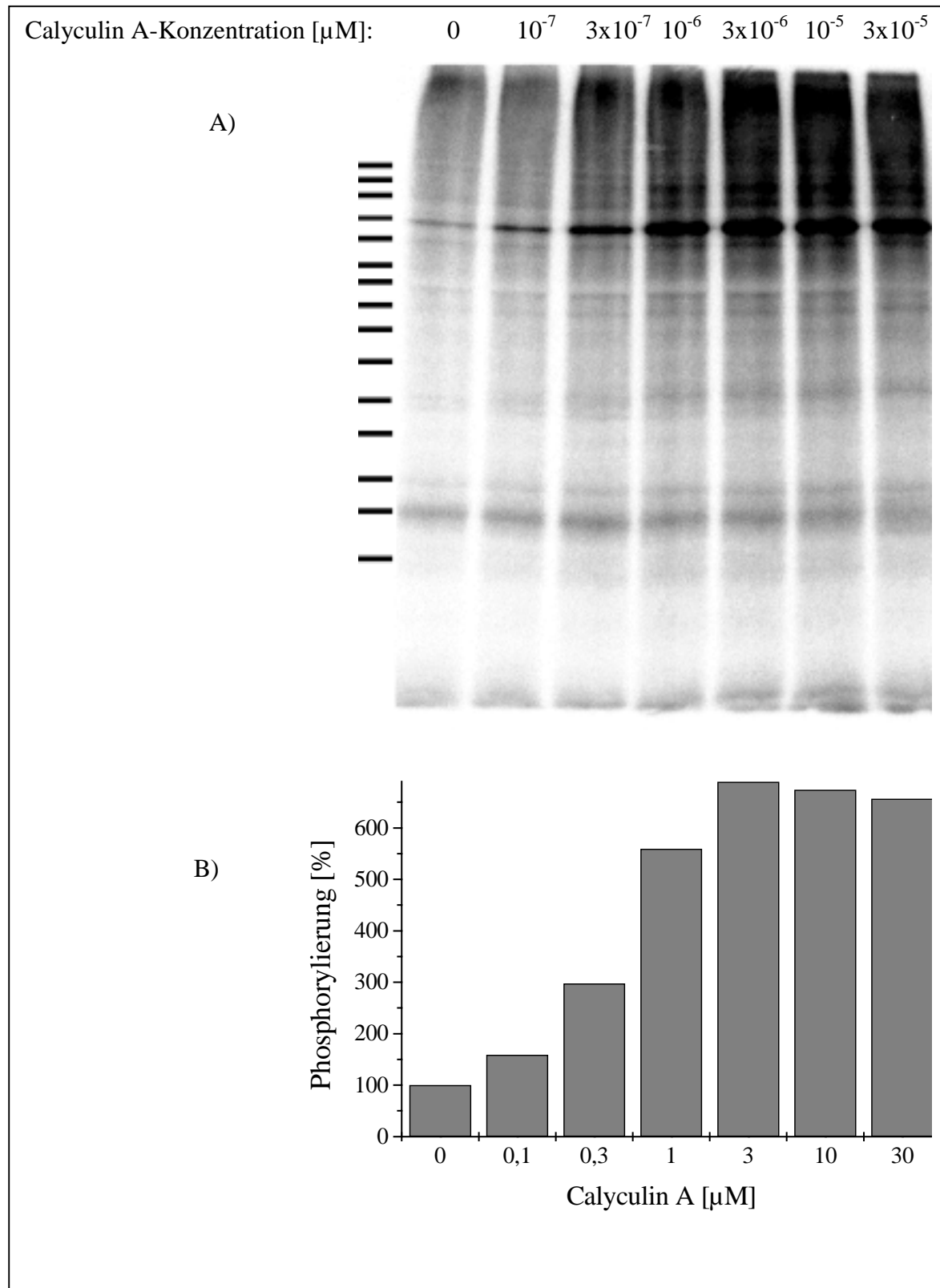


Abbildung 5.50: Phosphorylierung von Proteinen menschlicher Hautfibroblasten durch Calyculin A. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.6. beschrieben durchgeführt. A) Polyacrylamidgel. Dargestellt ist die Radioaktivitätsverteilung der phosphorylierten Proteine. Dabei wurden die Zellen mit den über den Auftragungstellen angegebenen Calyculin A-Konzentrationen inkubiert. Auf der linken Seite der Darstellung sind die Molekulargewichte 14, 18, 20, 23, 29, 34, 38, 42, 47, 51, 59, 65, 71, 75 und 81 kDa markiert. B) Graphische Darstellung der Radioaktivität innerhalb der Bande des 65 kDa großen Proteins. 100 % entsprechen der Radioaktivität des Proteins in einer Probe ohne Zusatz von Calyculin A.

Die Abbildung zeigt, daß viele Proteine durch Calyculin A phosphoryliert werden. Die besonders auffällige Phosphorylierung eines 65 kDa-Proteins wird durch 3 µM Calyculin A auf das 6,9-fache gesteigert. Die Phosphorylierung der anderen Proteine ist weniger ausgeprägt. In Abbildung 5.51 wird die Calyculin A-abhängige Phosphorylierung der Proteine dargestellt, deren Phosphorylierungsgrad sich durch nicht modifizierte HDL um mehr als 40 % nach Zugabe von 100 µg/ml HDL gesteigert hat. Dabei entsprechen 100 % der Phosphorylierung des jeweiligen Proteins ohne Zugabe von Calyculin A. Dargestellt ist die Phosphorylierung der Proteine nach Zugabe von 30 µM Calyculin A.

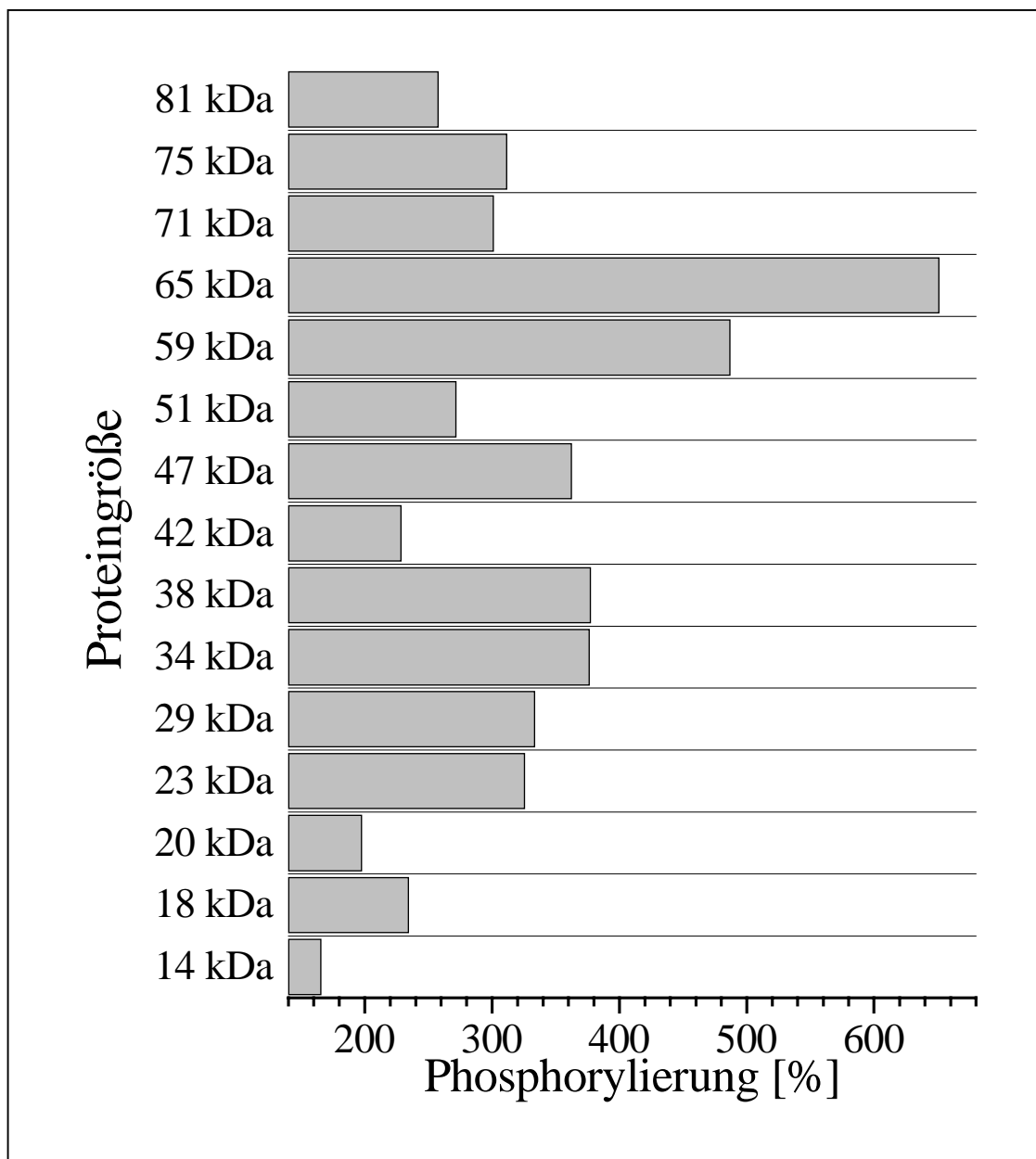


Abbildung 5.51: Phosphorylierung der Proteine in menschlichen Hautfibroblasten nach Zugabe von 30 µM Calyculin A. Der Versuch wurde wie Kapitel 4.2.6. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen in dieser Abbildung der Phosphorylierung ohne Zugabe von Calyculin A. Aufgeführt sind alle Proteine, die entsprechend in Abbildung 5.45 aufgeführt wurden.

Die Abbildung zeigt, daß durch Calyculin A die Phosphorylierung u.a. der Proteine, die durch HDL phosphoryliert wurden, ebenfalls deutlich gesteigert wird. Die tatsächliche Steigerung der Phosphorylierung liegt zwischen 65 und 560 %. Besonders auffällig ist die Steigerung der Phosphorylierung des 65 kDa-Proteins, dessen Phosphorylierungsgrad um 560 % erhöht wurde. Alle dargestellten Proteine werden durch Calyculin A stärker phosphoryliert als durch HDL. Calyculin A verstärkt auch die Phosphorylierung weiterer Proteine, die jedoch nicht weiter untersucht wurden, da nur die Proteine verglichen werden sollten, die durch HDL verstärkt phosphoryliert wurden.

5.6.1.5. Phosphataseaktivität: Okadasäure-abhängige Proteinphosphorylierung

Abbildung 5.52 A zeigt die Radioaktivitätsverteilung in einem Polyacrylamidgel nach Inkubation mit $\text{H}_3[^{32}\text{P}]\text{O}_4$ und Okadasäure. In Abbildung 5.52 B wird die Phosphorylierung eines 65 kDa großen Proteins graphisch dargestellt.

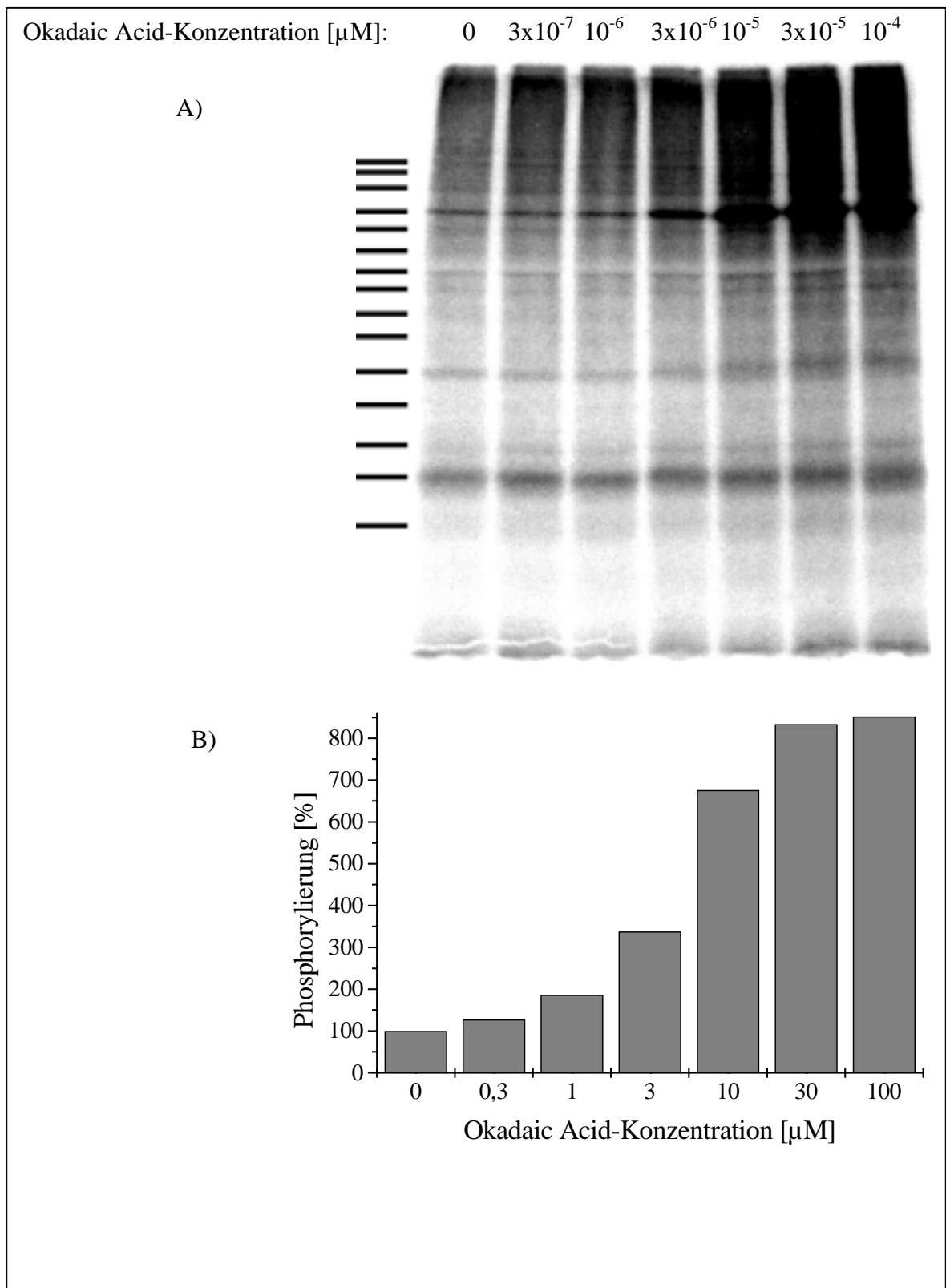


Abbildung 5.52: Phosphorylierung von Proteinen menschlicher Hautfibroblasten durch Okadasäure. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.6. beschrieben durchgeführt. A) Polyacrylamidgel. Dargestellt ist die Radioaktivitätsverteilung der phosphorylierten Proteine. Dabei wurden die Zellen mit den über den Auftragungstellen angegebenen Okadasäure-Konzentrationen inkubiert. Auf der linken Seite der Darstellung sind die Molekulargewichte 14, 18, 20, 23, 29, 34, 38, 42, 47, 51, 59, 65, 71, 75 und 81 kDa markiert. B) Graphische Darstellung der Radioaktivität innerhalb der Bande eines 65 kDa großen Proteins. 100 % entsprechen der Radioaktivität des Proteins in einer Probe ohne Zusatz von Okadasäure.

Die Abbildung zeigt, daß, wie in Kapitel 5.6.1.4. durch Calyculin A, auch durch Okadasäure sehr viele Proteine phosphoryliert werden. Die besonders auffällige Phosphorylierung des 65 kDa-Proteins wird durch Okadasäure auf das 8,5-fache des Basalwertes gesteigert. Die Phosphorylierung der anderen Proteinen ist weniger stark. In Abbildung 5.53 wird die Okadasäure-abhängige Phosphorylierung von Proteinen dargestellt, die durch 100 µg/ml HDL um mehr als 40 % phosphoryliert wurden. Dabei entsprechen 100 % der Phosphorylierung des jeweiligen Proteins ohne Zugabe von Okadasäure.

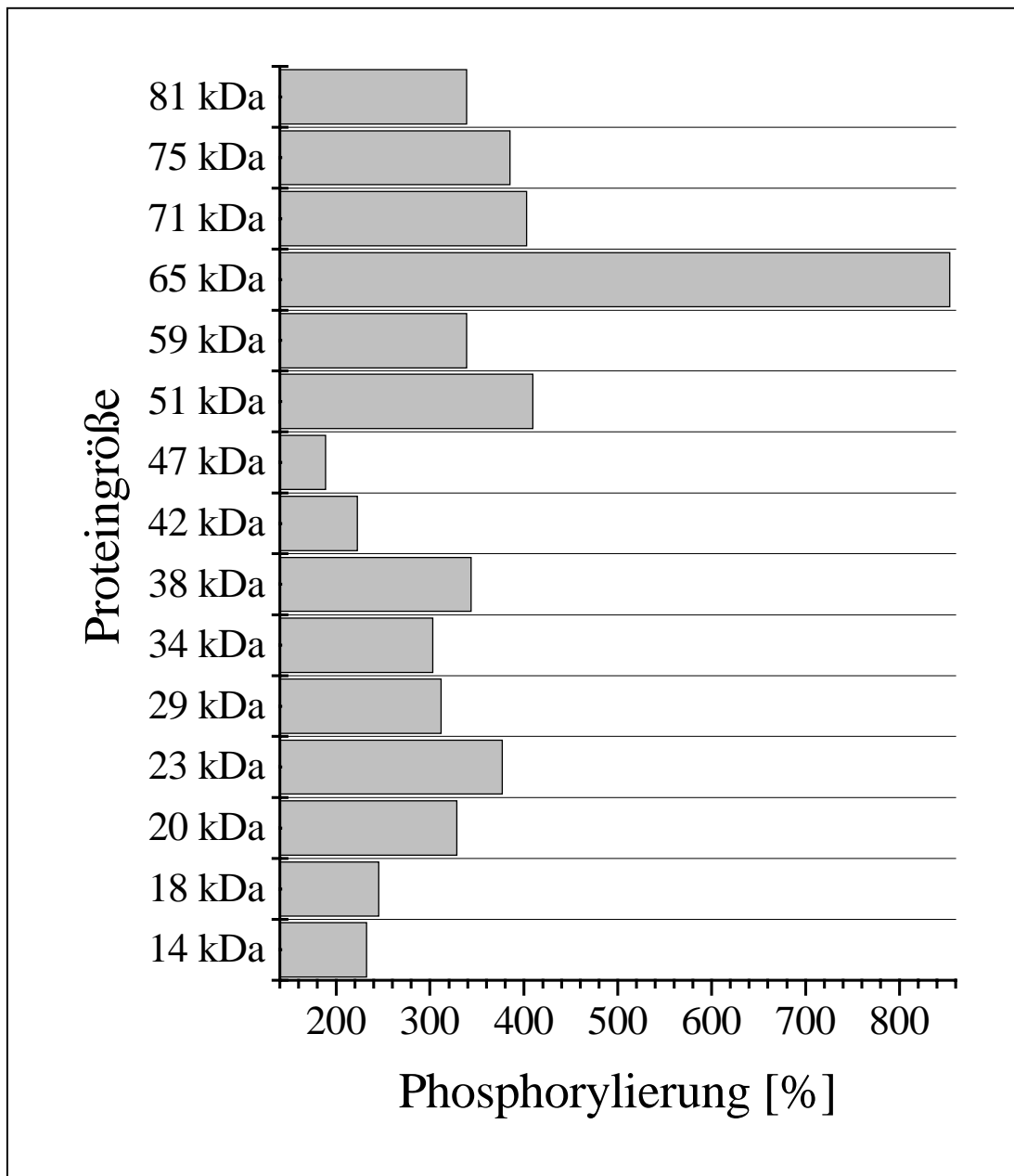


Abbildung 5.53: Phosphorylierung der Proteine in menschlichen Hautfibroblasten nach Zugabe von 100 µM Okadasäure. Der Versuch wurde wie Kapitel 4.2.6. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen in dieser Abbildung der Phosphorylierung ohne Zugabe von Okadasäure. Aufgeführt sind die Proteine, die entsprechend in Abbildung 5.45 aufgeführt wurden.

Die Abbildung zeigt, daß Okadasäure die Phosphorylierung aller Proteine, deren Phosphorylierungsgrad durch HDL um mehr als 40 % gesteigert wurde, ebenfalls steigert. Die Steigerung der Phosphorylierung liegt zwischen 80 und 750 %. Am stärksten ist (siehe Kapitel 5.6.1.4.) auch hier die Steigerung der Phosphorylierung des 65 kDa-Proteins, dessen Phosphorylierungsgrad durch Okadasäure auf das 8,5-fache gesteigert wurde. Alle Proteine werden durch Okadasäure stärker phosphoryliert als durch HDL.

5.6.1.6. Phosphataseaktivität: Cantharidin-abhängige Proteinphosphorylierung

Abbildung 5.54 A zeigt die Radioaktivitätsverteilung in einem Polyacrylamidgel nach Inkubation mit $\text{H}_3[^{32}\text{P}]\text{O}_4$ und Cantharidin. In Abbildung 5.54 B wird die Phosphorylierung des 65 kDa Proteins graphisch dargestellt, um die Cantharidin-Konzentrationsabhängigkeit der Phosphorylierung zu verdeutlichen.

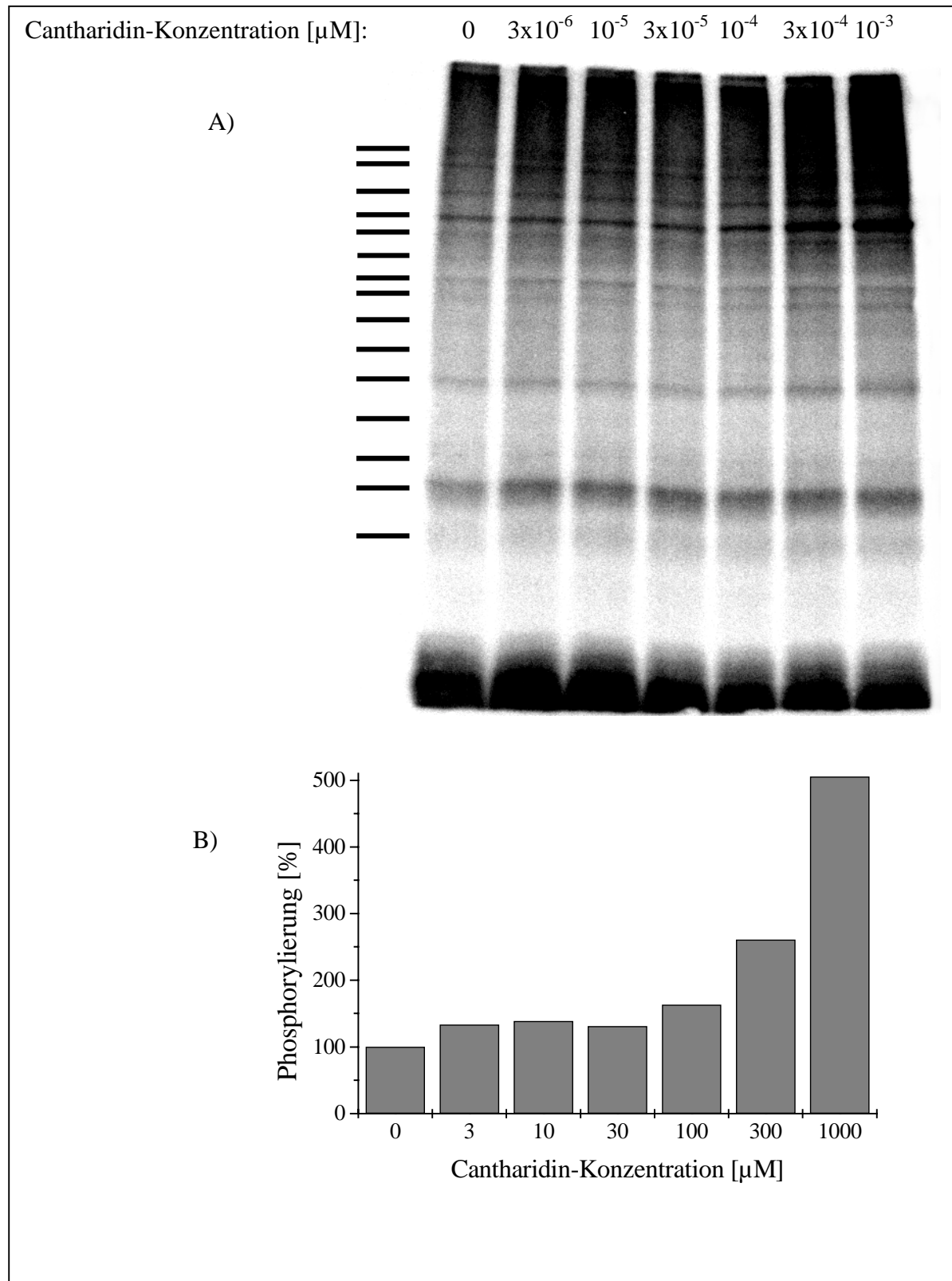


Abbildung 5.54: Phosphorylierung von Proteinen menschlicher Hautfibroblasten durch Cantharidin. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.6. beschrieben durchgeführt. A) Polyacrylamidgel. Dargestellt ist die Radioaktivitätsverteilung der phosphorylierten Proteine. Dabei wurden die Zellen mit den über den Auftragungstellen angegebenen Cantharidin-Konzentrationen inkubiert. Auf der linken Seite der Darstellung sind die Molekulargewichte 14, 18, 20, 29, 34, 38, 42, 47, 51, 59, 65, 71, 75 und 81 kDa markiert. B) Graphische Darstellung der Radioaktivität innerhalb der Bande des 65 kDa großen Proteins. 100 % entsprechen der Radioaktivität des Proteins in einer Probe ohne Zusatz von Cantharidin.

Es wird deutlich, daß auch durch Cantharidin alle durch HDL phosphorylierbaren Proteine phosphoryliert werden. Die besonders auffällige Phosphorylierung des 65 kDa-Proteins wird durch Cantharidin auf das 5-fache gesteigert. Die Phosphorylierung der anderen Proteine ist weniger stark. In Abbildung 5.55 wird die Cantharidin-abhängige Phosphorylierung von den Proteinen dargestellt, deren Phosphorylierung durch 100 µg/ml HDL um mehr als 40 % relativ zum Basalwert (Phosphorylierung ohne Inhibitor) gesteigert wurde. 100 % entsprechen der Phosphorylierung des jeweiligen Proteins ohne Zugabe von Cantharidin.

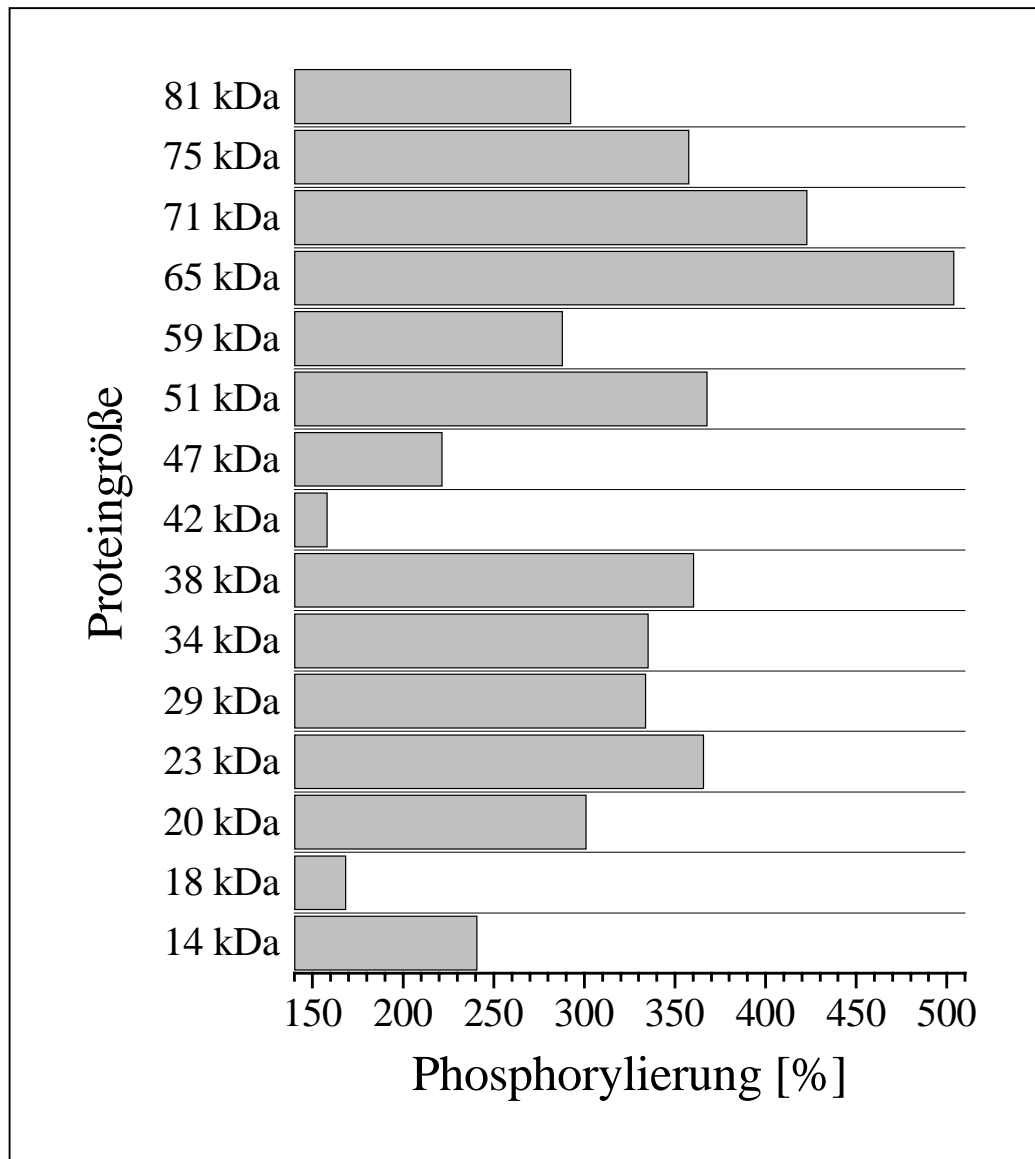


Abbildung 5.55: Phosphorylierung der Proteine in menschlichen Hautfibroblasten nach Zugabe von 1000 µM Cantharidin. Der Versuch wurde wie Kapitel 4.2.6. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen in dieser Abbildung der Phosphorylierung ohne Zugabe von Cantharidin. Aufgeführt sind alle Proteine, die entsprechend in Abbildung 5.45 aufgeführt wurden.

Die Steigerung der Phosphorylierung liegt zwischen 60 und 400 %. Am stärksten ist wiederum die Steigerung der Phosphorylierung des 65 kDa-Proteins.

5.7. Mitogene Aktivität der HDL

An verschiedenen Zelltypen war *in vitro* nachgewiesen worden, daß HDL einen mitogenen Effekt ausüben können [42, 43, 53, 104, 105, 129, 138, 176, 177, 242]. So wurde an glatten Gefäßmuskelzellen eine erhöhte Zellproliferationsrate nach Inkubation mit HDL sowie eine erhöhte Inkorporationsrate von radioaktiv markiertem Thymidin festgestellt, welches als Maß für die DNA-Synthese-Aktivität gilt [264]. Es sollte daher untersucht werden, welche der durch HDL ausgelösten Signalwege die mitogene Wirkung der HDL vermitteln. Dazu wurde zunächst überprüft, ob HDL das Zellwachstum bei dem von uns verwendeten Zelltyp (menschliche Hautfibroblasten) anregen. Hinweise waren bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe gefunden worden. So induziert HDL die PI-PLC vermittelte Hydrolyse von PIP₂, wobei dieser Signaltransduktionsweg nicht die Cholesterinhomöostase beeinflusste. Da dieser Signalweg auch durch andere mitogene Agonisten, wie z.B. EGF, aktiviert wird, wurde arbeitshypothetisch angenommen, daß der mögliche mitogene Effekt der HDL ebenfalls über diese zelluläre Signalkaskade vermittelt wird.

5.7.1. Mitogene Aktivität der HDL: Konzentrationsabhängigkeit

Zunächst wurde das Zellwachstum in Abhängigkeit von der Konzentration der HDL, Apo-A-I, Apo-A-II und TNM-modifizierten HDL untersucht.

Für die Experimente zur Bestimmung des Zellwachstums wurde der „Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“-Kit der Firma Boehringer benutzt. Bei diesem Test wird während der DNA-Replikation Bromdeoxyuridin anstelle von Thymidin in die DNA inkorporiert, durch Antikörper nachgewiesen und so die mitogene Aktivität der HDL indirekt über die DNA-Syntheserate gemessen.

Abbildung 5.56 zeigt das durch den Einbau von Bromdeoxyuridin nachgewiesene Zellwachstum in Abhängigkeit von der HDL, Apo-A-I-, Apo-A-II- und TNM-HDL-Konzentration.

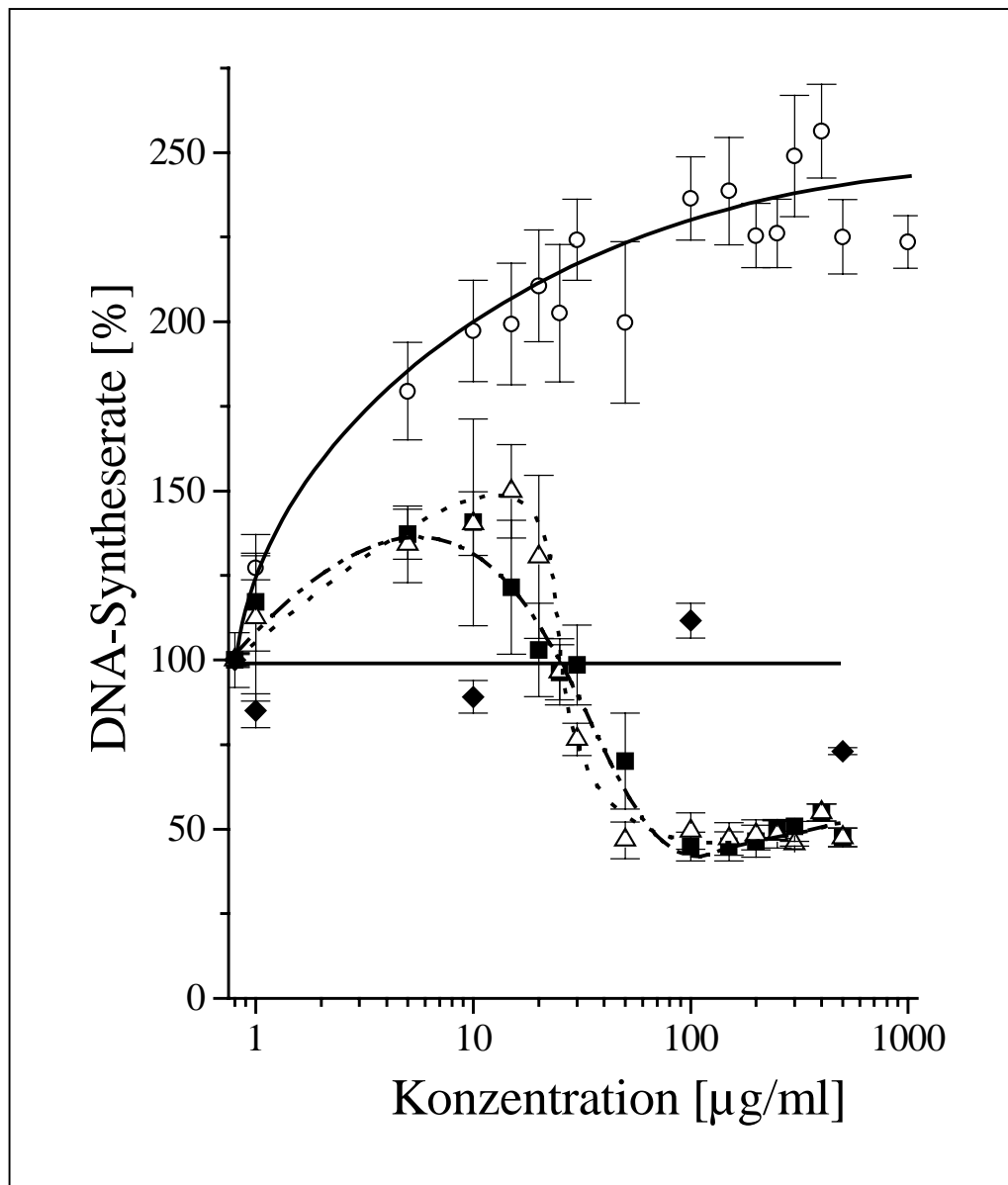


Abbildung 5.56: DNA-Syntheserate von humanen Hautfibroblasten in Abhängigkeit von der HDL-, Apo-A-I-, Apo-A-II- und TNM-HDL-Konzentration. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. Dargestellt ist das HDL-abhängige (offene Kreise mit geschlossener Linie), das Apo-A-I-abhängige (geschlossene Quadrate mit gestrichelter Linie), das Apo-A-II-abhängige (offene Dreiecke mit gepunkteter Linie) und das TNM-HDL-abhängige (geschlossene Rauten mit durchgängiger Linie) Zellwachstum, gemessen durch die Quantifizierung des Einbaus von BrdU in die DNA. 100 % entsprechen der DNA-Syntheserate ohne Zugabe von Agonisten.

Abbildung 5.56 zeigt, daß HDL bis zu einer Konzentration von 1000 µg/ml konzentrationsabhängig den Einbau von BrdU in die DNA verstärken. Bei Konzentrationen bis 1000 µg/ml wurden keine sichtbaren zelltoxischen Effekte beobachtet. Apo-A-I und Apo-A-II induziert im Konzentrationsbereich von 1 bis 15 µg/ml eine geringe Verstärkung des Einbaus von BrdU in die DNA der Zellen. Bei mittleren Konzentrationen von 20 bis 30 µg/ml zeigten sie keine signifikante Wirkung auf das Zellwachstum, und bei Konzentrationen über 30 µg/ml wirkten sie hemmend auf die DNA-Syntheserate der Zellen. Tetranitromethan-modifizierte HDL (TNM-HDL) zeigten keine Steigerung der BrdU-Inkorporation in die DNA.

Abbildung 5.57 zeigt die DNA-Syntheserate in humanen Hautfibroblasten nach Zugabe von Proteinen, die aus HDL isoliert wurden. Dazu wurden HDL delipidiert und die zurückbleibenden Proteine in PBS aufgenommen.

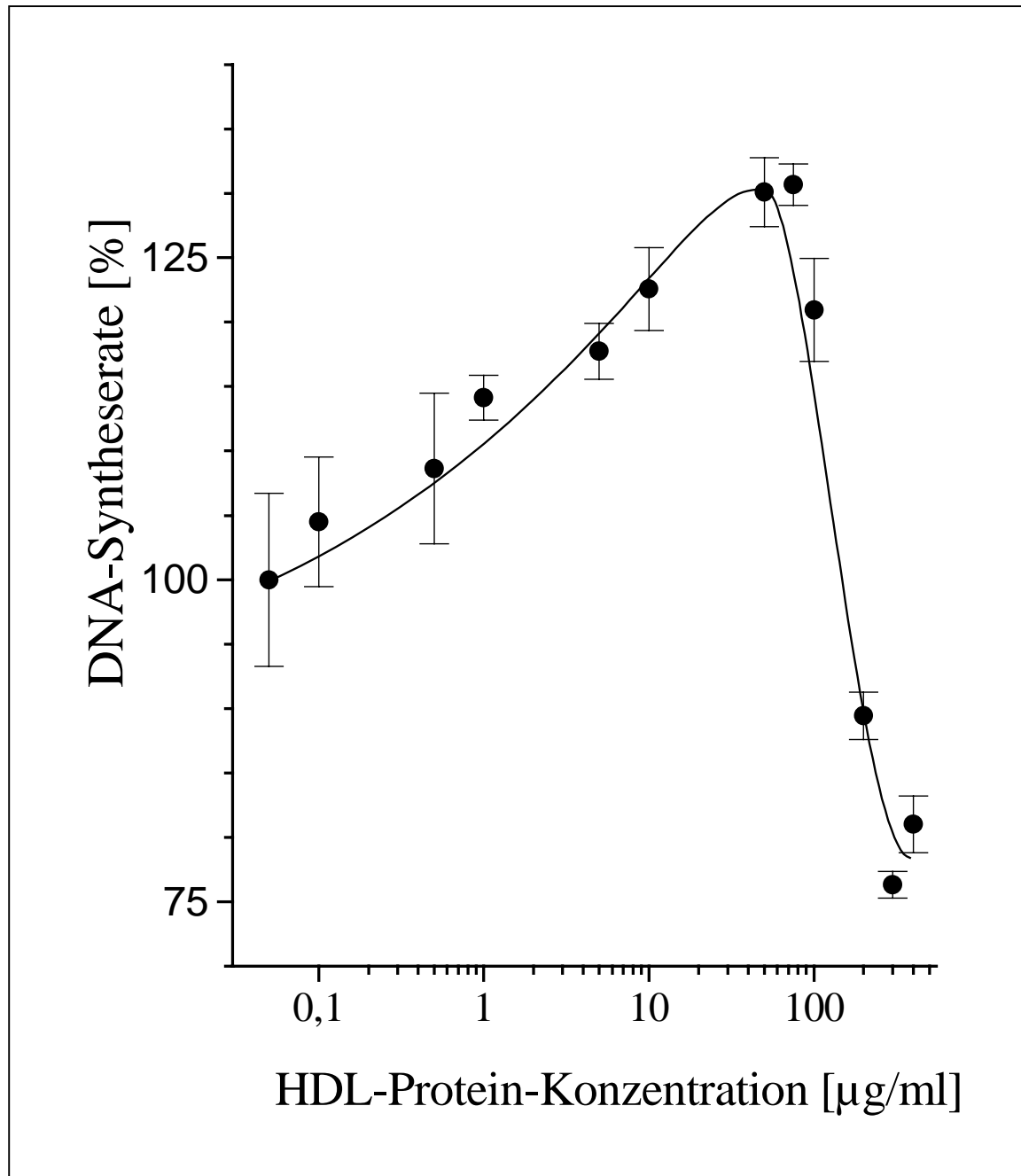


Abbildung 5.57: DNA-Syntheserate in humanen Hautfibroblasten in Abhängigkeit von der HDL-Protein-Konzentration. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen der DNA-Syntheserate ohne Zugabe von Agonisten.

Die Abbildung zeigt, daß die DNA-Syntheserate durch die in den HDL befindlichen Proteine bei geringen Konzentrationen bis etwa 100 µg/ml um etwa 30 % gesteigert wird. Dieser Wert entsprach in etwa der in Abbildung 5.56 dargestellten maximalen Inkorporation von BrdU in die DNA durch Apo-A-I und Apo-A-II. Bei Konzentrationen > 100 µg/ml wirkte der Proteinanteil auf den HDL leicht hemmend auf die BrdU-Inkorporation.

Wir untersuchten ferner, ob der Lipidanteil der HDL einen Einfluß auf die mitogene Aktivität der HDL hat. Hierzu isolierten wir die Lipide der HDL wie in Kapitel 4.2.2.4 beschrieben. Die Lipide wurden in Liposomen (ohne Proteinanteil), die nach der Methode von Ana Jonas [175] hergestellt wurden, auf die Zellen gegeben.

Wir untersuchten außerdem den Einfluß von Liposomen mit einem Proteinanteil von Apo-A-I bzw. Apo-A-II und kommerziell erhältlichen Phospholipiden (DPPC). Zur Kontrolle dieser Ansätze wurden Liposomen mit DPPC ohne Proteinanteil hergestellt und eingesetzt.

Abbildung 5.58 zeigt den Einbau von BrdU in DNA in Abhängigkeit von HDL-Liposomen, Apo-A-I-Proteoliposomen, Apo-A-II-Proteoliposomen und Liposomen aus DPPC.

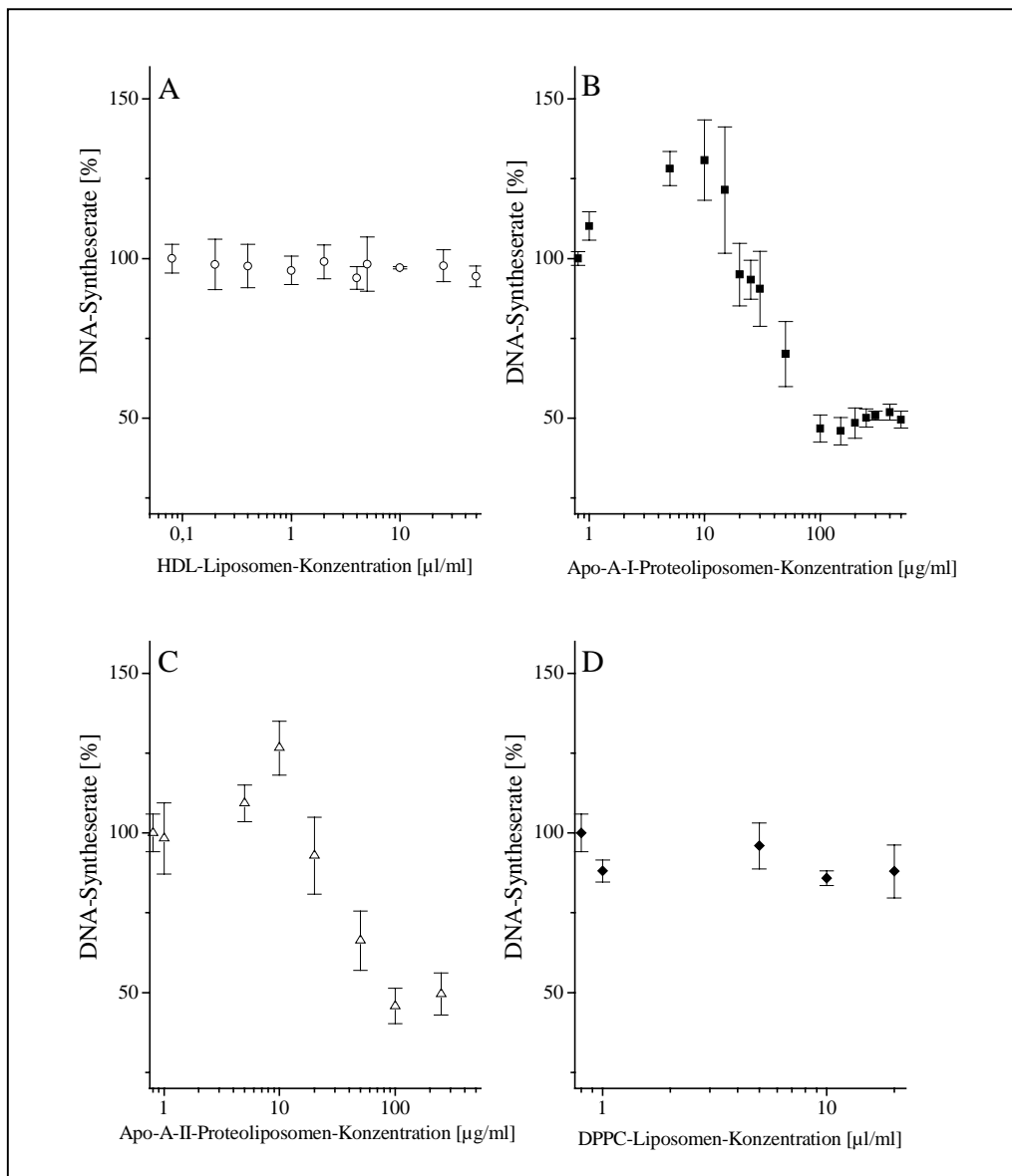


Abbildung 5.58: DNA-Syntheserate in humanen Hautfibroblasten in Abhängigkeit von der HDL-Liposomen-Konzentration (A), der Apo-A-I-Proteoliposomen-Konzentration (B), der Apo-A-II-Proteoliposomen-Konzentration (C) und der DPPC-Liposomen-Konzentration (D). Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen der DNA-Syntheserate ohne Zugabe von Agonisten.

Abbildung 5.58 zeigt, daß die aus HDL isolierte Lipide keinen Einfluß auf die Inkorporation von BrdU in die DNA hatten. Apo-A-I-Proteoliposomen und Apo-A-II-Proteoliposomen zeigten eine ähnliche Beeinflussung der DNA-Syntheserate wie freies Apo-A-I und Apo-A-II. Entsprechende Kontroll-Liposomen (ohne Proteinanteil) zeigten keine Wirkung auf die DNA-Syntheserate.

Da sich bei der Herstellung von Liposomen aus HDL-Lipiden mehrere Schwierigkeiten zeigten, wie z.B. den Verlust bestimmter Lipide bei der Aufarbeitung (durch Akkumulation an der Grenzschicht zwischen polarem und unpolarem Lösungsmittel, durch Diffusion bei der Dialyse u.ä.), wurden weitere Untersuchungen der Lipide der HDL durchgeführt. In der Literatur wurden mehrere, nicht auf HDL vorkommende Lipide beschrieben, die in anderen

Zelltypen ein Zellwachstum auslösen konnten. Dies waren Sphingosylphosphorylcholin [71, 91, 92, 206, 298], Sphingosin-1-phosphat [131, 160, 266, 304], Lysophosphatidsäure [131], Lactosylceramid [1, 146, 184] und Glukosylceramid [184]. Keines dieser Lipide ist jedoch ein Bestandteil der HDL. Okajima und Kondo [247] zeigten jedoch, daß sowohl Sphingosylphosphorylcholin als auch Lysosulphatide die PI-PLC aktivieren. Nachdem an unserem Institut gezeigt werden konnte, daß Lysosulphatide ein Bestandteil der HDL sind [Nofer und Fobker, Daten nicht veröffentlicht], wurde der Einfluß von Lysosulphatiden auf das Zellwachstum untersucht.

Abbildung 5.59 zeigt die DNA-Syntheserate nach Zugabe von Lysosulphatiden.

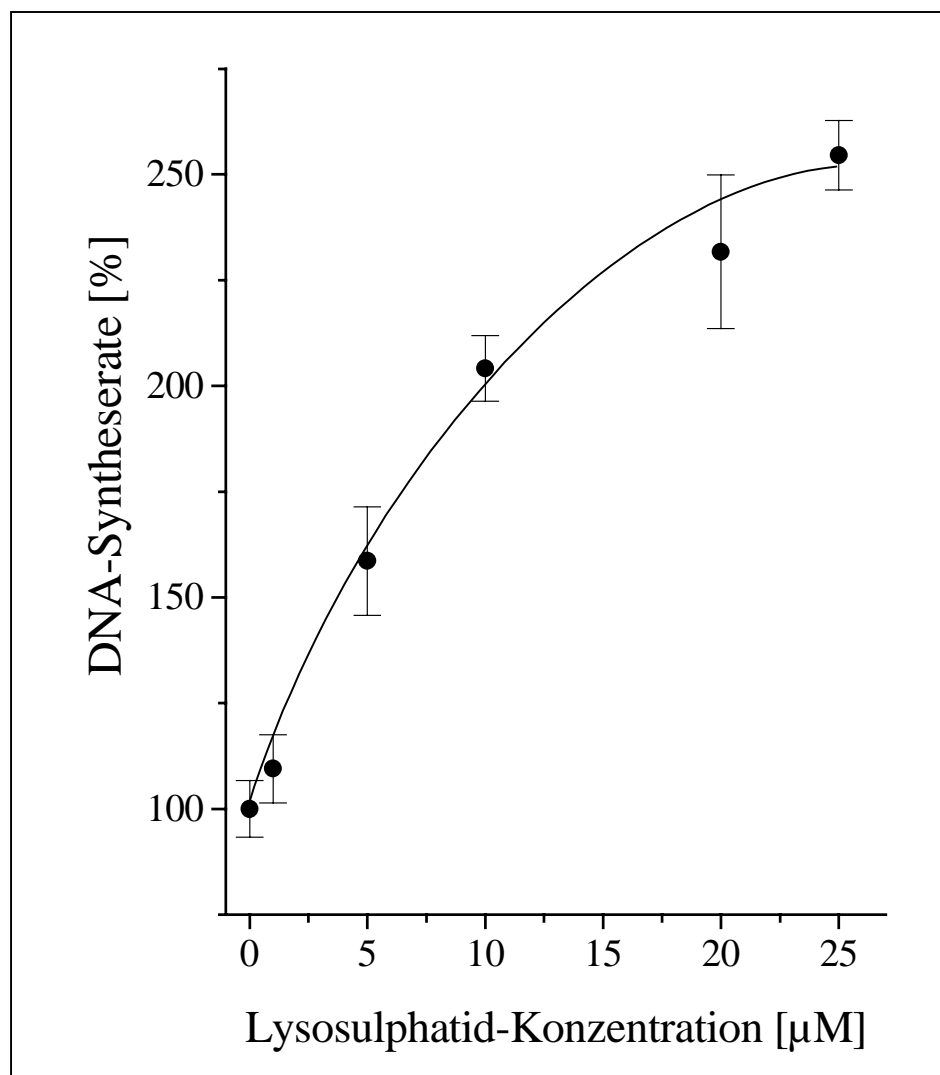


Abbildung 5.59: DNA-Syntheserate in humanen Hautfibroblasten in Abhängigkeit der Lysosulphatid-Konzentration. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen der DNA-Syntheserate ohne Zugabe von Agonisten.

Abbildung 5.59 zeigt, daß Lysosulphatide den Einbau von BrdU in die DNA der Zellen um über 200 % steigert. Das Maximum entspricht etwa der durch HDL erreichten mitogenen Aktivität (Abbildung 5.56).

5.7.1.1. Mitogene Aktivität der HDL: Vergleich von Tangier- und Kontrollzellen

Nachdem in Kapitel 5.4. gezeigt werden konnte, daß sich der HDL-induzierte Cholesterinefflux aus Kontroll- und Tangierzellen deutlich unterscheidet, sollte nun auch untersucht werden, ob Tangierzellen auch ein anderes Wachstumsverhalten als Kontrollzellen zeigen. Abbildung 5.60 zeigt einen Vergleich zwischen der DNA-Syntheserate von Kontrollzellen und Tangierzellen nach Zugabe von HDL, Apo-A-I, Apo-A-II und TNM-HDL.

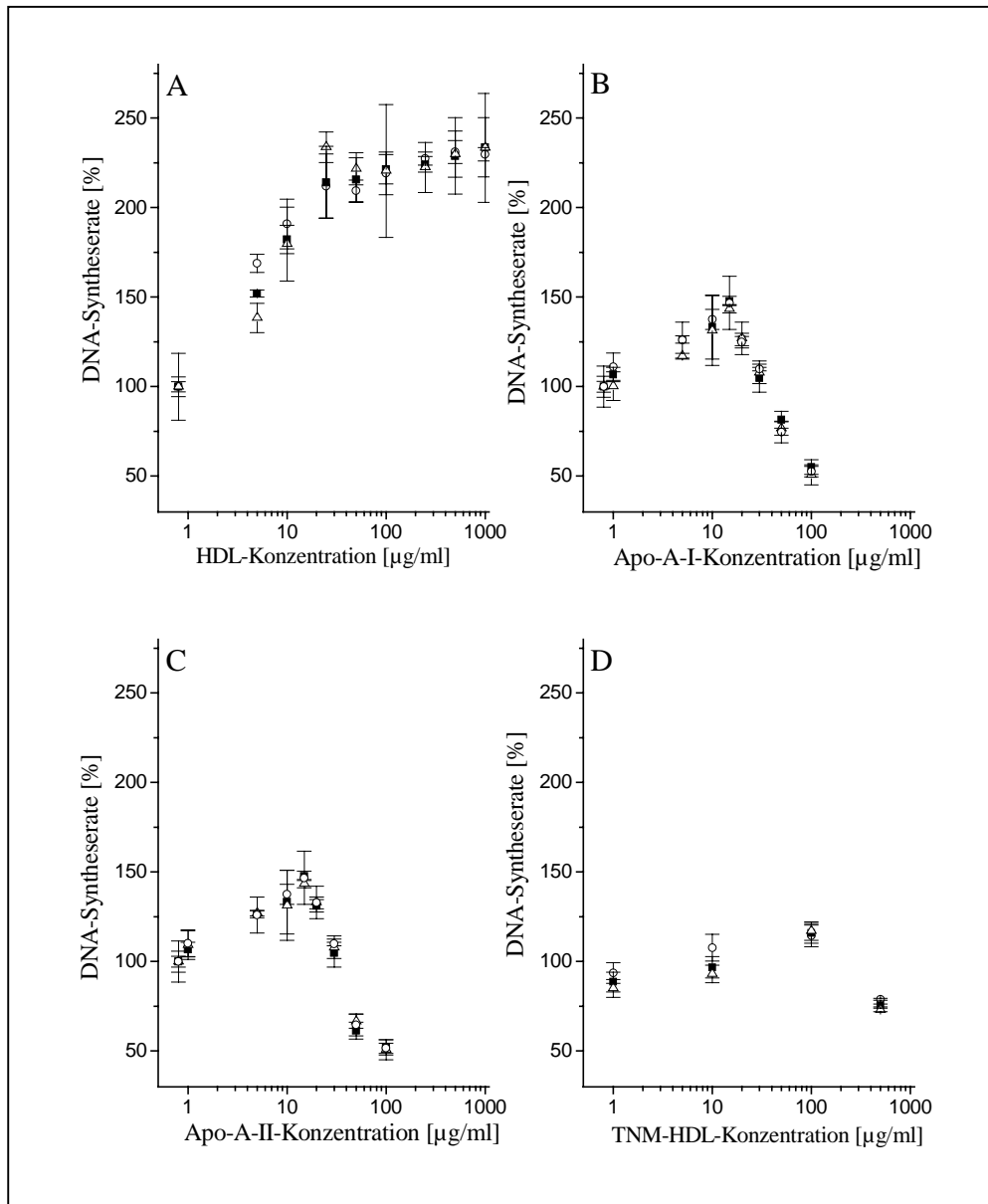


Abbildung 5.60: Vergleich der DNA-Syntheserate von humanen Hautfibroblasten eines normolipidämischen Patienten (offene Kreise) mit dem eines heterozygoten (geschlossene Quadrate) und eines homozygoten Tangier-Patienten (offene Dreiecke). Dargestellt ist die DNA-Syntheserate in Abhängigkeit der Konzentration von HDL (A), Apo-A-I (B), Apo-A-II (C) und TNM-modifizierten HDL (D). Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen jeweils der DNA-Syntheserate ohne Zugabe der Agonisten.

Die Abbildung zeigt, daß die drei Zelltypen keinen Unterschied in der Inkorporation des BrdU in die DNA aufweisen. Weder nach Zugabe von HDL, Apo-A-I, Apo-A-II oder TNM-modifizierten HDL ergab sich eine signifikante Abweichung in der mitogenen Aktivität.

Abbildung 5.61 zeigt den Vergleich der DNA-Syntheserate nach Zugabe von Liposomen mit aus HDL extrahierten Lipiden, Apo-A-I- und Apo-A-II-Proteoliposomen sowie Kontroll-Liposomen (ohne Proteinanteil).

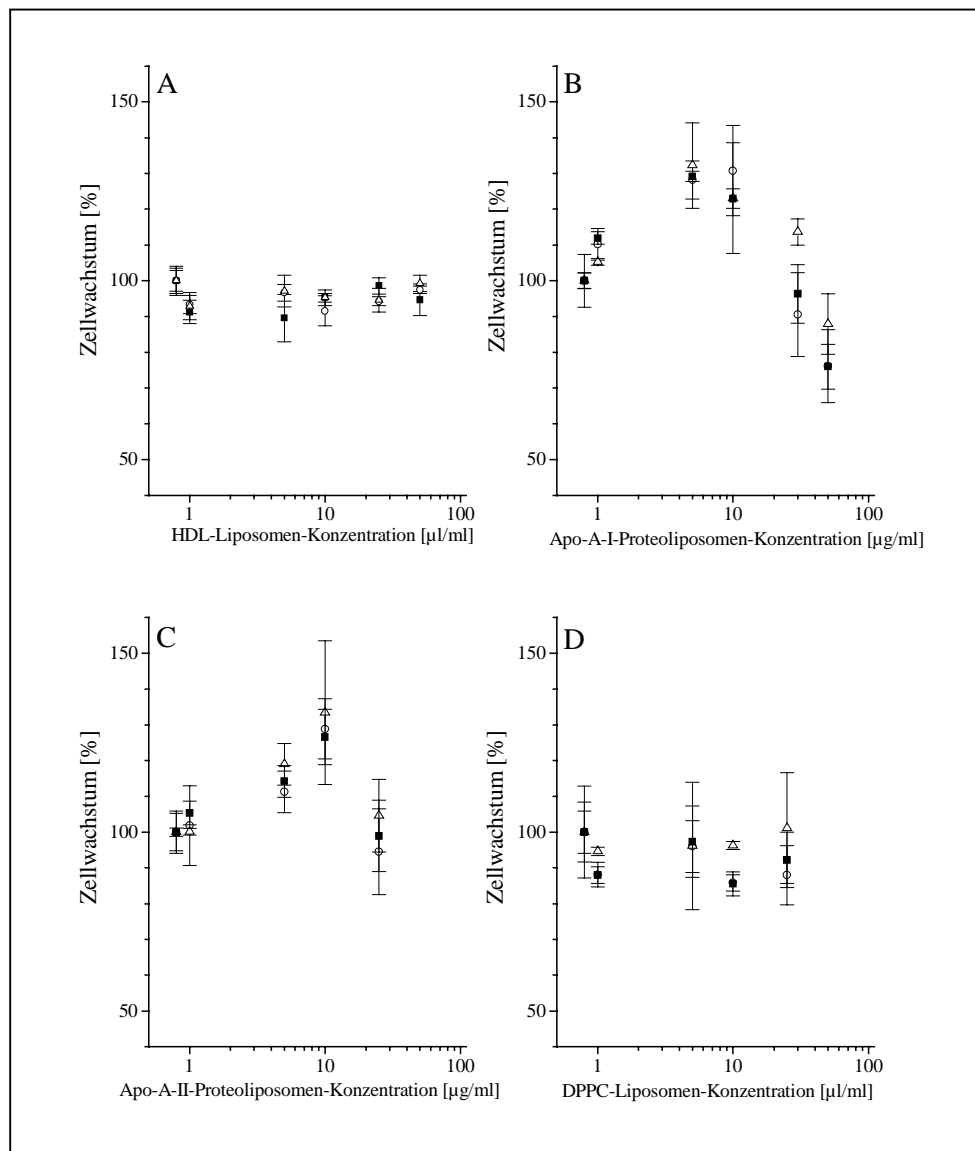


Abbildung 5.61: Vergleich der DNA-Syntheserate von humanen Hautfibroblasten eines normolipidämischen Patienten (offene Kreise) mit dem eines heterozygoten (geschlossene Quadrate) und eines homozygoten Tangier-Patienten (offene Dreiecke). Dargestellt ist die DNA-Syntheserate in Abhängigkeit der Konzentration von Liposomen aus den Lipiden von delipidierten HDL (A), Apo-A-I-Proteoliposomen (B), Apo-A-II-Proteoliposomen (C) und proteinfreien Liposomen (D). Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen jeweils dem Zellwachstum ohne Zugabe der Agonisten.

Die drei Zelltypen zeigten keinen Unterschied in der Inkorporation von BrdU in die DNA der Zellen (Abbildung 5.61). Weder nach Zugabe von HDL-Liposomen, Apo-A-I-

Proteoliposomen, Apo-A-II-Proteoliposomen oder proteinfreien Kontroll-Liposomen zeigte sich eine Abweichung der mitogenen Aktivität bei Tangier- gegenüber Kontrollzellen.

5.8. Mitogene Aktivität der HDL: Einfluß von Inhibitoren

Um den durch HDL ausgelösten Signaltransduktionsweges, der für die mitogenen Effekte verantwortlich ist, näher zu charakterisieren, wurden Experimente mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt.

5.8.1. Mitogene Aktivität der HDL: Inhibition der Proteinkinase C

HDL beeinflussen die zellulären Cholesterineffluxmechanismen über eine Aktivierung von PKC [224, 240, 313]. Um zu testen, ob die Proteinkinase C auch am mitogenen Signaltransduktionsweg der HDL beteiligt ist, wurden die Zellen mit HDL in An- und Abwesenheit von PKC-Inhibitoren inkubiert.

In Abbildung 5.62 werden die Ergebnisse eines typischen Experimentes dargestellt.

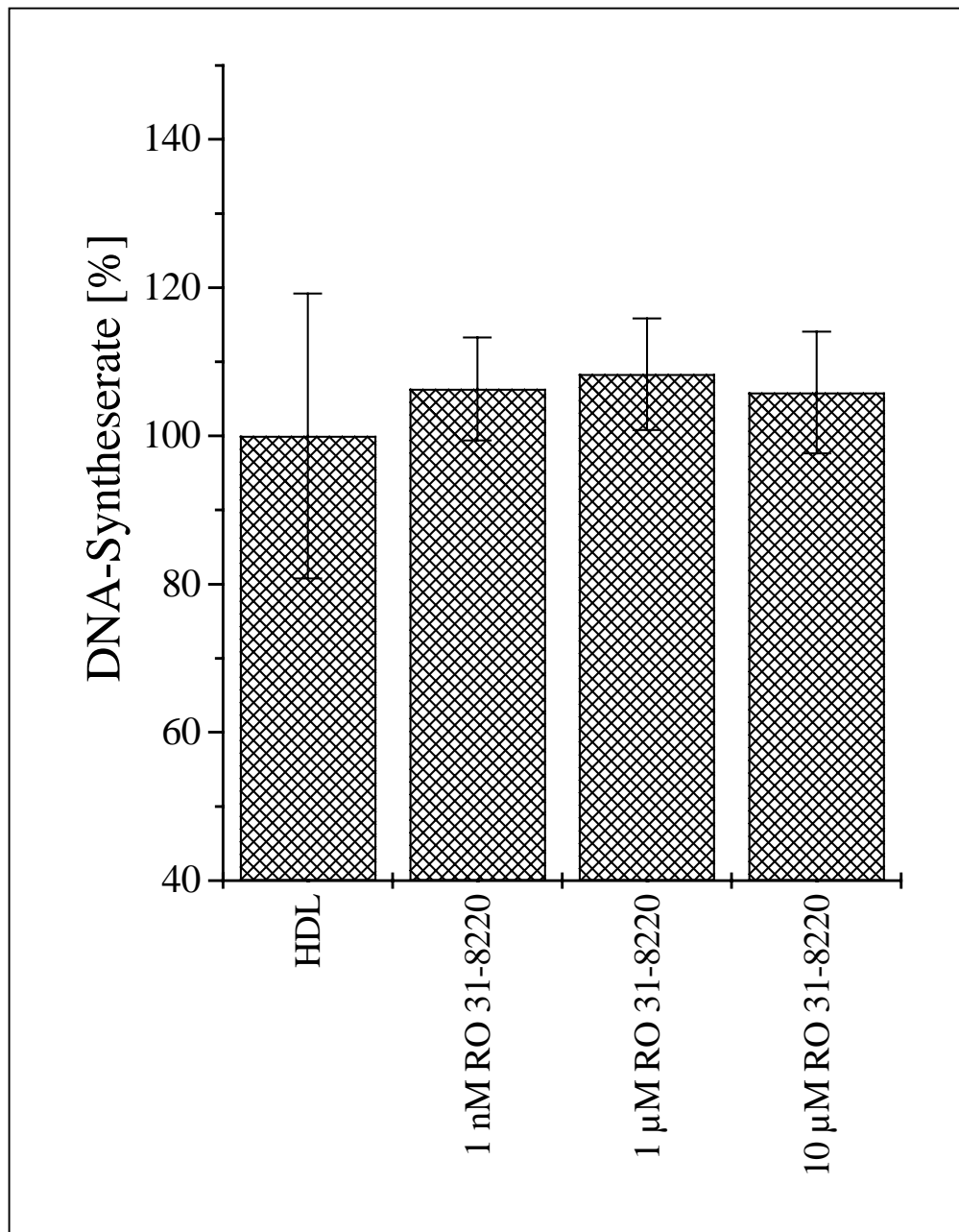


Abbildung 5.62: DNA-Syntheserate humaner Hautfibroblasten mit HDL und einem Inhibitor der Proteinkinase C. Eingesetzt wurden 1 nM, 1 µM und 10 µM RO 31-8220, sowie 25 µg / ml HDL in jedem Ansatz. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen der DNA-Syntheserate nur mit HDL ohne Zugabe des Inhibitors.

Eine Hemmung der Proteinkinase C hatte keinen Einfluß auf das Zellwachstum (Abb. 5.62). Wie Kapitel 5.5.1. (Abbildung 5.21) gezeigt wurde, reichen bereits 10 nM RO 31-8220, um die durch die PKC vermittelten Cholesterineffluxmechanismen zu hemmen.

5.8.2. Mitogene Aktivität der HDL: Inhibition von Proteinphosphatasen

Nachdem festgestellt wurde, daß Proteinphosphatasen einen Einfluß auf den HDL-induzierten Cholesterinefflux ausüben, wurde untersucht, ob sie auch den durch HDL induzierten mitogenen Effekt beeinflussen.

Abbildung 5.63 zeigt den Einfluß von Okadasäure, Calyculin A, Cantharidin und Endothall auf die HDL-induzierte DNA-Syntheserate.

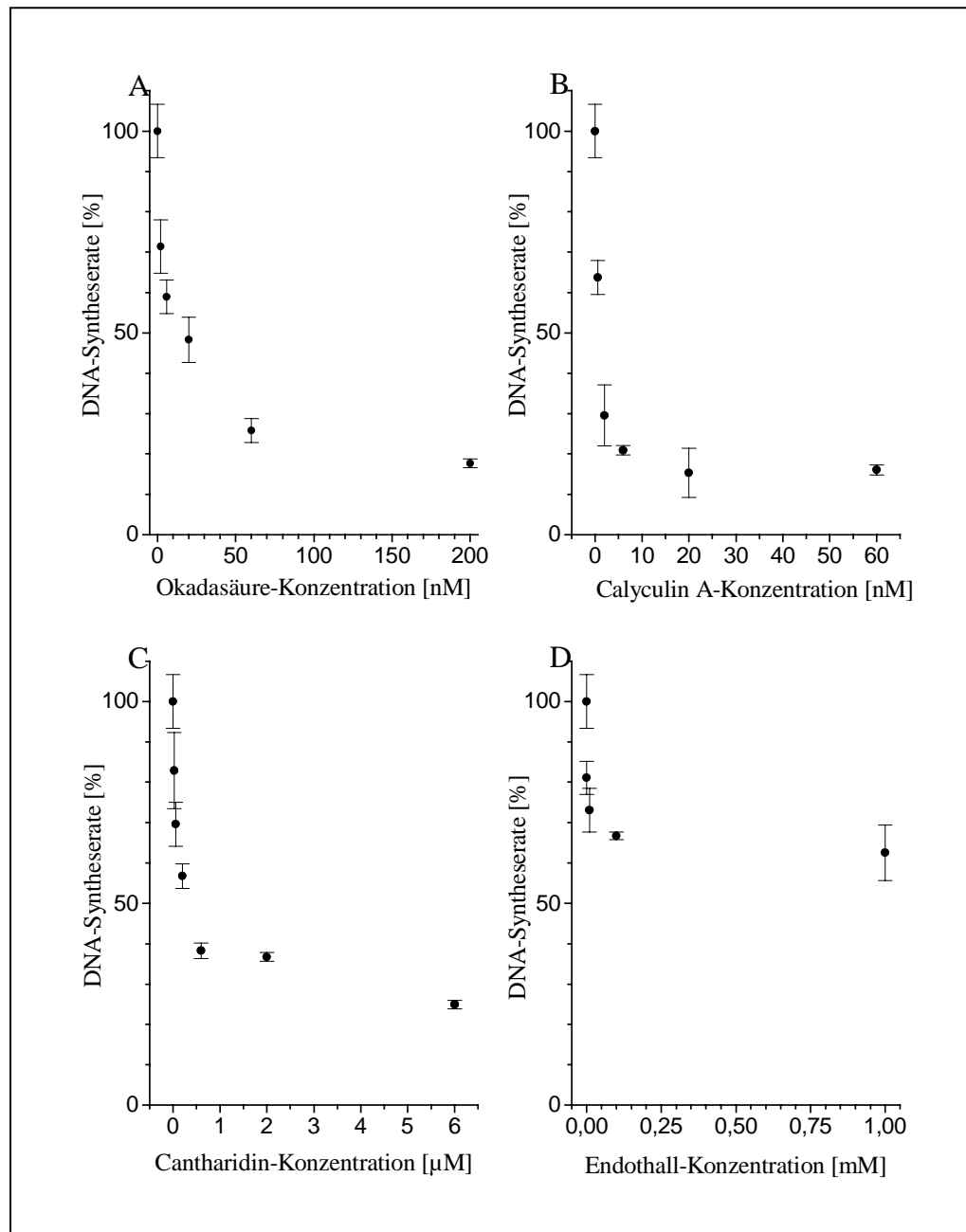


Abbildung 5.63: Einfluß von Okadasäure (A), Calyculin A (B), Cantharidin (C) und Endothall (D) auf die HDL-induzierte DNA-Syntheserate. Die Versuche wurden wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. Die HDL-Konzentration betrug bei jedem Ansatz 25 µg/ml. 100 % entsprechen der DNA-Syntheserate mit HDL ohne Zugabe von Inhibitoren. Die DNA-Syntheserate ohne Zugabe von Inhibitoren und ohne Zugabe von HDL betrug etwa 30 %.

Okadasäure, Calyculin A und Cantharidin hemmten konzentrationsabhängig die Inkorporation von BrdU in die DNA der Zellen nahezu vollständig. Die DNA-Syntheserate der Zellen ohne Zugabe von HDL lag bei ca. 30 %. Dieser „Null“-Wert wird in Anwesenheit dieser Inhibitoren sogar noch leicht unterschritten. Nur Endothall hemmte das Wachstum nicht vollständig (65 % Verminderung). (Abbildung 5.63).

Abbildung 5.64 zeigt den Einfluß von Orthovanadat-Ionen auf das Zellwachstum. Orthovanadat-Ionen hemmen Tyrosin-Phosphatasen. In Kapitel 5.5.9. konnte gezeigt werden, daß die Hemmung von Tyrosin-Phosphatasen keinen Einfluß auf den HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux hat. Hier sollte nun untersucht werden, ob an der HDL-induzierten Signaltransduktion, die zum Zellwachstum führt, Tyrosin-Phosphatasen beteiligt sind.

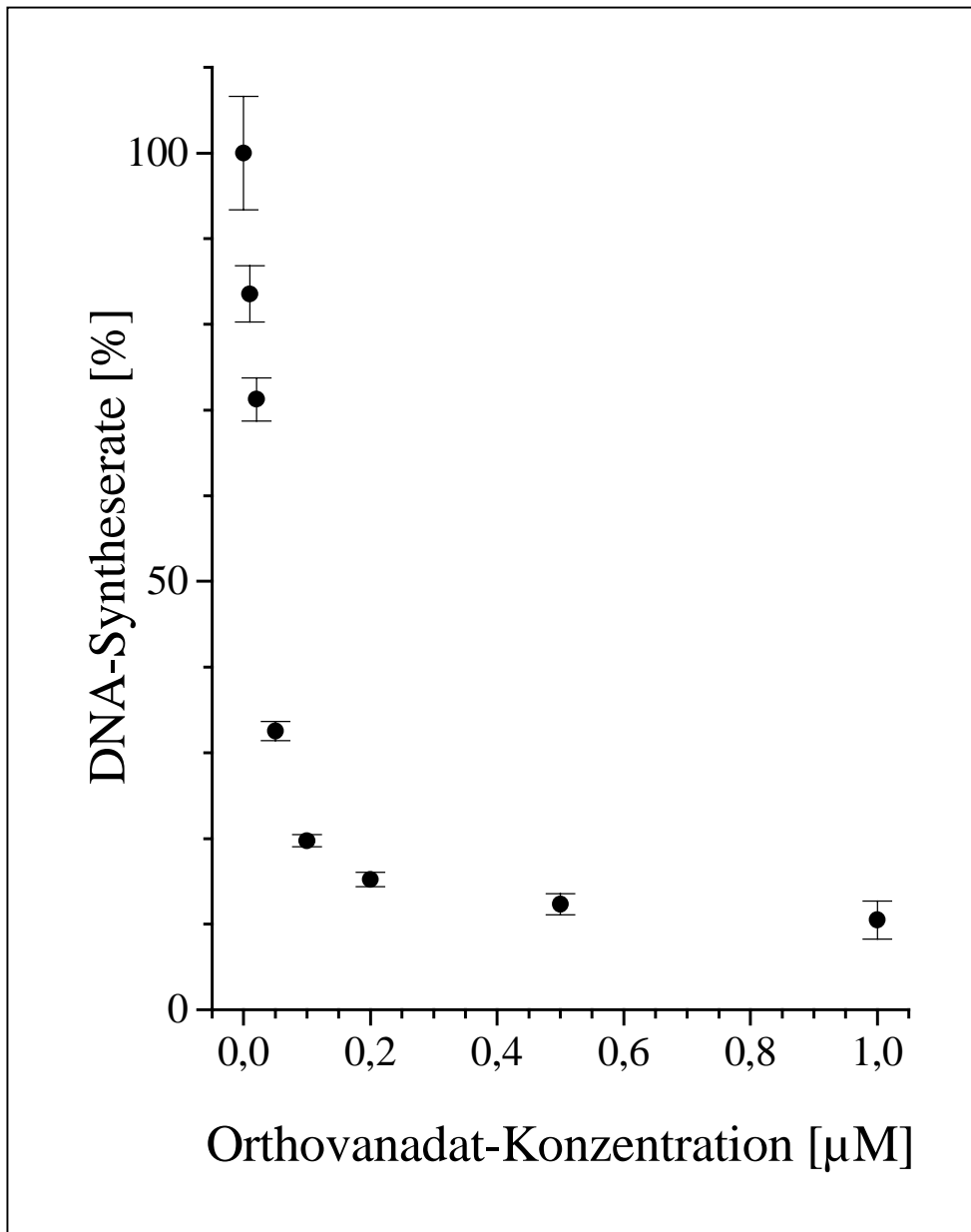


Abbildung 5.64: Einfluß von Orthovanadat auf die HDL-induzierte DNA-Syntheserate. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. Den Ansätzen wurden jeweils 25 $\mu\text{g/ml}$ HDL und Orthovanadat in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. 100 % entsprechen der DNA-Syntheserate mit 25 $\mu\text{g/ml}$ HDL ohne Zugabe von Orthovanadat. Die DNA-Syntheserate ohne Zugabe von HDL liegt bei etwa 30 %.

Die Abbildung zeigt, daß Orthovanadat das Zellwachstum vollständig hemmt. Die Hemmung entsprach etwa der durch Okadasäure, Calyculin A und Cantharidin erreichten Hemmung des Wachstums.

5.8.3. Mitogene Aktivität der HDL: Beteiligung von PI-PLC, PC-PLC und PC-PLD

HDL induziert multiple Signaltransduktionskaskaden [224, 240, 313, 328]. Es werden mindestens drei verschiedene Phospholipasen in der Plasmamembran aktiviert. Die Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipasen C und D (PC-PLC, PC-PLD) und die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC). Ob und welche dieser Phospholipasen auch in den HDL-induzierten, mitogenen Signaltransduktionsweg involviert sind, sollte weiter eingegrenzt werden.

Abbildung 5.65 zeigt den Einfluß des PI-PLC-Inhibitors U 73122, des PC-PLC-Inhibitors D609 und von Pertussis Toxin, welches die Aktivierung G-Protein-abhängiger Phospholipasen hemmt, auf die HDL-induzierte DNA-Syntheserate humaner Hautfibroblasten.

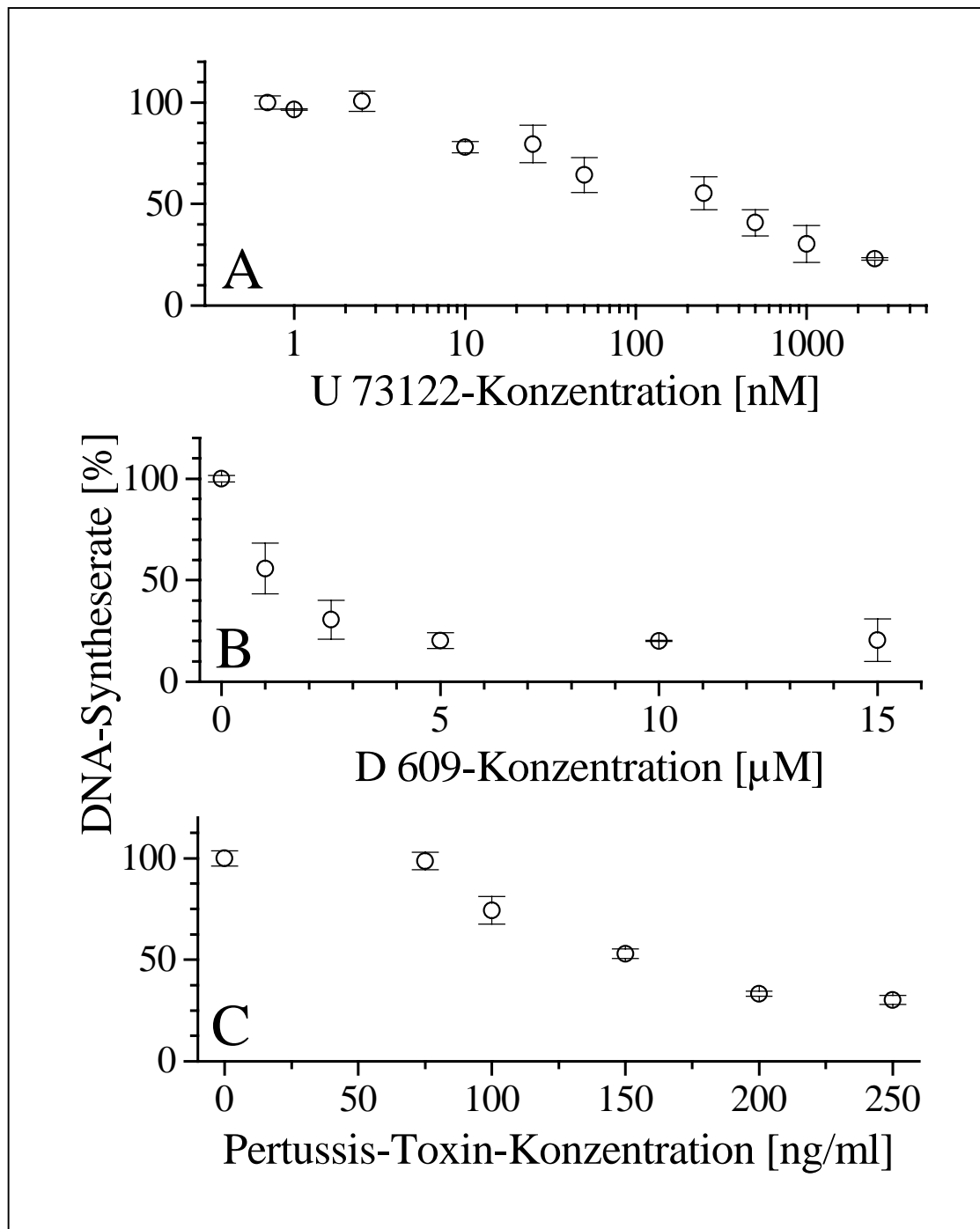


Abbildung 5.65: Hemmung der PI-PLC durch U 73122 (A), der PC-PLC durch D 609 (B) und der G-protein-abhängigen Phospholipasen durch Pertussis Toxin (C). Dargestellt ist der Einfluß der Hemmung auf die mitogene Wirkung von HDL. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. Den Ansätzen wurden jeweils 25 µg/ml HDL und Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. 100 % entsprechen der DNA-Syntheserate mit 25 µg/ml HDL ohne Zugabe der Inhibitoren. Die DNA-Syntheserate ohne Zugabe von HDL entsprach etwa 30 %.

Abbildung 5.65 zeigt, daß eine Hemmung der PI-PLC durch U 73122 die HDL-induzierte DNA-Syntheserate vollständig hemmte. Die Wachstumsrate der Zellen ging bis auf einen Wert zurück, der dem Wachstum der Zellen ohne Zugabe der HDL (also dem Nullwert) entsprach. Das Gleiche gilt auch für die Hemmung der PC-PLC durch D 609. Auch hier ging

das Wachstum bis auf einen Wert zurück, der dem Wachstum der Zellen ohne HDL-Zugabe entsprach. Die Zugabe von Pertussis Toxin bewirkte ab einer Konzentration von etwa 200 ng/ml ebenfalls eine vollständige Hemmung der HDL-Wirkung.

5.8.4. Mitogene Aktivität der HDL: Nähere Charakterisierung des Phospholipidstoffwechsels

PI-PLC kann das Zellwachstum über eine Aktivierung der Phospholipase A₂ beeinflussen [236]. Daher testeten wir auch den Einfluß von Inhibitoren der PLA₂ auf die mitogene Aktivität der HDL.

Die Hemmung der PC-PLC bewirkte sowohl eine Verminderung des HDL-induzierten Cholesterin-Masseneffluxes wie auch eine Hemmung des HDL-induzierten Zellwachstums. Die Aktivität der PC-PLC führt zur Bildung von DAG und Phosphorylcholin. DAG ist an der Signaltransduktion zum HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux (vermutlich via PKC) beteiligt [99, 328, 331]. Es gibt in der Literatur Hinweise, daß auch Phosphorylcholin teilweise als Second Messenger für mitogene Aktivitäten fungiert [79, 155]. Daher untersuchten wir, ob das bei der PC-Hydrolyse freiwerdende Phosphorylcholin mitogen wirkt.

Abbildung 5.66 zeigt die Wirkung von PLA₂-Inhibitoren und Phosphorylcholin auf das Zellwachstum.

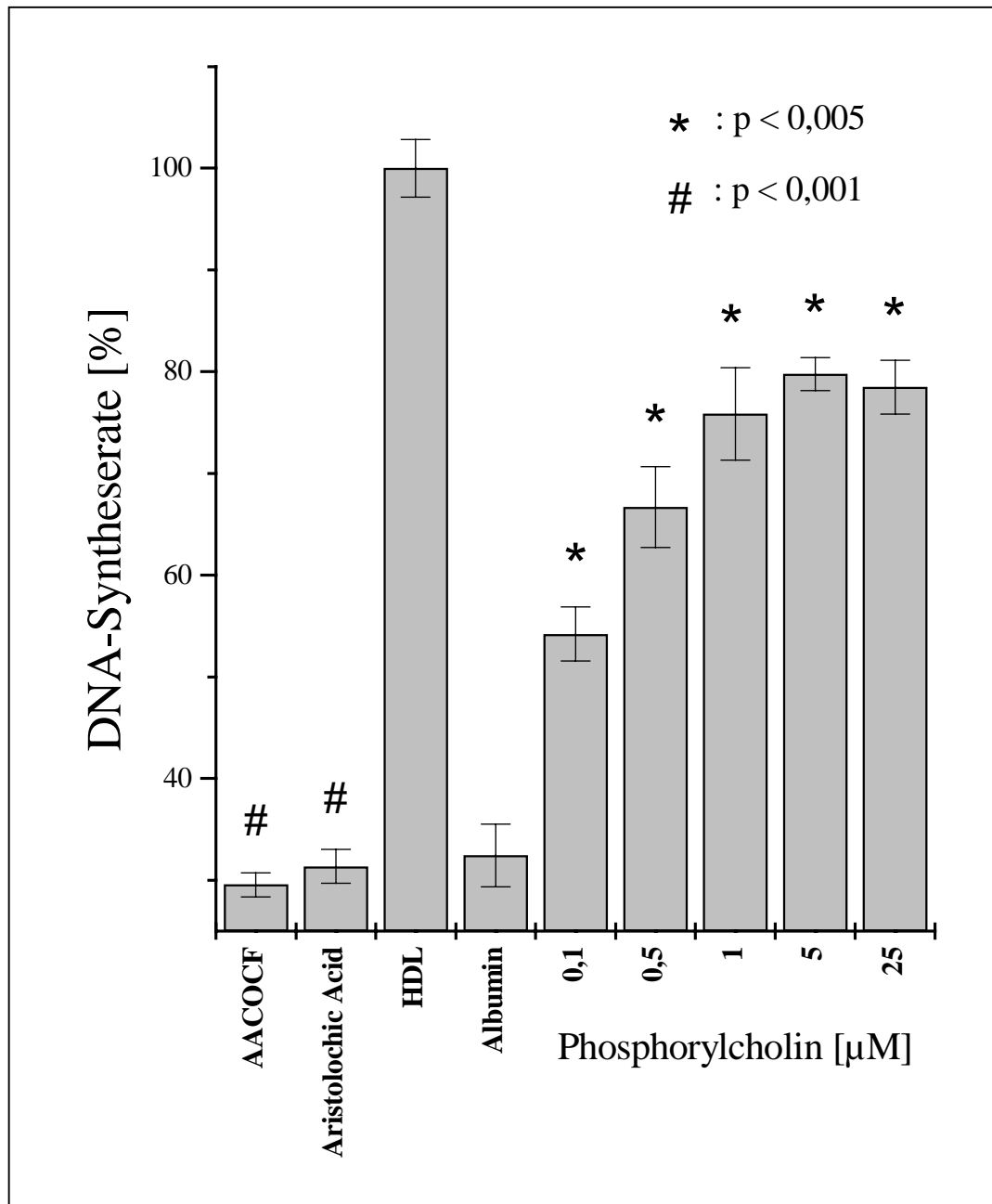


Abbildung 5.66: Phospholipase A₂- und Phosphorylcholin-abhängige DNA-Syntheserate. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt, 25 µg/ml HDL wurden jedoch nur bei der Kontrolle und den Ansätzen mit Inhibitoren der Phospholipase A₂ zugesetzt. 100 % entsprechen der DNA-Syntheserate mit 25 µg/ml HDL. Die DNA-Syntheserate ohne Zugabe von HDL oder Phosphorylcholin nur mit Albumin (Nullwert) entsprach etwa 32 %. Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen signifikante ($p < 0,05$) Abweichungen vom Nullwert. Ein # kennzeichnet signifikante Unterschiede zum Wert ohne Zusatz eines Inhibitors (nur mit HDL).

Die Inhibitoren der Phospholipase A₂ (AACOCF₃ und Aristolochic Acid) hemmten die HDL-induzierte DNA-Syntheserate vollständig. Phosphorylcholin stimulierte ohne Zugabe von HDL signifikant die DNA-Syntheserate. Die Stimulation entsprach maximal 80 % der durch HDL-induzierbaren DNA-Syntheserate.

5.8.5. Mitogene Aktivität der HDL: Beteiligung von Proteinkinasen

Um zu untersuchen, welche Proteinkinasen an der HDL-vermittelten DNA-Syntheserate beteiligt sein könnten, wurden Tyrphostin A25, Lavendustin A, A3, DAG-Kinase Inhibitor I und PD 96059 eingesetzt. Tyrphostin A25 inhibiert Tyrosin-Kinasen und hemmt die GTPase-Aktivität des Transducins. Genistein und Lavendustin A sind ebenfalls Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, wobei Lavendustin A einen geringen Effekt auf die Proteinkinasen A und C hat. PD 98059 inhibiert die Mitogen-activated Proteinkinase (MAP-Kinase)

Abbildung 5.67 zeigt die Strukturformeln von PD 98059 und Genistein.

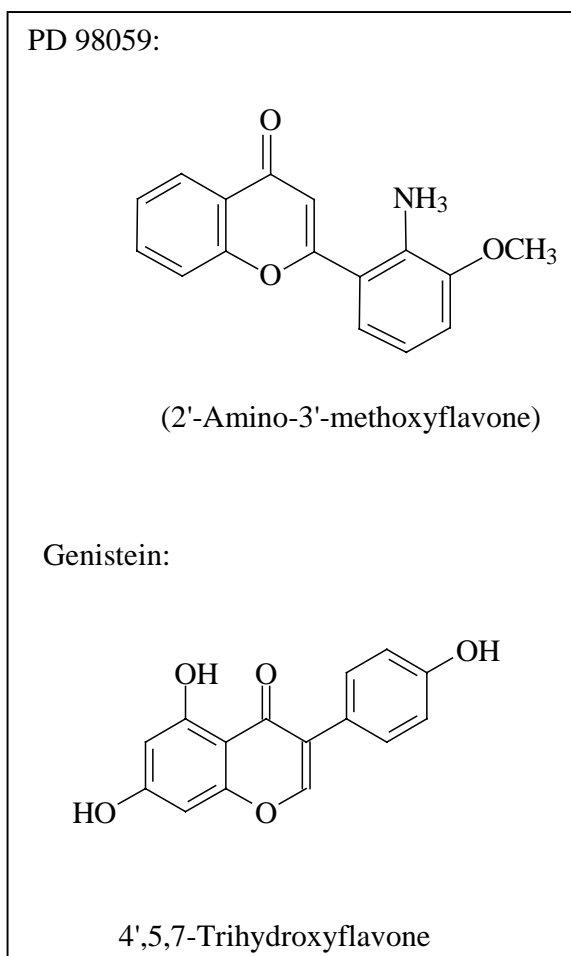


Abbildung 5.67: Strukturformeln der Kinase-Inhibitoren A3, PD 98059 und Genistein.

Abbildung 5.68 zeigt das Ergebnis eines typischen Versuchs.

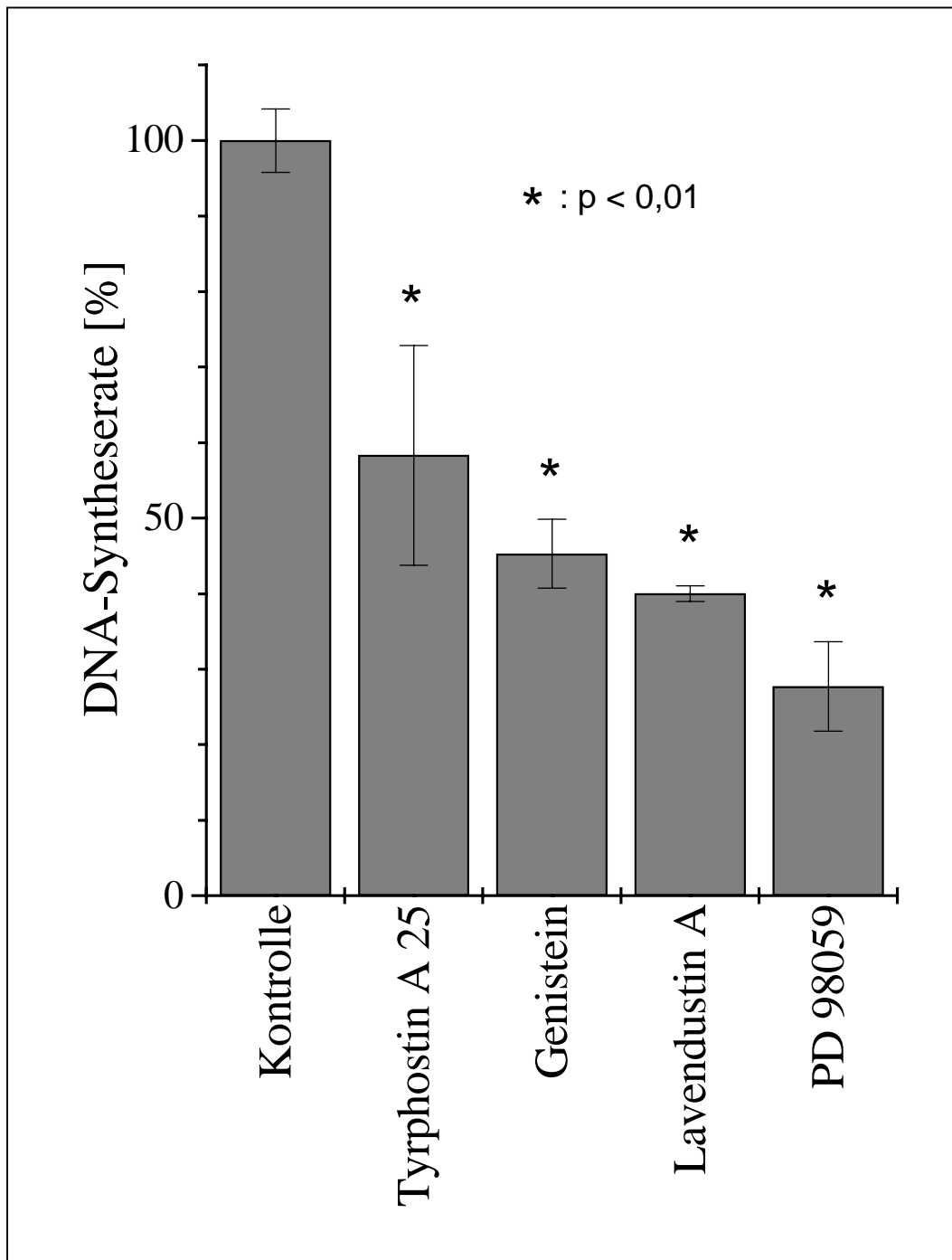


Abbildung 5.68: Einfluß von 5 μM Tyrphostin A25, 20 μM Genistein, 200 μM Lavendustin A, und 75 μM PD 98059 auf die HDL-induzierte DNA-Syntheserate. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. Allen Ansätzen wurden 25 $\mu\text{g/ml}$ HDL zugegeben. 100 % entsprechen der mitogenen Aktivität des Kontrollansatzes, dem nur HDL, aber kein Inhibitor zugesetzt wurde. Die DNA-Syntheserate ohne Zugabe von HDL entspricht etwa 30 %. Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen signifikante ($p < 0,01$) Abweichungen vom Nullwert.

Tyrphostin A 25 reduzierte das HDL-induzierte Zellwachstum um 40 %, während Genistein und Lavendustin A das HDL-induzierte Zellwachstum fast vollständig inhibierten, und PD 98059 es vollständig hemmte. Gezeigt wird jeweils nur die maximale Konzentration einer Konzentrationsreihe, die bei allen Inhibitoren eine konzentrationsabhängige Hemmung der mitogenen Aktivität der Zellen zeigte.

5.8.6. Mitogene Aktivität der HDL: Einfluß von Ca^{2+}

In Kapitel 5.8.4. war gezeigt worden, daß die PI-PLC an der zellulären Signaltransduktion des HDL-abhängigen Zellwachstums beteiligt ist.

Eine Hauptwirkung der PI-PLC ist die Bildung von DAG, welches wiederum die PKC aktiviert. Die in Kapitel 5.8.1. dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, daß die PKC nicht an der zellulären Signaltransduktion des HDL-abhängigen Zellwachstums beteiligt ist.

Die Aktivierung der PI-PLC bewirkt außerdem die Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP_3). IP_3 setzt Calcium aus intrazellulären Speichern frei und erhöht so die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration, wodurch Enzyme aktiviert werden, die bei niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationen inaktiv sind.

Um die Beteiligung von Calcium an der Signaltransduktionskette des HDL-vermittelten Zellwachstums zu untersuchen, wurden die Zellen mit 1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid tetra(acetoxymethyl)ester (BAPTA-AM), EGTA und Nickel-Ionen inkubiert. BAPTA komplexiert Calcium-Ionen. Der inaktive AM-Ester kann die Zellmembran durchdringen und erst innerhalb der Zelle wird BAPTA durch enzymatische Abspaltung des Esters aktiviert. EGTA komplexiert Calcium-Ionen des Mediums, dringt aber nicht in die Zelle ein. Mit Nickel-Ionen werden Calciumkanäle der Zellmembran blockiert, so daß ein Calcium-Influx aus dem umgebenden Medium verhindert wird.

Abbildung 5.69 zeigt die Strukturformel von BAPTA-AM.

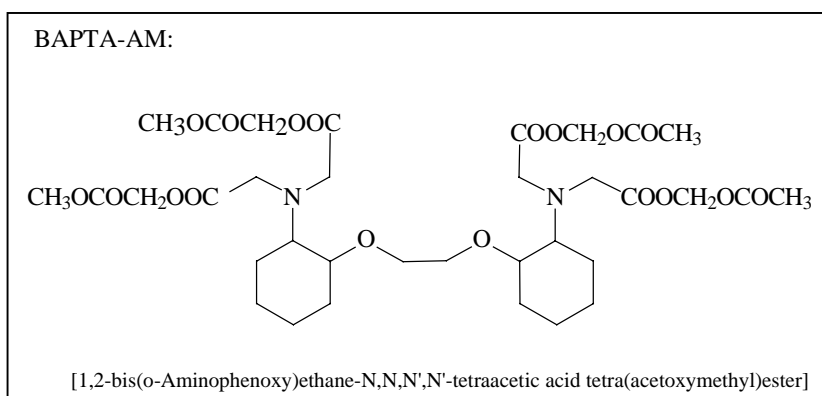


Abbildung 5.69: Strukturformel von BAPTA-AM.

Abbildung 5.70 zeigt die Wirkung dieser Stoffe auf das HDL-induzierte Zellwachstum.

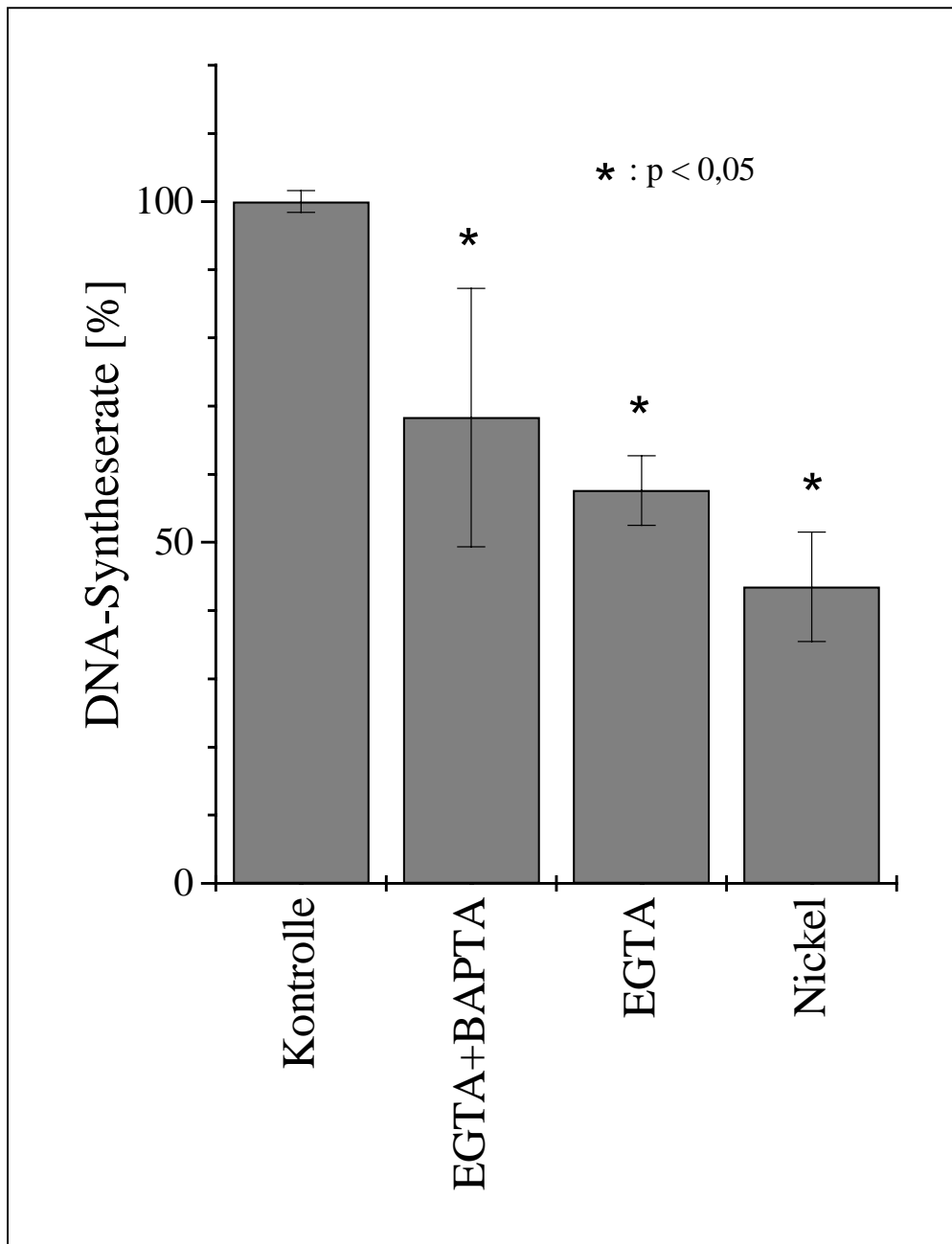


Abbildung 5.70: Einfluß von 2 μM BAPTA-AM zusammen mit 2 mM EGTA, 2 mM EGTA und 6 mM Nickel auf die durch 25 $\mu\text{g/ml}$ HDL induzierte DNA-Syntheserate. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen der DNA-Syntheserate der Kontrolle, bei der nur 25 $\mu\text{g/ml}$ HDL, aber keine Inhibitoren zugesetzt wurden. Die DNA-Syntheserate ohne Zusatz von HDL betrug etwa 30 %. Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen signifikante ($p < 0,05$) Abweichungen vom Nullwert.

Die Abbildung zeigt, daß EGTA die HDL-induzierte DNA-Syntheserate um 40 % vermindert. Das Gleiche geschieht bei einer gleichzeitigen Zugabe von BAPTA-AM und EGTA. Durch 6 mM Nickel kann das HDL-induzierte Zellwachstum auf ca. 40 % gesenkt und damit fast vollständig gehemmt werden. Eine Inkubation der Zellen nur in Anwesenheit von BAPTA-AM ist aufgrund der relativ hohen Ionenkonzentration im Medium nicht angezeigt, da zelluläre Transportmechanismen die komplexierten Ionen des Zytoplasmas sehr schnell wieder ersetzen [263].

Abbildung 5.71 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der HDL-induzierten DNA-Syntheserate in der Anwesenheit von Nickel.

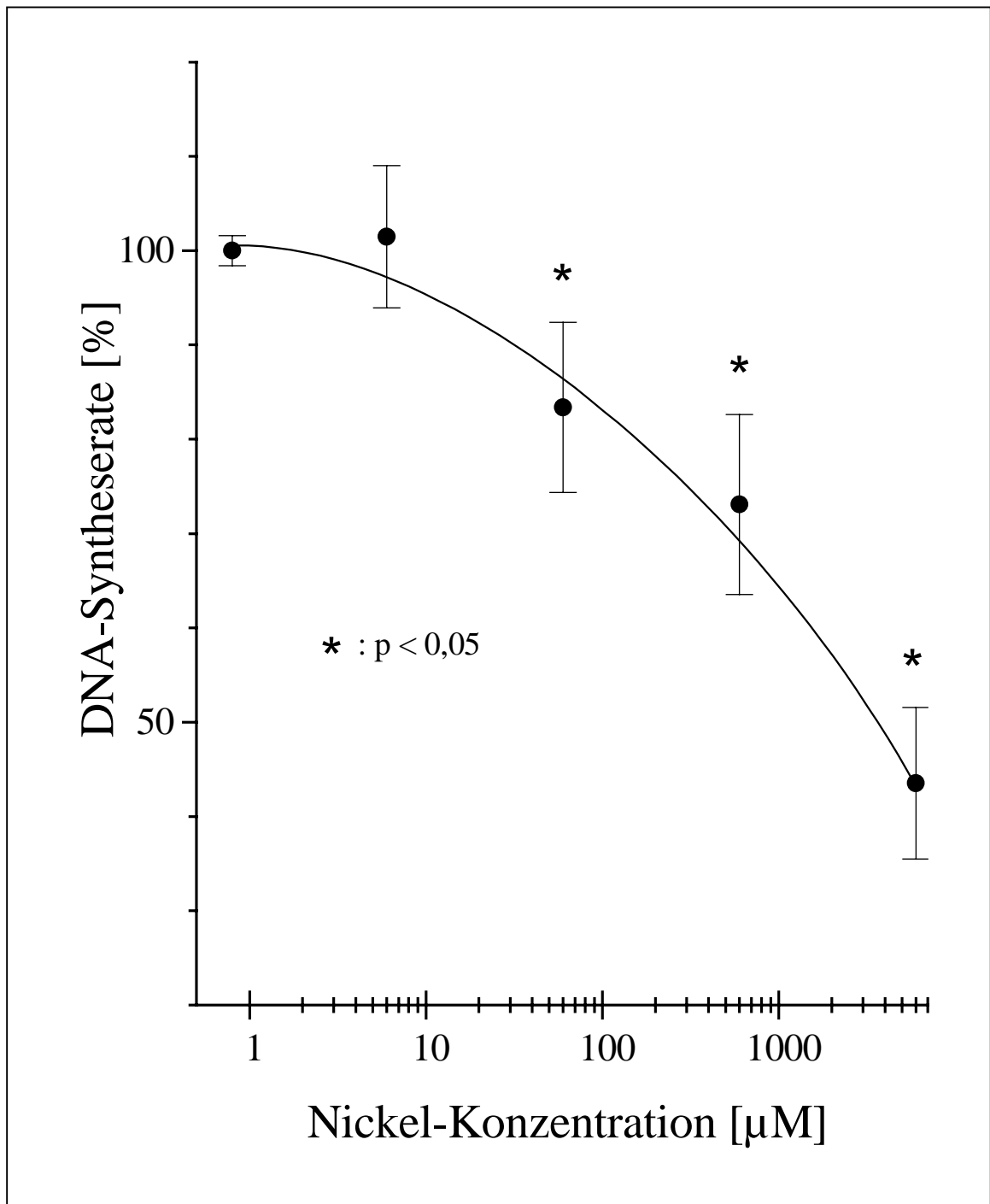


Abbildung 5.71: Einfluß von Nickel auf die durch 25 µg/ml HDL induzierte DNA-Syntheserate. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.2.8. beschrieben durchgeführt. 100 % entsprechen der durch 25 µg/ml HDL induzierten DNA-Syntheserate. Die DNA-Syntheserate ohne Zugabe von HDL betrug etwa 30 %. Die durch * gekennzeichneten Werte zeigen eine signifikante ($p < 0,05$) Abweichung vom Ausgangswert (100%).

Die Abbildung zeigt, daß Nickel ab einer Konzentration von 6 mM die DNA-Syntheserate fast vollständig hemmt. Das Zellwachstum wird bis auf 40 % des Nullwerts vermindert.

6. Diskussion

6.1. HDL-induzierter Cholesterinefflux

6.1.1. Etablierung der Methodik

Fast alle in der Literatur beschriebenen Cholesterin-Messungen an kultivierten Zellen und in den Medium-Zellüberständen wurden mit radioaktiven Cholesterin-Präkursoren durchgeführt. Diese Messungen zeigen jedoch nur an, ob ein Transfer von Cholesterin ins Medium stattgefunden hat; sie zeigen nicht an, daß tatsächlich ein Netto-Efflux stattgefunden hat. Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß nicht nur ein unidirektionaler Transfer von Plasmamembrancholesterin auf HDL, sondern auch ein Austausch zwischen HDL-Cholesterin und Plasmamembrancholesterin stattfindet [169, 259]. Als Resultat bei *in vitro*-Experimenten können somit beträchtliche Mengen radioaktiven Cholesterins im Medium akkumulieren, ohne daß zwangsläufig ein Netto-Efflux stattfindet.

Um HDL-induzierten Netto-Efflux von Cholesterin zu messen, wurden in dieser Arbeit mehrere Methoden auf ihre Tauglichkeit hin überprüft und miteinander verglichen. Getestet wurden Messungen mittels fluorimetrisch-enzymatischen Methoden, HPLC und Gaschromatographie (GC).

Der fluorimetrisch-enzymatische Test war einfach und schnell mit sehr vielen Proben gleichzeitig durchführbar. Da bei dieser Methode jedoch kein interner Standard verwendet werden kann, waren aufgrund des Verlustes bei der Aufarbeitung die Standardabweichungen, d.h. die Meßgenauigkeit, groß und die Meßergebnisse waren im statistischen Mittel falsch niedrig [vgl. auch 80].

Die Messungen mittels HPLC waren durch die Verwendung eines internen Standards sehr genau, und es ließen sich zudem gleichzeitig bei einer Messung freies Cholesterin und Cholesterinester bestimmen. Allerdings wurden für eine Messung relativ große

Probenmengen (entsprechend etwa einem Milligramm Protein) benötigt; die Dauer einer Messung betrug etwa 45 min., wodurch die Gesamtprobenzahl eines Versuches begrenzt wurde.

Messungen mittels GC waren aufgrund der Verwendung eines internen Standards ebenfalls sehr genau, erlaubten wegen der Meßdauer von nur etwa 12 Minuten einen relativ hohen Probendurchsatz und waren sehr sensitiv. Von Nachteil war, daß mit einem gaschromatographischen Verfahren nur eine Bestimmung des freien Cholesterins oder des Gesamtcholesterins möglich ist.

Aufgrund der Genauigkeit, der Sensitivität und des relativ großen Probendurchsatzes (ein Aspekt, der für die Messungen dieser Arbeit sehr wichtig war) wurden die Messungen in dieser Arbeit mittels GC durchgeführt.

Die Messungen mit der GC zeigten erstmals schlüssig, daß HDL *in vitro* effektiv Cholesterin-Massenefflux induzieren.

In der Literatur war gezeigt worden, daß die Beladung der Zellen mit Cholesterin den HDL-induzierten Cholesterinefflux verstärkt, und zwar vorwiegend den durch spezifische HDL-Zell-Kontakte induzierten Cholesterinefflux [37, 38]. Auch in Anwesenheit verschiedener anderer Substanzen, wie z.B. Progesteron, ist in der Literatur eine Heraufregulierung der HDL-Bindungsstellen und vermehrter Cholesterinefflux beschrieben worden [37, 38, 61, 224, 249, 302]. Es wurde daher zunächst untersucht, welche dieser Vorbehandlungen der Zellen sich am besten für Messungen des HDL-induzierten Cholesterineffluxes mit der Gaschromatographie eignete.

Die Beladung der Zellen mit Mevalonolacton – einer wasserlöslichen Cholesterinvorstufe – führte zu einem deutlichen Anstieg des Cholesterineffluxes mit nur sehr geringen Standardabweichungen, verglichen mit den anderen Beladungstechniken. Die Beladung der Zellen mit Cholesterin führte auch zu einer Steigerung des Cholesterineffluxes; aufgrund von Kristallbildungen auf der Zelloberfläche war die Beladung der Zellen und die Messung des Cholesterineffluxes jedoch nicht gut reproduzierbar. Daher wurden die Zellen bei den Versuchen in dieser Arbeit mit Mevalonolacton inkubiert.

6.1.2. Untersuchung des HDL-induzierten Cholesterin-Masseneffluxes

Zunächst wurde die Kinetik des HDL-induzierten Cholesterineffluxes untersucht. Dabei wurde zwischen Efflux in den ersten 10 Minuten nach Zugabe der HDL und Efflux bei Langzeitinkubationen (bis 12 h nach Zugabe der HDL) unterschieden.

Bei dem durch HDL induzierten Cholesterinefflux in den ersten 10 Minuten nach HDL-Zugabe kam es zunächst zu einem scheinbaren Netto-Cholesterin-Influx. Offenbar bindet ein Teil der HDL an die Zellen und ist somit im Medium nicht mehr für die Messung zugänglich. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, daß dieser Effekt bei Experimenten mit (cholesterinfreiem) Apo-A-I nicht auftrat. Nach ca. 6 bis 8 Minuten begann ein deutlich erkennbarer Netto-Efflux. Die Steigung der aus den Meßpunkten resultierenden Geraden des Netto-Effluxes variierte von Versuch zu Versuch. Man erhielt dabei einen Netto-Cholesterinefflux zwischen 0,1 und 0,4 μg pro mg Zellprotein nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten. Differenzen trotz offensichtlich gleicher Vorbedingungen und HDL-Konzentrationen könnten durch unterschiedliche HDL-Präparationen, geringfügig variierende Zelldichten und andere, im einzelnen nicht nachvollziehbare Differenzen der Versuchsbedingungen (wie der Raumtemperatur) verursacht worden sein.

Längere Inkubationszeiten zeigten, daß der Netto-Efflux in Anwesenheit von 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HDL₃ und einem unspezifischen Cholesterin-Akzeptor (1mg/ml Albumin) nach 2 bis 4 Stunden fast bis auf das 3-fache des Ausgangswertes (d.h. Cholesterinefflux in Anwesenheit von Albumin ohne HDL) ansteigt und dann nur noch langsam stetig weiter ansteigt. Der maximale Efflux mit Apo-A-I war geringfügig geringer und steigerte sich nur bis auf etwa das 2,5-fache, zeigte jedoch eine vergleichbare Kinetik. Dabei erhielt man einen Netto-Cholesterinefflux von 1 bis 1,5 $\mu\text{g} / \text{mg}$ Zellprotein nach 2 h Inkubationszeit und bis zu 2 $\mu\text{g} / \text{mg}$ Zellprotein nach 12 h Inkubationszeit.

Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit anderen in der Literatur beschriebenen Experimenten, die zeigen, daß HDL sowohl einen spezifischen Cholesterinefflux induzieren können (der innerhalb von etwa 1 h erreicht ist, und eine Sättigungskinetik aufweist) als auch einen unspezifischen (der langsam abläuft und keinen Sättigungspunkt hat) [169, 277]. Die beschriebene Kinetik (starke initiale Steigerung des Effluxes; linear abgeflachter Anstieg bei längeren Inkubationszeiten) könnte als Summation dieser zwei Mechanismen gedeutet werden. Mit Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen statt HDL im Medium war näherungsweise nur die initiale Phase des HDL-induzierten Effluxes sichtbar. Vermutlich sind Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen nur in sehr geringem Maße in der Lage,

unspezifischen Cholesterinefflux quantitativ zu induzieren, möglicherweise, weil ihnen das Enzym LCAT fehlt, daß den unspezifischen Efflux durch kontinuierliche Cholesterinveresterung fördert [82].

Bei der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit zeigte der Cholesterinefflux im HDL₃-Konzentrationsbereich über 100 µg/ml eine lineare Konzentrationsabhängigkeit ohne Sättigung. Ähnliche Befunde waren auch mit Hilfe radioaktiver Experimente in der Literatur beschrieben worden [171, 178, 259], und sind charakteristisch für einen unspezifischen Cholesterinausstrom aus der Plasmamembran entlang eines Konzentrationsgefälles, wie er auch für andere Cholesterinakzeptoren im Plasma typisch ist [171, 178, 213, 260, 276]. Dagegen zeigte sich, daß niedrige HDL-Konzentrationen (< 100 µg/ml) den Efflux relativ deutlich stärker induzierten als höhere Konzentrationen. Bei einer mathematischen linearen Extrapolation wird deutlich, daß niedrige HDL-Konzentrationen deutlich mehr Cholesterinefflux in das Albumin-haltige Medium induzieren, als dies aufgrund des Cholesterin-Konzentrationsgradienten zwischen Plasmamembran und HDL allein durch unspezifische Mechanismen (wie bei höheren HDL-Konzentrationen) erwartet werden kann. Der Konzentrationsbereich des überproportional starken Cholesterineffluxes ist ungefähr mit jenem vergleichbar, für den eine spezifische HDL-Rezeptor-Bindung beschrieben wurde [2, 40, 72, 140, 217, 221]. Vermutlich ist bei höheren HDL-Konzentrationen allein das Konzentrationsgefälle für Cholesterin zwischen Zellmembran und Extrazellularraum entscheidend, während bei den geringeren Konzentrationen der HDL-spezifische Efflux eine bedeutendere Rolle spielt. Es ist auch möglich, daß eine Desensitisierung der spezifischen Cholesterineffluxmechanismen bei höheren HDL-Konzentrationen stattfindet.

Um die Hypothese zu überprüfen, daß Cholesterinefflux bei HDL-Konzentrationen < 100 µg/ml durch spezifische Mechanismen induziert wird, wurde auch die Mobilisierung *de novo* synthetisierten Cholesterins mit Hilfe der radioaktiven Cholesterinvorstufe ¹⁴C-Acetat untersucht, und die Kinetik bzw. die Konzentrationsabhängigkeit mit dem Cholesterin-Massenefflux verglichen. Dabei zeigte sich, daß sowohl mit HDL als auch Apo-A-I ausschließlich bei Konzentrationen < 50 µg/ml effektiv Cholesterin aus intrazellulären Pools mobilisiert wurde. Höhere Konzentrationen führten zu einem nicht proportional gesteigerten Cholesterinefflux, der geringer als rechnerisch erwartet war. Diese Befunde deuteten somit ebenfalls darauf hin, daß der überproportional starke Cholesterinefflux bei HDL-Konzentrationen < 100 µg/ml durch spezifische Mechanismen (Mobilisierung intrazellulär gespeicherten Cholesterins) zustande kam, und daß dieser Mechanismus bei höheren Konzentrationen nicht mehr oder nur vermindert wirksam ist.

6.1.2.1 HDL-induzierter Cholesterinefflux an Zellen von Tangier-Patienten

In Voruntersuchungen war mit Hilfe von radioaktiven Cholesterinvorstufen gezeigt worden, daß die Mobilisierung *de novo* synthetisierten Cholesterins bei Tangier-Fibroblasten gestört ist [121, 128, 269, 273, 330]. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob auch der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux aus Tangier-Zellen gestört ist.

Es zeigte sich, daß der Cholesterin-Massenefflux aus kultivierten Fibroblasten homozygoter Tangier-Patienten sowohl bezüglich der Zeitabhängigkeit als auch der Konzentrationsabhängigkeit verändert ist. Der maximale Efflux war um ca. 30 bis 50 % reduziert. Bei der Zeitabhängigkeit fiel auf, daß der Efflux bei kurzen Inkubationszeiten mit Verzögerungen von etwa 2 bis 10 Minuten einsetzte.

Es fiel auf, daß überwiegend der Efflux bei kurzen Inkubationszeiten und HDL-Konzentrationen $< 100 \mu\text{g/ml}$ gestört war, was – neben den oben aufgeführten Argumenten – darauf hindeutet, daß überwiegend der durch spezifische Mechanismen induzierte Cholesterinefflux bei Zellen von Tangier-Patienten defekt ist.

Auch die durch freies Apo-A-I und Apo-A-I-Proteoliposomen mobilisierte Cholesterinmasse ist bei Tangier-Fibroblasten geringer als in normalen Zellen. Dabei ist der durch freies Apo-A-I induzierte Cholesterin-Massenefflux bei Tangier-Zellen am stärksten vermindert. Zusammengefaßt ist dies ein weiterer Hinweis darauf, daß dieser spezifische Efflux durch die Apolipoproteine induziert wird und bei Tangier-Zellen gestört ist.

In der Literatur wurde beschrieben, daß cholesterinbeladene Hautfibroblasten von homozygoten Tangier-Patienten einen um 50 % reduzierten Cholesterinefflux in Anwesenheit von HDL oder Proteoliposomen aufweisen [121, 269, 273, 330], und nahezu keinen Cholesterinefflux in der Anwesenheit von freiem Apolipoprotein A-I zeigen [121, 269]. Diese Aussagen stehen teilweise im Widerspruch zu den hier gefundenen Ergebnissen. Die Reduktion des HDL-induzierten Cholesterineffluxes war in der hier untersuchten Studie signifikant, erreichte aber bei den meisten Messungen keine 50 %ige Reduktion (im Mittel 30 bis 40%). Auch konnte nicht bestätigt werden, daß der Apo-A-I-induzierte Cholesterinefflux vollständig aufgehoben war. Es fand sich eine Restaktivität von mindestens 20 %. Auch mit radioaktiven Cholesterin-Präkursoren fand sich nicht bestätigt, daß bei Tangier-Zellen kein Cholesterinefflux durch freies Apo-A-I induziert wird. Für diese Diskrepanz gibt es folgende Erklärungsmöglichkeiten: Zunächst besteht bei der Tangier-Erkrankung eine genetische Heterogenität. Die von uns untersuchten Patienten sind Geschwister aus einer Familie mit einem milden Phänotyp, der sich nicht in vorzeitiger Arteriosklerose äußert [329]. In der

Literatur wurden andere Tangier-Patienten beschrieben, die einen schwerwiegenderen Phänotyp mit vorzeitiger Arteriosklerose aufweisen. So gibt es in dem Gen ABC1 unterschiedliche Mutationen, von einzelnen Punktmutationen bis hin zu Deletionen [47, 56, 279]. Erst kürzlich wurde entdeckt, daß der Defekt dieses Gens für die Ausprägung der Tangier-Krankheit verantwortlich zeichnet [47, 56, 279]. Die Mutation des Gens bei den von uns untersuchten Tangier-Patienten ist eine Punktmutation, die nicht zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription führt, während die Mutation der in der Literatur beschriebenen Tangier-Patienten möglicherweise einen schwerwiegenderen Phänotyp verursacht.

Weiterhin sind die Versuchsbedingungen leicht unterschiedlich. So haben wir den Cholesterinefflux in Anwesenheit eines unspezifischen Cholesterinakzeptors (Albumin) gemessen. Zudem wurde in dieser Arbeit kein ACAT-Inhibitor verwendet. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil des Cholesterins aus Esterpools mobilisiert wurde.

6.2. Mitogene Wirkung von HDL

In unserer Arbeitsgruppe konnte an kultivierten menschlichen Hautfibroblasten nach HDL-Zugabe eine Aktivierung der PI-PLC, der PC-PLC und der PC-PLD nachgewiesen werden [328]. Insbesondere der durch PI-PLC vermittelte schnelle Umsatz von PIP_2 wird oft durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF, FGF, PDGF und Bombesin, induziert. Daher wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, daß der bekannte mitogene Effekt der HDL über diese zelluläre Signalkaskade vermittelt wird.

HDL wirkte in den hier durchgeführten Experimenten an Fibroblasten bis zu einer untersuchten Konzentration von etwa 1000 $\mu\text{g/ml}$ *in vitro* mitogen, wobei bis zu einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ keine zelltoxischen Effekte auftraten. Bereits ab einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ wurden über 60 % des maximalen Effektes erreicht. Der durch HDL induzierte spezifische Cholesterinefflux erreicht hingegen erst bei Konzentrationen über 50 $\mu\text{g/ml}$ etwa 60 % des maximalen Wertes. Dieser Unterschied in den Wirkkonzentrationen war ein erster Hinweis, daß der durch HDL induzierte Cholesterinefflux und die durch HDL vermittelte Zellproliferation durch unterschiedliche Signaltransduktionswege vermittelt werden.

Sowohl freies Apo-A-I als auch Apo-A-I-haltige Liposomen induzieren Cholesterinefflux. Es stellte sich daher die Frage, ob freies Apo-A-I bzw. Apo-A-I-Proteoliposomen ebenfalls mitogen wirken.

Sowohl freies Apo-A-I und Apo-A-II als auch Apo-A-I- und Apo-A-II-Proteoliposomen zeigten in geringen Konzentrationen einen schwachen mitogenen Effekt. Im Gegensatz zu HDL, bei denen der mitogene Effekt bis etwa 100 µg/ml kontinuierlich bis auf etwa 250 % des Ausgangswertes (100 %) anstieg, konnte durch Apo-A-I und Apo-A-II bei Konzentrationen bis ca. 20 µg/ml nur ein Anstieg bis maximal 130 % des Ausgangswertes (100 %) erreicht werden. Höhere Konzentrationen führten sogar zu einer Hemmung des Wachstums.

Diese Untersuchungen stützten die These, daß die durch HDL induzierten Signaltransduktionswege, die zu Cholesterinefflux (vermittelt durch Apoproteine) und Zellwachstum (vermittelt durch eine andere Substanz) führen, unterschiedlich sind.

Um zu untersuchen, ob die mitogene Wirkung der HDL von einer Proteinfraction oder von einem Lipid ausgeht, wurde die mitogene Wirkung von TNM-HDL, freien Proteinen aus HDL, von Liposomen, die aus HDL-Lipiden hergestellt wurden, von Liposomen aus DPPC und Lysosulphatiden untersucht. In TNM-HDL wurden die Tyrosinreste der Proteine quervernetzt, die freien Proteine der HDL wurden durch Delipidierung der HDL erhalten. Liposomen aus HDL-Lipiden und DPPC-Liposomen werden wie bei der Herstellung von Apo-A-I-Proteoliposomen präpariert, allerdings werden keine Apoproteine zugesetzt. Dabei wurden die DPPC-Liposomen zur Kontrolle eingesetzt, um zu überprüfen, ob ein Teil des mitogenen Effektes der Apo-A-I-Proteoliposomen von dem DPPC ausgehen könnte. Lysosulphatide waren die einzigen von mehreren kommerziell erhältlichen getesteten Lipiden, die auf HDL vorkommen, und gleichzeitig einen mitogenen Effekt zeigten.

Es zeigte sich, daß die Gesamtproteinfraction aus delipidierten HDL das gleiche Wachstumsverhalten wie Apo-A-I und Apo-A-II auslöste: nur ein leichtes Wachstum in niedrigen Konzentrationen und eine Hemmung des Wachstums in höheren Konzentrationen. Hieraus konnte geschlossen werden, daß die Proteinfraction der HDL keinen oder nur einen geringen Anteil an dem mitogenen Effekt der HDL haben.

Liposomen, präpariert aus HDL-Lipiden und Liposomen, präpariert aus kommerziell erhältlichen Phospholipiden (DPPC-Liposomen) zeigten keine mitogene Wirkung. Auch TNM-modifizierte HDL führten zu keiner Steigerung des Wachstums, sondern hemmten das Wachstum. Lysosulphatide hatten jedoch denselben mitogenen Effekt wie native HDL. Der

Einbau von Bromdesoxyuridin in die DNA der Zellen wurde um bis zu 250 % des Ausgangswertes (100 %) gesteigert.

Lysosulphatide bestehen aus Sphingosylgalactosylsulphat und Lysocerebrosidsulphat und sind Lipide, die auf HDL vertreten sind. Vermutlich werden bei der Nitrierung der HDL durch TNM und der Herstellung von Liposomen aus HDL-Lipiden die Lysosulphatide inaktiviert oder gehen bei der anschließenden Dialyse verloren, so daß diese Präparate kein Wachstum auslösen.

Lysosulphatide zeigten keinen Effekt auf den Cholesterinmassenefflux. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß für den HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux und das HDL-induzierte Zellwachstum unterschiedliche Signaltransduktionswege bestehen, und daß der mitogene Effekt durch Lipide der HDL - vermutlich Lysosulphatiden - induziert wird.

Der Vergleich des Zellwachstums von Zellen normolipidämischer Patienten mit den Zellen von Tangier-Patienten zeigte, daß es keinen Unterschied im HDL-induzierten Einbau von BrdU in die DNA dieser beiden Zelltypen gab.

In der Literatur wurde berichtet, daß Zellen von Tangier-Patienten in ihrem Wachstum gestört sind [97]. In diesen Experimenten wurde die absolute Zellzahl nach einer bestimmten Wachstumszeit bestimmt, ausgehend von einer festen Ausgangszellzahl. Dies zeigt, daß die Tangier-Zellen langsamer wachsen, was z.B. auch durch das größere Volumen von Tangier-Zellen erklärt werden könnte. Das auch in den Experimenten der hier vorgestellten Arbeit festgestellte verlangsamte Wachstum der Zellen von Tangier-Patienten könnte jedoch auch auf das Alter der Probanden zurückzuführen sein, die die jeweiligen Zellen gespendet haben: Die von uns untersuchten Tangier-Patienten waren jeweils über 50 Jahre alt, während die Kontrollzellen von Probanden stammten, die jünger als 40 Jahre waren. Auch die Autoren der oben angesprochenen Veröffentlichung untersuchten Tangier-Zellen von Spendern, die älter als 50 Jahre waren, wohingegen sie über das Alter der Kontrollzellenspender keine Angaben machten. Zum Anderen wurden von den Autoren bei Versuchen mit Wachstumsfaktoren nur die Zellzyklusphasen bestimmt. Dabei ergab sich, daß Tangier-Zellen sich vermehrt in der G₂/M-Phase befinden, und daß sich dies durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren nicht ändert. In den Experimenten der hier vorgestellten Arbeit wurde der Einbau von BrdU in die DNA der Zellen untersucht, indem der Einbau mit und ohne Zugabe von HDL und / oder Inhibitoren in Beziehung gesetzt wurde. Dabei wurde gefunden, daß die Reaktion der beiden Zelltypen auf die Agonisten in Relation zum jeweiligen Ausgangswert gleich waren. Auch wichen die jeweiligen Ausgangswerte nicht statistisch signifikant voneinander ab. In der Untersuchung von Drobnik et al. [97] wurde das Wachstum der Tangier-Zellen nach Zugabe

von mitogenen Substanzen (z.B. EGF, PDGF) untersucht, die in der hier vorgestellten Arbeit nicht verwendet wurden. Dies ist eine weitere mögliche Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse. Es ist möglich, daß Tangier-Zellen auf diese Agonisten anders reagieren als auf die in dieser Arbeit verwendeten.

6.3. Nähere Charakterisierung der HDL-induzierten Signaltransduktion

Da HDL zumindestens drei verschiedene Phospholipasen aktivieren können, war die Ausgangsthese dieser Arbeit, daß HDL verschiedene Signaltransduktionswege mit auch jeweils unterschiedlicher Funktion aktivieren können.

Um die unterschiedlichen Signalwege weiter zu differenzieren, wurde die Wirkung verschiedener Inhibitoren getestet. Durch Messung der vermuteten physiologischen Wirkung (HDL-induzierter Cholesterin-Massenefflux und HDL-induziertes Zellwachstum) sollte untersucht werden, ob mindestens zwei Signaltransduktionswege unabhängig voneinander existieren, und ob einzelne Signale spezifisch diesen zellulären Mechanismen zugeordnet werden können.

Es war aus Voruntersuchungen bekannt, daß HDL drei verschiedene Phospholipasen aktivieren: die PI-PLC, die PC-PLC und die PC-PLD [328]. Es wurde arbeitshypothetisch angenommen, daß die PI-spezifische Phospholipase C in die mitogene Aktivität der HDL involviert ist, da aus der Literatur im Zusammenhang mit anderen Wachstumsfaktoren eine Beteiligung der PI-PLC an der Vermittlung mitogener Aktivität bekannt war [256, 307]. Allerdings war in der Literatur auch gezeigt worden, daß mitogene Prozesse bei Fibroblasten auch ohne die Bildung von Phosphatidylinositiden initiiert werden können [67, 191].

Eine Beteiligung von PC-PLC und von PC-PLD am HDL-induzierten Cholesterinefflux war ebenfalls bekannt, jedoch nur mit Hilfe radioaktiver Cholesterinvorstufen gezeigt worden [96, 99, 273, 313, 328, 331]. Es wird dabei vor allem die Bildung von DAG (direkt durch PC-PLC und indirekt durch PC-PLD nach Umwandlung von PA in DAG durch eine Phosphohydrolase) für die Wirkung auf den Cholesterin-Massenefflux (via Aktivierung von PKC) verantwortlich gemacht. Vermutlich ist aber auch das via PC-PLD gebildete PA direkt an Cholesterineffluxmechanismen beteiligt [331].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Inhibierung der PI-PLC durch U 73122 das HDL-induzierte Zellwachstum fast vollständig hemmt, während der Cholesterin-Massenefflux sogar verstärkt wurde.

Die Inhibierung der PC-PLC und der heterotrimeren G-Proteine mittels Pertussis Toxin führten zu einer Verringerung des Cholesterin-Masseneffluxes und gleichzeitig auch zu einer Hemmung des Zellwachstums. Der Cholesterinefflux war bei der Hemmung der PC-PLC um etwa 25 % und bei der Hemmung der G-Proteine mittels Pertussis Toxin um etwa 35 % reduziert. Das Zellwachstum war durch die Inhibierung der PC-PLC nahezu vollständig gehemmt, durch die Hemmung der G-Proteine deutlich vermindert. Bei der Inhibierung der Pertussis Toxin-sensitiven G-Proteine kann vermutet werden, daß dieser Effekt durch die Wirkung des Pertussis Toxins auf die PI-Hydrolyse, einschließlich der Folgereaktionen (IP₃-induzierter Calcium-Anstieg) zustande kommt. Darüber hinaus ist vermutlich auch PC-PLD Pertussis-Toxin sensitiv gehemmt. Zusammengefaßt deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß sowohl Zellwachstum als auch Cholesterinefflux G-Protein-abhängig erfolgen. Zellwachstum wird dabei über Aktivierung einer PI-PLC vermittelt. Cholesterinefflux wird durch PI-PLC nicht induziert. Die Rolle der PC-spezifischen Phospholipasen ist weniger spezifisch an eine der beiden vermuteten Hauptfunktionen der HDL (Induzierung von Zellwachstum, Induzierung von Cholesterinefflux) gekoppelt. Die Aktivität von PC-PLC ist – zumindestens *in vitro* – sowohl in die Induzierung von Cholesterinefflux als auch am Zellwachstum involviert. Auch PC-PLD könnte sowohl an Cholesterinefflux als auch an Wachstumsprozessen beteiligt sein. PC-PLD ist mit hoher Wahrscheinlichkeit G-Protein gekoppelt. Die Hemmung heterotrimerer G-Proteine mit Pertussis Toxin inhibiert sowohl Wachstum als auch Cholesterinefflux. Die genaue Beteiligung von PC-PLD ist derzeit schwierig zu erkennen, da es keine spezifischen Inhibitoren der PC-PLD gibt.

Bei der Aktivität von PI-PLC entstehen Inositolphosphate und DAG. Die mitogene Wirkung von IP, IP₂ und IP₃ wurde in der Literatur gezeigt [256, 307]. IP₃ führt zu einer konsekutiven Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern und zu einem Calcium-Influx. Apo-A-I-haltige Proteoliposomen waren weder in der Lage, einen PI-Umsatz zu induzieren, noch konnten sie einen Calciumanstieg bewirken [328]. Diese Ergebnisse deuten weiter darauf hin, daß Apo-A-I spezifisch in Cholesterineffluxmechanismen involviert ist, jedoch nicht an der Induzierung von Zellwachstumsprozessen beteiligt ist. Durch U73122, einen spezifischen PI-PLC-Inhibitor, wurde eindeutig das HDL-induzierte Zellwachstum gehemmt. In der Literatur wurde beschrieben, daß Lipide der HDL für den HDL-induzierten Calciumanstieg in der Zelle verantwortlich sind [264]. Die oben beschriebenen Ergebnissen zeigten, daß Lysosulphatide

Zellwachstum induzieren können. Möglicherweise aktivieren auf den HDL befindliche Lysosulphatide PI-PLC, induzieren Calcium-Anstieg und lösen so Zellwachstum aus.

DAG ist ein physiologischer Aktivator der PKC, die wiederum Cholesterin-Massenefflux induzieren kann. Warum eine *in vitro* Hemmung der PI-PLC durch U 73122 zu einem erhöhten Cholesterin-Massenefflux führt, ist unklar. DAG besteht aus einem Glycerin, an das in 1- und 3-Position Fettsäuren verestert sind. Die Aktivität des DAG hängt jedoch von der jeweiligen Fettsäure ab. Phosphatidylcholin hat in 1- und 3-Position vor allem Palmitinsäure und Ölsäure, Phosphatidylinositol hingegen vor allem Arachidonsäure und Stearinsäure. Somit könnte DAG, das aus PI gebildet wird, andere physiologische Eigenschaften haben als DAG, das aus PC stammt. PKC kann sowohl durch DAG aus PC aktiviert werden [96, 99, 273, 313, 328, 331] als auch durch DAG aus PIP₂ [7]. Jedoch aktiviert DAG aus PIP₂ die PKC α bis PKC ϵ , während DAG aus PC die PKC ζ aktiviert. DAG aus PIP₂ aktiviert ebenfalls die Phospholipase A₂, welche wiederum die Fettsäure in 2-Position aus Lipiden freisetzt, wobei dies häufig Arachidonsäure ist [7]. Auch bei der Lipolyse des PI-stämmigen DAG wird Arachidonsäure freigesetzt, die die Synthese der sogenannten Eicosanoide, zu denen Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene gehören, induzieren kann. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß auch eine Inhibierung der Phospholipase A₂ zu einer Erhöhung des HDL-induzierten Cholesterin-Masseneffluxes und zu einer vollständigen Wachstumshemmung führte. Es spricht somit einiges dafür, daß die normalen Aktivitäten der PI-PLC und der Phospholipase A₂ keine oder eine hemmende Wirkung auf den Cholesterin-Massenefflux haben. Beide Enzyme sind andererseits in das HDL-induzierte Zellwachstum involviert.

Wie oben beschrieben ist PC-PLC *in vitro* sowohl am HDL-induzierten Cholesterin-Masseneffluxes als auch am HDL-induzierten Zellwachstum beteiligt. Bei der Aktivierung der PC-PLC entstehen Phosphorylcholin und DAG. Da DAG ein Aktivator der PKC ist [41] und eine Beteiligung der PKC am Cholesterinefflux gezeigt wurde, ist dies eine plausible Erklärung für die beobachtete Hemmung des Cholesterineffluxes in Anwesenheit von PC-PLC-Hemmstoffen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß eine Hemmung der Proteinkinase C durch RO 31-8220 vor Zugabe der HDL dosisabhängig zu einem um bis zu 50 % verminderten Cholesterinefflux aus humanen Hautfibroblasten führt, während eine Aktivierung der PKC durch PMA ebenfalls dosisabhängig zu einem um bis zu 50 % erhöhten Cholesterinefflux führte. Eine Beteiligung von PKC am Cholesterinefflux war bereits aufgrund von Experimenten mit radioaktiven Cholesterinvorstufen vermutet worden [224, 226, 227, 240, 260, 269, 313]. Die hier beschriebenen Experimente zeigen, daß die Proteinkinase C am HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux beteiligt ist.

DAG und / oder Phosphorylcholin könnten auch für die Vermittlung des Zellwachstums verantwortlich sein. Eine Beteiligung von PKC wurde in der Literatur vermutet [338], konnte jedoch bisher nicht eindeutig gezeigt werden. Andererseits hatte in kultivierten Fibroblasten die spezifische Hemmung von PKC mittels RO 31-8220 keinen Einfluß auf den HDL-induzierten Einbau von Bromdeoxyuridin in die DNA. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob *in vitro* Phosphorylcholin Zellwachstum stimulieren kann. Es zeigte sich, daß Phosphorylcholin in den verwendeten Fibroblasten stark mitogen wirkte. Es wurde bereits 1993 diskutiert, ob Phosphorylcholin in NIH3T3 Maus-Fibroblasten eine mitogene Wirkung haben könnte [222]. Möglicherweise ist somit nicht DAG, sondern Phosphorylcholin die durch Aktivierung der PC-PLC gebildete mitogen wirkende Substanz. Zwar beschrieben Wright et al. [338] eine Korrelation zwischen dem Anstieg von DAG und der Inkorporationsrate von ³H-Thymidin und schrieben die mitogene Aktivität so dem DAG zu. Jedoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß in kultivierten Fibroblasten vermutlich Phosphorylcholin für die mitogene Aktivität verantwortlich ist.

Die Inhibierung von Tyrosinkinase zeigte, daß diese vermutlich nicht in den HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux involviert sind. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß eine Inhibierung dieser Proteinkinase das HDL-induzierte Zellwachstum hemmt (Abbildung 5.68). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, daß zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege bestehen. Die Inhibierung der MAP-Kinase, einer Kinase, die sowohl Tyrosin- als auch Serin- Threoninreste phosphoryliert, hemmte das HDL-induzierte Zellwachstum. Es wird vermutet, daß die mitogene Wirkung der HDL über die Aktivierung der MAP-Kinase vermittelt wird [89, 319]. Die MAP-Kinase ist wiederum ein Downstream-Effektor der PLA₂, für die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls die Beteiligung an mitogenen Effekten gezeigt wurde.

Die gezielte Beeinflussung des extra- wie des intrazellulären Calciumspiegels hatte keinen Effekt auf den HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux (Abbildung 5.33). Cholesterinefflux kann durch Zugabe von Calcium-Antagonisten gesteigert werden [189, 196]. Allerdings wird die Wirkung auf eine durch die Calcium-Antagonisten erhöhte Bindungsfähigkeit der HDL zurückgeführt [189]. Andererseits induzierten HDL kein Wachstum, wenn im extrazellulären Medium kein Calcium vorhanden war. Wurde zusätzlich noch das intrazelluläre Calcium komplexiert, kam es zu keiner weiteren Verminderung. Eine Blockierung der Calcium-Kanäle in der Plasmamembran durch Nickelionen zeigte ebenfalls eine Hemmung des HDL-induzierten Zellwachstums. Offenbar ist Calcium für den mitogenen Effekt der HDL notwendig, möglicherweise vermittelt durch Ca²⁺-Influx. Auch in der Literatur wurde beschrieben, das extrazelluläre Calcium für die mitogene Wirkung in

Fibroblasten wichtig ist [28, 161, 237] und daß die intrazelluläre Calcium-Konzentration einen Einfluß auf den Zellzyklus haben kann [33, 326]. PI-PLC induziert zunächst die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (via IP_3), anschließend eine länger anhaltende Ca^{2+} -Influxphase [Daten noch unveröffentlicht]. Auch diese Daten deuten somit darauf hin, daß HDL zwei verschiedene Signalwege induziert, von denen einer mitogene Effekte auslöst.

Zusammengefaßt kann – basierend auf diesen Daten – das folgende Modell arbeitshypothetisch erstellt werden (Abbildung 6.1).

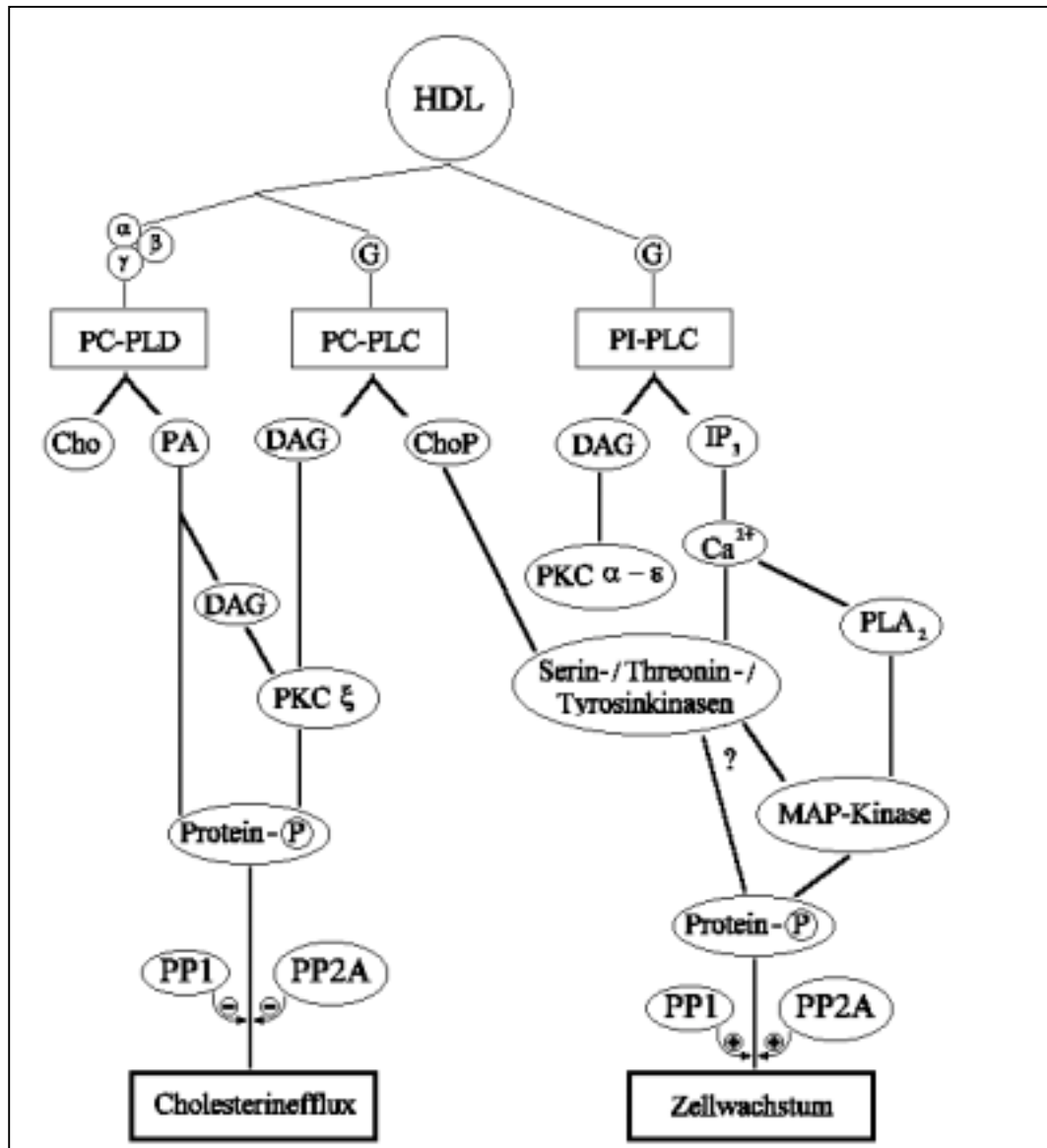


Abbildung 6.1: Durch HDL ausgelöste Signaltransduktionswege über PC-PLC, PC-PLD und PI-PLC.

α , β , γ heterotrimeres G-Protein; G: G-Protein; Cho: Cholin; PA: Phosphatidsäure; DAG: Diacylglycerin; ChoP: Phosphorylcholin; IP_3 : Inositoltriphosphat; PKC: Proteinkinase C; PLA_2 : Phospholipase A_2 ; MAP-Kinase: Mitogen activated Proteinkinase; Protein-P: phosphorylierte Proteine; PP1 und PP2A: Proteinphosphatasen der Gruppe 1 bzw. 2A;

Nachdem die beschriebenen Daten darauf hindeuteten, daß PKC an dem durch HDL induzierten Cholesterinefflux und den dazu gehörigen Signaltransduktionswegen beteiligt ist,

untersuchten wir auch den Einfluß von Proteinphosphatasen auf Cholesterinefflux und DNA-Synthese.

Proteinphosphatasen, die spezifisch Tyrosinreste dephosphorylieren und Proteintyrosinkinase hatten keinen signifikanten Einfluß auf den HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Literatur, aus der ebenfalls noch keine Beteiligung von Tyrosinkinase und -phosphatasen an dem Cholesterinefflux aus Fibroblasten bekannt ist. Hingegen hemmte sowohl eine Inhibition von Protein-Tyrosin-Phosphatasen als auch von Tyrosinkinase auch das HDL-induzierte Zellwachstum. Auch in der Literatur wurde beschrieben, daß in Fibroblasten Wachstumsprozesse durch Tyrosinkinase vermittelt werden [45, 67, 243, 256, 307, 319]. Daher ist es zunächst unerwartet, daß auch eine Inhibition von Tyrosin-Phosphatasen, also Gegenspieler dieser Tyrosinkinase zu einer Hemmung des Zellwachstums führte. Es kann nur spekuliert werden, daß verschiedene Proteine diese Effekte verursachen, z.B. könnte ein tyrosinphosphoryliertes Protein für den Phasenwechsel im Zellzyklus verantwortlich sein, während ein anderes den HDL-vermittelten Effekt weiterleitet. In der Literatur wurden mehrere Proteine beschrieben, deren Dephosphorylierung für den Zellzyklus wichtig sind [234, 235]. Auch wurde eine Tyrosin-Kinase gefunden, deren Überexprimierung zu einer Arretierung des Zellzyklus führt [218]. Somit wird die Zelle durch die unspezifische Inhibition aller Protein-Tyrosin-Phosphatasen möglicherweise in einer Phase des Zellzyklus arretiert.

Weiterhin wurden Phosphatasen der PPP- und PPM-Familie untersucht, die phosphorylierte Serin- und Threoninreste dephosphorylieren. Hier zeigte sich, daß die Hemmung dieser Phosphatasen zu einer Steigerung des HDL-abhängigen und HDL-unabhängigen Cholesterin-Masseneffluxes auf das bis zu 5-fache des Ausgangswertes und zu einer Hemmung des HDL-induzierten Zellwachstums führte.

Die Hemmung des Zellwachstums ist vermutlich auf eine Beeinflussung von Proteinen des Zellzyklus zurückzuführen. So wurden bereits Serin- / Threoninkinase gefunden, die nach Zugabe eines Mitogens aktiviert wurden [25, 222, 275] und der Effekt von Ser/Thr-Phosphatasen auf eine Arretierung des Zellzyklus wurde ebenfalls beschrieben und auf eine Wirkung der Phosphatasen im Zellkern zurückgeführt [6, 344]. Die Wirkung des PP2A-spezifischen Phosphatase-Inhibitors Endothall war nicht so stark wie die Wirkung der anderen Phosphatase-Inhibitoren. Da Endothall spezifisch für Phosphatasen der Gruppe PP2A ist, und erst in sehr hohen Konzentrationen auf Phosphatasen der Gruppe PP1 wirkt, ist dies ein Indiz für die Beteiligung von Phosphatasen der Gruppe PP2A und Phosphatasen der Gruppe PP1.

Bei geringer Inhibitor- und HDL-Konzentration zeigte sich ein additiver Effekt beim HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux, der maximale Effekt mit Inhibitor bzw. mit Inhibitor

und HDL war jedoch vergleichbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß Inhibitor und HDL über dieselben Signaltransduktionsvorgänge Cholesterinefflux induzieren.

Dabei gibt es Hinweise, daß eine Phosphatase der PP1-Gruppe für die Verstärkung des Cholesterineffluxes verantwortlich ist, wenn man die Hemmkonzentrationen mit Daten der Literatur vergleicht. Eine genaue Aussage läßt sich nicht treffen, da in dem von uns verwendeten Zelltyp die Wirkkonzentrationen der Inhibitoren auf die einzelnen Phosphatasen nicht im Detail untersucht wurden. Die aus der Literatur abgeleiteten Wirkkonzentrationen stammen aus anderen Zelltypen und könnten bei unserem Zelltyp abweichen. Dagegen spricht jedoch, daß die relative Wirkung der Inhibitoren sowohl bei der Proteinphosphorylierung als auch bei der Beeinflussung des Cholesterineffluxes mit den bei anderen Zelltypen gewonnenen Daten übereinstimmen. Das heißt, der IC_{50} -Wert von Calyculin A war etwa 100-fach kleiner als der IC_{50} -Wert von Okadasäure, der wiederum etwa 50-fach kleiner war als der IC_{50} -Wert von Cantharidin. Auch die Untersuchungen mit Endothall deuten darauf hin, daß die Wirkkonzentration der Phosphatasen der in der Literatur beschriebenen entspricht. Dieser Inhibitor ist spezifisch für Phosphatasen der Gruppe PP2A und hemmt erst in sehr hohen Konzentrationen Phosphatasen der Gruppe PP1. Phosphatasen der Gruppe PP2B hemmt dieser Inhibitor nicht. Da bei Endothall erst bei Konzentrationen über 10 μ M eine Wirkung eintrat, und die Hemmung erst bei Konzentrationen von mehreren mM vollständig war, kann davon ausgegangen werden, daß bei diesen hohen Konzentrationen Phosphatasen der Gruppe PP1 gehemmt werden.

Jedoch zeigen alle vier getesteten Inhibitoren bei niedrigeren Konzentrationen zunächst eine offenbar verstärkte Wirkung zusammen mit HDL, die bei einer Inkubation der Zellen nur mit dem Inhibitor ohne HDL nicht auftritt. So verdoppelt sich der Efflux mit 0,1 nM Okadasäure, während der Inhibitor ohne Zugabe von HDL bei Konzentrationen in diesem Bereich keine Wirkung zeigt. Der gleiche Effekt tritt bei 2,5 nM Calyculin A, bei 0,1 nM Cantharidin und bei 100 μ M Endothall auf. Diese Konzentrationen sind zumeist im Wirkungsbereich für die Hemmung von Phosphatasen der Gruppe PP2A oder liegen nur knapp darüber. Dieser vermutlich synergistische Effekt tritt jedoch nicht ohne Zugabe von HDL auf. Dies könnte bedeuten, daß eine Phosphatase der Gruppe PP2A spezifisch für den durch HDL-induzierten zum Cholesterinefflux führenden Signaltransduktionsweg ist, während eine Phosphatase der Gruppe PP1 HDL-unabhängig Cholesterinefflux induziert.

Auch in der Literatur wurden der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux und Phosphatase-Inhibitoren an humanen Hautfibroblasten bereits untersucht [114], jedoch kam man dort zu dem Schluß, daß Phosphatase-Inhibitoren den HDL-induzierten Cholesterin-Massenefflux hemmen. Diesen Widerspruch zu den hier vorgestellten Daten kann man möglicherweise

durch die unterschiedliche Methodik erklären: Fielding & Fielding inkubierten die Zellen zunächst drei Stunden mit Okadasäure, wechselten anschließend das Medium und führten dann die Cholesterineffluxmessung durch. In der hier vorgestellten Arbeit zeigt sich jedoch, daß nach drei Stunden Inkubation mit Okadasäure bereits eine sehr große Menge Cholesterin aus der Zelle entfernt worden war (etwa 30 bis 50 % des gesamten zellulären Cholesterins), so daß bei einer anschließenden Messung kein Efflux mehr zu erwarten wäre.

Um zu überprüfen, ob die durch HDL phosphorylierten Proteine dieselben sind, die durch Phosphatase-Inhibitoren hyperphosphoryliert werden, wurde der Einfluß der Phosphatase-Inhibitoren in menschlichen Hautfibroblasten verglichen.

Die Untersuchung der Phosphorylierung von Proteinen in der Zelle nach Zugabe von HDL und Apo-A-I zeigte, daß 15 Proteine durch HDL (mit einem Molekulargewicht von 14, 18, 20, 23, 29, 34, 38, 42, 47, 51, 59, 65, 71, 75 und 81 kDa) und 3 durch Apo-A-I (mit einem Molekulargewicht von 14, 65 und 71 kDa) hyperphosphoryliert wurden. Die Beobachtung, daß Apo-A-I nur einen Teil der Proteine phosphorylierte, die durch HDL phosphoryliert wurden, deutet auf die bereits vermutete bifunktionelle Rolle von HDL hin (Cholesterinefflux und Wachstum) [328]. Andere mögliche Agonisten auf HDL könnten z. B. Lipide sein, wie von Walter et al. und Deeg et al. vermutet wurde [89, 328].

Ein 14 kDa-Protein wurde durch freies Apo-A-I stärker phosphoryliert als durch HDL. Da dieser Effekt bei Zugabe von Apo-A-I-Proteoliposomen jedoch nicht auftrat, könnte es sich bei diesem Peptid um ein artifiziell bedingtes Abbauprodukt eines anderen Proteins handeln.

Die Zugabe von TNM-modifiziertem HDL führte nur zu sehr geringen Erhöhungen der Phosphorylierung von maximal 35 %. Für keines der durch HDL phosphorylierten Proteine wurde eine vergleichbare Phosphorylierung mit TNM-HDL erzielt. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Proteine oder Lipide auf den HDL, die eine Phosphorylierung bewirken, sensibel für TNM sind.

Bei Inkubation mit den Phosphatase-Inhibitoren Calyculin A, Okadasäure und Cantharidin werden die 15 Proteine, die durch HDL und Apo-A-I hyperphosphoryliert werden, ebenfalls verstärkt phosphoryliert. Wesentlich stärker als bei der Inkubation mit HDL ist hierbei die Phosphorylierung eines 65 kDa-Proteins.

Die einzelnen phosphorylierten Proteine konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Jedoch ist aus der Literatur bekannt, daß durch HDL und Apo-A-I ein 27 kDa-Protein phosphoryliert wird, dessen Phosphorylierung vermutlich in Zusammenhang mit dem Zellwachstum steht [85]. Andere Autoren vermuteten, daß Kinasen in Fibroblasten durch HDL phosphoryliert werden [89], mit Molekulargewichten von 42, 50, 52, 58 und 60 kDa. Apo-A-I verstärkt die Phosphorylierung des 42 kDa-Proteins nicht. Auch in dieser Arbeit war

der Effekt von Apo-A-I auf das 42 kDa-Protein nur gering. Möglicherweise handelt es sich somit bei dem 42 kDa-Protein um das von Deeg et al. [89] beschriebene Dimer der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2. Weiterhin wurden in der Literatur ein 80 kDa, ein 27 kDa und ein 18 kDa großes Protein beschrieben, die durch HDL phosphoryliert werden [127]. Dabei wurde das 18 kDa große Protein auch durch Apo-A-I phosphoryliert. Welches der 15 untersuchten Proteine letztendlich für den verstärkten Cholesterinefflux bzw. das verstärkte Zellwachstum verantwortlich ist, kann derzeit nicht beurteilt werden.

Zusammengefaßt kann man feststellen, daß HDL *in vitro* die Phosphorylierung von mindestens 15 Proteinen in menschlichen Hautfibroblasten induziert. Einer der für diese Phosphorylierungen verantwortlichen Agonisten auf den HDL ist Apo-A-I. Durch eine Inkubation mit Phosphatase-Inhibitoren werden alle diese Proteine ebenfalls phosphoryliert. Da Apo-A-I für den Cholesterinefflux-induzierenden Effekt der HDL verantwortlich gemacht wird, und auch Phosphatase-Inhibitoren den Cholesterinefflux verstärken, sind die durch Apo-A-I phosphorylierten Proteine möglicherweise in die Cholesterineffluxmechanismen involviert. Die anderen Proteine könnten an der Signaltransduktion des HDL-induzierten Zellwachstums beteiligt sein. Interessanterweise verstärkten Serin- / Threonin-Phosphatase-Inhibitoren Cholesterinefflux, die mitogenen Effekte wurden jedoch gehemmt (sowohl durch Tyrosin- als auch durch Serin- / Threonin-Phosphatase-Inhibitoren). Dieser inverse Zusammenhang ist ein weiteres Indiz für die bifunktionelle Rolle von HDL. Zudem zeigt sich ein völlig neues Therapiekonzept auf: Cholesterineffluxverstärkung und gleichzeitige Hemmung von mitogenen Effekten sind zumindestens aufgrund theoretischen Überlegungen potentiell anthiatherogen. Auch die geringen Wirkkonzentration einiger der untersuchten Phosphatase-Inhibitoren deuten auf ein pharmazeutisch nutzbares Potential hin.

Zusammengefaßt läßt sich feststellen, daß HDL mindestens zwei verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren. Vermutlich wird der zum Zellwachstum führende Signaltransduktionsweg durch Lipide, Lysosulphatide, initiiert und führt über die Aktivierung der PI-PLC zu einer Erhöhung des Calcium-Spiegels in der Zelle. Eine nachfolgende Aktivierung der MAP-Kinase verläuft nicht über PKC, sondern über eine Tyrosinreste phosphorylierende Proteinkinase (möglicherweise auch über eine Serin- / Threoninreste phosphorylierende Proteinkinase). Eine wichtige Rolle bei diesem Vorgang spielt ebenfalls der Influx von Calcium aus dem umgebenden Medium. Eine Inhibition von Phosphatasen, sowohl von Tyrosin-, wie auch Serin- / Threoninreste dephosphorylierende Phosphatasen, führt zu einer starken Wachstumshemmung (siehe auch Abbildung 6.1).

Der zu Cholesterin-Massenefflux führende Signaltransduktionsweg wird durch Apo-Proteine der HDL initiiert und verläuft über die PC-spezifischen Phospholipasen PC-PLC und PC-PLD. Beteiligt an diesem Vorgang ist ein G-Protein-abhängiger Prozeß, der durch Pertussis Toxin inhibiert werden kann. Tyrosinkinasen und -phosphatasen sind wahrscheinlich an diesem Vorgang nicht beteiligt, wohl aber eine Serin- / Threoninreste phosphorylierende PKC, die durch die Produkte der Aktivität von PC-PLC und PC-PLD aktiviert wird. Eine Veränderung des Calcium-Spiegels in der Zelle hat keinen Einfluß auf den Cholesterin-Massenefflux.

7. Literaturverzeichnis

1. Abe, A. *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **210**: 765-773 (1992).
2. Acton, S. *et al.*, *Science* **271**: 518-520 (1996).
3. Afshari, C.A. *et al.*, *Cancer Res.* **54**: 2317-2321 (1994).
4. Ailhaud, G., *Curr. Opin. Lipidol.* **3**: 222-226 (1992).
5. Alaupovic, P. *et al.*, *Metabolism* **30**: 805-816 (1981).
6. Alberts, A.S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 388-392 (1993).
7. Alberts, B. *et al.*, *Molekularbiologie der Zelle*, VCH-Verlag, 2. Auflage (1990).
8. Assmann G., *Lipid metabolism and atherosclerosis*. Schattauer Verlag, Stuttgart (1982).
9. Assmann, G. *et al.*, *Atherosclerosis* **30**: 321-332 (1978).
10. Assmann, G. *et al.*, *Curr. Opin. Lipidol.* **1**: 110-115 (1990).
11. Assmann, G. *et al.*, *Curr. Opin. Lipidol.* **2**: 110-117 (1991).
12. Assmann, G. *et al.*, In: Scriver, C.R. *et al.* (Eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th Edition. McGraw-Hill, New York, im Druck.
13. Assmann, G. *et al.*, In: *The metabolic basis of inherited disease*, Kapitel 64, McGraw-Hill, New York, 7. Aufl. (1994).
14. Assmann, G. *et al.*, *J. Clin. invest.* **59**: 565-575 (1977).
15. Assmann, G. *et al.*, *J. Clin. invest.* **60**: 1025-1035 (1977).
16. Assmann, G. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **60**: 242-249 (1977).
17. Assmann, G. und Schulte, H., *Am. J. Cardiol.* **59**: 9G-17G (1987).
18. Assmann, G. und Schulte, H., *Am. J. Cardiol.* **70**: 733-737 (1992).
19. Assmann, G., *Fettstoffwechselstörungen und koronare Herzkrankheit*. MMV Medizin, München (1988).
20. Asztalos, B. *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 1630-1637 (1997).
21. Aviram, M. und Brook, G., *Atherosclerosis*. **46**: 259-268 (1983).
22. Aviram, M. und Brook, G., *Haemostasis*. **13**: 344-350 (1983).
23. Babitt, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **272**: 13242-13249 (1997).
24. Badimon, J.J. *et al.*, *Circulation* **86**: suppl. III: III86-III96 (1992).
25. Ballou, L.M. *et al.*, *Nature* **349**: 348-350 (1991).
26. Banka, C.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 10288-10297 (1994).
27. Barbaras, R. *et al.*, *Biochem. J.* **269**: 767-774 (1990).
28. Barbiero, G. *et al.*, *Cell Calcium* **18**: 542-556 (1995).
29. Barford, D. *et al.*, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **27**: 133-64 (1998).
30. Barkia, A. *et al.*, *Atherosclerosis* **87**: 135-146, (1991).
31. Barrans, A. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1300**: 73-80 (1996).
32. Barrans, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 11572-11579 (1994).
33. Battistini, B. *et al.*, *Peptides* **14**: 385-399 (1993).
34. Beitz, H., *Prostaglandins, Leukotriens & Essentially Fatty Acids* **35**: 37-40 (1989).
35. Beitz, J. und Mest, H.J., *Prostaglandins Leukotriens Med.* **23**: 303 (1986).
36. Belham, C.M. *et al.*, *Cell Signal.* **9**: 109-116 (1997).
37. Bielicki, J.K. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1084**: 7-14 (1991).
38. Bielicki, J.K. *et al.*, *J. Lipid Res.* **33**: 1699-1709 (1992).
39. Bierenbaum, M.L. *et al.*, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **134**: 638-641 (1979).
40. Biesbroeck, R. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **17**: 525-539 (1983).
41. Billah, M.M., *Curr. Opin. Immun.* **5**: 114-123 (1993).
42. Biran, S. *et al.*, *Int. J. Cancer* **31**, 557-566 (1983).
43. Björkerud, S. und Björkerud, B., *Arterioscler. Thromb.* **14**, 288-298 (1994).
44. Blich, E.G. und Dyer, W.J., *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917 (1959).
45. Blumberg, D. *et al.*, *J. Neurosci. Res.* **41**: 628-639 (1995).
46. Bochkov, V. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**: 1295-1304 (1992).
47. Bodzioch, M. *et al.*, *Nature Genetics* **22**: 347-351 (1999).
48. Boguski, M.S., *J. Lipid Res.* **33**: 957-974 (1992).
49. Bojanovski, D. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **259**: 6049-6056 (1984).
50. Bojanovski, D. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **80**: 1742-1749 (1987).
51. Bolin, D.J. und Jonas, A., *J. Biol. Chem.* **269**: 7429-7434 (1994).
52. Bond, H.M. *et al.*, *Biochem. J.* **279**: 633-640 (1991).
53. Boyd, N.F. und McGuire, V., *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 460-468 (1990).
54. Brasaemle, D.L. und Attie, A.D., *J. Lipid Res.* **31**: 103-112 (1990).
55. Brinton, E.A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **261**: 495-503 (1994).

56. Brooks-Wilson, A. *et al.*, *Nature Genetics* **22**: 336-345 (1999).
57. Brouillette, C.G. und Anantharamaiah, G.M., *Biochim. Biophys. Acta* **1256**: 103-111 (1995).
58. Brown, B.G. *et al.*, *Circulation* **80**: suppl. II, II266 (1989).
59. Brown, M.S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **255**: 9344-9352 (1980).
60. Brown, M.S. *et al.*, *Science* **232**: 34-47 (1986).
61. Brown, M.S. und Goldstein, J.L., *Science* **232**: 34-47 (1986).
62. Bruce, C. *et al.*, *Annu. Rev. Nutr.* **18**: 297-330 (1998).
63. Carlson, L.A. *et al.*, *Acta Med. Scand.* **222**: 345-352 (1987).
64. Carstea, E.D. *et al.*, *Science* **277**: 180-181 (1997).
65. Castle, C.K. *et al.*, *J. Lipid Res.* **32**: 439-447 (1991).
66. Chacko, G.K. *et al.*, *J. Lipid Res.* **29**: 1985-1989 (1988).
67. Chambard, J.C. *et al.*, *Nature* **326**: 800-803 (1987).
68. Cheung, M.C. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **91**: 522-527 (1993).
69. Cheung, M.C. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **962**: 258-266 (1988).
70. Cheung, M.C. und Wolf, A.C., *J. Lipid Res.* **30**: 499-507 (1989).
71. Chin, T.Y. und Chueh, S.H., *Am. J. Physiol.* **275**: C1255-C1263 (1998).
72. Chiu, D.S. *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 2350-2358 (1997).
73. Clay, M.A. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1124**: 52-57 (1992).
74. Clay, M.A. und Barter, P.J., *J. Lipid Res.* **37**: 1722-1733 (1996).
75. Cockerill, G.W. *et al.*, *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 1987-1994 (1995).
76. Cockerill, G.W. und Reed, S., *Int. Rev. Cyt.* **188**: 257-297 (1999).
77. Cohen, P., *Curr. Top. Cell. Regul.* **14**: 117-196 (1992).
78. Coxe, R.A., *et al.*, *J. Lipid Res.* **34**: 1165-1176 (1993).
79. Cuadrado, A. *et al.*, *Oncogene* **8**: 2959-2968 (1993).
80. Cullen, P. *et al.*, *Anal. Biochem.* **251**: 39-44 (1997).
81. Czarnecka, H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **271**: 2023-2028 (1996).
82. Czarnecka, H. und Yokoyama, S., *Biochemistry*, **34**: 4385-4392 (1995).
83. Daniels, R. J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **256**: 4978-4983 (1981).
84. Danielsen, E.M. *et al.*, *J. Cell Biol.* **120**: 1347-1352 (1993).
85. Darbon, J.M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **261**: 8002-8008 (1986).
86. Davidson, W.S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 22975-22982 (1994).
87. Davidson, W.S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **270**: 17106-17113 (1995).
88. Davidson, W.S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **270**: 5882-5890 (1995).
89. Deeg, M.A. *et al.*, *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 1667-1674 (1997).
90. DeLamatre, J. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **875**: 419-428 (1986).
91. Desai, N.N. *et al.*, *J. Cell Biol.* **121**: 1385-1395 (1993).
92. Desai, N.N. und Spiegel, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 361-366 (1991).
93. Dieplinger, H. *et al.*, *J. Lipid Res.* **26**: 273-280 (1985).
94. Dietschy, J.M. *et al.*, *J. Lipid Res.* **34**: 1637-1659 (1993).
95. Draude, G. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* **57**: 383-386 (1999).
96. Drobnik, W. *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 1369-1377 (1995).
97. Drobnik, W. *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 28-38 (1999).
98. Duel, B.P. *et al.*, *Diabetes* **40**: 377-384 (1991).
99. Dusserre, E. *et al.*, *Biochem. Med. Metab. Biol.* **52**: 45-54 (1987).
100. Duverger, N. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1182**: 30-36 (1993).
101. Eberhardt, E. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 836-842 (1998).
102. Eisenberg, S., *J. Lipid Res.* **25**: 1017-1058 (1984).
103. Endemann, G., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**: 11811-11816 (1993).
104. Favre, G. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1013**, 118-124 (1989).
105. Favre, G. *et al.*, *J. Lipid Res.* **34**, 1093-1106 (1993).
106. Ferrigno, P. *et al.*, *Mol. Biol. Cell* **4**: 669-677 (1993).
107. Fidge, N.H. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**: 759-765 (1985).
108. Fidge, N.H., *J. Lipid Res.* **40**: 187-201 (1999).
109. Fielding C. und Fielding P.E., *J. Lipid Res.* **36**: 211-218 (1995).
110. Fielding, C.J. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**: 1493-1502 (1972).
111. Fielding, C.J. und Fielding, P.E., *Biochemistry* **34**: 14237-14244 (1995).
112. Fielding, C.J. und Fielding, P.E., *J. Lipid Res.* **38**: 1503-1521 (1997).
113. Fielding, C.J. und Fielding, P.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 3911-3914 (1994).
114. Fielding, P.E. und Fielding, C.J., *Biochemistry* **34**: 14288-14292 (1995).
115. Figde, N.H., *FEBS Lett.* **199**: 265-268 (1986).
116. Fleisher, N. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **257**: 6653-6655 (1982).

117. Folch, J., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **226**: 497-509 (1957).
118. Forester, G.P. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **258**: 5938-5945 (1983).
119. Forte, T.M. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **920**: 185-193 (1987).
120. Forte, T.M. *et al.*, *J. Lipid Res.* **34**: 317-324 (1993).
121. Francis, G.A. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **96**: 78-87 (1995).
122. Francone, O.L. *et al.*, *J. Lipid Res.* **37**: 1268-1274 (1996).
123. French, J.K. *et al.*, *Am. J. Cardiol.* **71**: 505-510 (1993).
124. Frick, M. H. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **317**: 1237-1245 (1987).
125. Funke, H. *et al.*, *Arteriosclerosis* **4**: 452-461 (1984).
126. Garcia, A. *et al.*, *Biochemistry* **35**: 13064-13071 (1996).
127. Garver, W.S. *et al.*, *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 2698-2706 (1997).
128. Gerdes, U., Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster (1997).
129. Giguere, L. *et al.*, *J. cell Physiol.* **110**, 72-80 (1982).
130. Gillotte, K.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **271**: 17106-17113 (1996).
131. Goetzl, E.J. und An, S., *FASEB J.* **12**: 1589-1598 (1998).
132. Gold, J.C. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1027**: 85-92 (1990).
133. Goldstein, J.L. *et al.*, In: *The metabolic basis of inherited disease*, McGraw-Hill, New York, 7. Aufl. (1994).
134. Gordon, D. *et al.*, *Am J. Med.* **62**: 707-714 (1977).
135. Gordon, D. und Rifkind, B.M., *N. Engl. J. Med.* **321**: 1311-1315 (1989).
136. Gordon, D.J. *et al.*, *Circulation* **79**: 8-15 (1989).
137. Gordon, V. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **258**: 6202-6211 (1983).
138. Gospodarowicz, D. *et al.*, *J. Cell Biol.* **89**, 568-578 (1981).
139. Gospodarowicz, D. *et al.*, *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 2726-2730 (1980).
140. Graham, D.L. und Oram, J.F., *J. Biol. Chem.* **262**: 7439-7442 (1987).
141. Green, P.H.R. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **62**: 528- 536 (1978).
142. Griffin, J.H. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **103**: 219-227 (1999).
143. Guy, G.R. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**: 2141-2148 (1993).
144. Hamilton, K.K. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**: 3632-3638 (1993).
145. Hamilton, R.L. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **58**: 667-675 (1976).
146. Hanada, K. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **267**: 23527-23533 (1992).
147. Hara, A. und Radin, N.S., *Anal. Biochem.* **90**: 420-426 (1978).
148. Hara, H. *et al.*, *Biochemistry* **31**: 2040-2046 (1992).
149. Hara, H. *et al.*, *Lipids* **27**: 302-304 (1992).
150. Hara, H. und Yokoyama, S., *J. Biol. Chem.* **266**: 3080-3086 (1991).
151. Havel, R.J. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **34**: 1345-1353 (1955).
152. Heider, J.G. und Boyett, R.L., *J. Lipid Res.* **19**: 514-518 (1978).
153. Heinen, R.S. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **61**: 120-127 (1978).
154. Hennessy, L.K. *et al.*, *Biochemistry* **32**: 5759-5766 (1993).
155. Hernandez-Alcoceba, R. *et al.*, *Oncogene* **15**: 2289-2301 (1997).
156. Higashihara, M. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 1331-1336 (1991).
157. Holian, O. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 599-604 (1991).
158. Horowitz, B.S. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **91**: 1743-1751 (1993).
159. Hua, X. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 11603-11607 (1993).
160. Huang, J.S. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **366**: 131-138 (1999).
161. Huang, S. *et al.*, *Biochem J.* **310**: 881-885 (1995).
162. Huang, Y. *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 1412-1418 (1995).
163. Huth, K. *et al.*, *DMW* **95**: 2357-2366 (1970).
164. Ishida, B.Y. *et al.*, *J. Lipid Res.* **31**: 227-234 (1990).
165. Jahan, I. *et al.*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **122**: 249-253 (1996).
166. Jauhiainen, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**: 4032-4041 (1993).
167. Jauhiainen, M. und Dolphin, P.G., *J. Biol. Chem.* **261**: 7032-7043 (1986).
168. Jiang, X.J. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **98**: 2373-2381 (1996).
169. Johnson, W.J. *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* **1085**: 273-298 (1991).
170. Johnson, W.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **261**: 5766-5776 (1986).
171. Johnson, W.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **263**: 14099-14106 (1988).
172. Jonas, A., *Biochem. Biophys. Acta* **1084**: 205-225 (1991).
173. Jonas, A., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1166**: 202-210 (1993).
174. Jonas, A., *et al.*, *J. Lipid Res.* **32**: 97-106 (1991).
175. Jonas, A., *Methods Enzymol.* **128**: 553-582 (1986).

176. Jozan, S. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 105-112 (1985).
177. Jürgens, G. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **264**: 8549-8556 (1989).
178. Karlin, J.B. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **262**: 12557-12564 (1987).
179. Khoo, M. *et al.*, *J. Lipid Res.* **31**: 348-358 (1990).
180. Kilsdonk, E.P.C. *et al.*, *J. Lipid Res.* **33**: 1373-1382 (1992).
181. Kim, I.S. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**: 177-182 (1994).
182. Ko, K.W.S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 28206-28213 (1994).
183. Ko, Y. *et al.*, *Atherosclerosis* **99**: 253-259 (1993).
184. Kobayashi, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 9817-9821 (1994).
185. Komaba, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **267**: 17560-17566 (1992).
186. Koo, C. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **260**: 11934-11942 (1985).
187. Korn, B.S. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **102**: 2050-2060 (1998).
188. Kozarsky, K.F. *et al.*, *Nature* **387**: 414-421 (1997).
189. Krone, W. *et al.*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **10**: 199-202 (1987).
190. Kunitake, S.T. *et al.*, *J. Lipid Res.* **33**: 1807-1815 (1992).
191. L'Allemain, G. und Pouyssegur, J., *FEBS Lett.* **197**: 344-348 (1986).
192. Lagrost, L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **270**: 13004-13009 (1995).
193. Landschulz, K.T. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **98**: 984-995 (1996).
194. Lange, Y. und Steck, T.L., *J. Biol. Chem.* **269**: 29371-29374 (1994).
195. Law, S.W. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **260**: 257-266 (1985).
196. Lesnik, P. *et al.*, *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 979-988 (1997).
197. Li, M. *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* **1405**: 110-120 (1998).
198. Li, Q. *et al.*, *Biochemistry* **32**: 4597-4603 (1993).
199. Li, W.H. *et al.*, *J. Lipid Res.* **29**: 245-271 (1988).
200. Li, Y.M. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* **46**: 1435-1441 (1993).
201. Li, Y.M. und Casida, J.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11867-11871 (1992).
202. Liang, H.Q. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1257**: 31-42 (1995).
203. Liang, H.Q. *et al.*, *J. Lipid Res.* **35**: 1187-1193 (1994).
204. Liang, H.Q. *et al.*, *J. Lipid Res.* **37**: 1962-1971 (1996).
205. Libby, P. *et al.*, *J. Cell Physiol.* **124**: 1-8 (1985).
206. Liliom, K. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **273**: 13461-13468 (1998).
207. Lindgren, F.T., Serum lipoproteins: isolation and analysis with the preparative and analytical ultracentrifuge *In: Fundamentals of Lipid Chemistry*, Burton, R.M., Guerra, F.C. (Hrsg.), Webster Groves, Bi-Science Publications Division, 475-510 (1974).
208. Lindl, T. und Bauer, J., *Zell- und Gewebekultur*. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag (1987).
209. Loftus, S.K. *et al.*, *Science* **277**: 232-235 (1997).
210. Lusa, S. *et al.*, *Biochem. J.* **313**: 275-283 (1996).
211. Lux, S.E. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **51**: 2505-2514 (1972).
212. Mahlberg, F.H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **266**: 19930-19937 (1991).
213. Mahlberg, F.H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **267**: 4541-4550 (1992).
214. Mahley, R.W., *Science* **240**: 622-628 (1988).
215. Makrides, S.C. *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **173**: 465-472 (1988).
216. Manninen, V. *et al.*, *JAMA* **260**: 641-651 (1988).
217. Matsumoto, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **272**: 16778-16782 (1997).
218. Mattioni, T. *et al.*, *Oncogene* **10**: 1325-1333 (1995).
219. McCall, M.R. *et al.*, *J. Lipid Res.* **29**: 1127-1135 (1988).
220. McCall, M.R. *et al.*, *J. Lipid Res.* **30**: 1579-1586 (1989).
221. McKnight, G.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **267**: 12131-12141 (1992).
222. Meloche, S. J., *Cell Physiol.* **163**: 577-588 (1995).
223. Mendez, A. und Oram, J.F., *Biochim. Biophys. Acta* **1346**: 285-299 (1997).
224. Mendez, A.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **266**: 10104-10111 (1991).
225. Mendez, A.J. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **94**: 1698-1705 (1994).
226. Mendez, A.J. und Uint, L., *J. Lipid Res.* **37**: 2510-2517 (1996).
227. Mendez, A.J., *J. Biol. Chem.* **270**: 5891-5900 (1995).
228. Mendez, A.J., *J. Lipid Res.* **38**: 1807-1814 (1997).
229. Miida, T. *et al.*, *Biochemistry* **31**: 11112-11119 (1992).
230. Miller, N.E. *et al.*, *Lancet* **1**: 965-968 (1977).
231. Miller, N.E., *Atherosclerosis: mechanisms and approaches to therapy*. Raven Press, New York (1984).
232. Miller, N.E., *High density lipoproteins and atherosclerosis II*, Elsevier, New York (1989).
233. Mizutani, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**: 499-505 (1997).
234. Morla, A.O. *et al.*, *Cell* **58**: 193-203 (1989).

235. Morla, A.O. und Wang, J.Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8191-8195 (1986).
236. Munaron, L. *et al.*, *Cell Calcium* **22**: 179-188 (1997).
237. Munaron, L. *et al.*, *J. Physiol. Lond.* **484**: 557-566 (1995).
238. Murata, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 10339-10343 (1995).
239. Musliner, T.A. *et al.*, *J. Lipid Res.* **32**: 917-932 (1991).
240. Nazih, H. *et al.*, *Thrombosis Res.* **59**: 913-920 (1990).
241. Neary, R. *et al.*, *Atherosclerosis* **89**: 35-46 (1991).
242. Neufeld, G. *et al.*, *Regul. Pept.* **13**, 293-305 (1986).
243. Neverov, N.I. *et al.*, *J. American Soc. Nephrol.* **8**: 1247-1256 (1997).
244. Nofer, J.R. *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**: 861-869 (1998).
245. Nose, K. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* **21**: 911-913 (1998).
246. O'Brien, W.F. *et al.*, *Prostaglandins* **38**: 45-51 (1989).
247. Okajima, F. und Kondo, Y., *J. Biol. Chem.* **270**: 26332-26340 (1995).
248. Oram J.F. und Yokoyama, S., *J. Lipid Res.* **37**: 2473-2482 (1997).
249. Oram, J.F. *et al.*, *Arteriosclerosis Thromb.* **11**: 403-411 (1991).
250. Oram, J.F. *et al.*, *Circulation* **96** (suppl.) I: 463-464 (abstract) (1996).
251. Oram, J.F. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **262**: 2405-2410 (1987).
252. Oram, J.F. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **72**: 1611-1621 (1983).
253. Osborne, T. F. und Rosenfeld, J.M., *Curr. Opin. Lipidol.* **9**: 137-140 (1998).
254. Pan, Q.X. *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.* **95**: 597-600 (1991).
255. Parhami, F., *et al.*, *J. Clin. Invest.* **92**: 471-478 (1993).
256. Paris, S. und Pouyssegur, J., *EMBO-J.* **5**: 55-60 (1986).
257. Parthasarathy, S. *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* **1044**: 275-283 (1990).
258. Patsch, W. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **255**: 3178-3185 (1980).
259. Phillips, M. C. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **906**: 223-276 (1987).
260. Phillips, M.C. *et al.*, *Atherosclerosis* **36**: 409-422 (1980).
261. Pieters, M.N. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1225**: 125-134 (1994).
262. Pittman, R.C., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **262**: 2435-2442 (1987).
263. Plesnila, N. *et al.*, *Acta Neurochir. Sup II. Wien* **71**: 203-205 (1998).
264. Pörn, M.I. *et al.*, *Biochem. J.* **279**: 29-33 (1991).
265. Pritchard, P.H. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **958**: 227-234 (1988).
266. Rakhit, S. *et al.*, *Biochem J.* **338**: 643-649 (1999).
267. Reichl, D. *et al.*, *J. Lipid Res.* **26**: 1399-1411 (1985).
268. Reis, G.J. *et al.*, *Am. J. Cardiol.* **68**: 1431-1435 (1991).
269. Remaley, A.T. *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 1813-1822 (1997).
270. Rigotti, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **271**: 33545-33549 (1996).
271. Rigotti, A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 12610-12621 (1997).
272. Robenek, H. und Schmitz, G., *Arterioscl. Thromb.* **11**: 1007-1020 (1991).
273. Rogler, G. *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 683-690 (1995).
274. Ross, R. *et al.*, *Science (Wash. D.C.)* **180**: 1332-1339 (1973).
275. Rossomando, A.J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6940-6943 (1989).
276. Rothblat, G.H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **257**: 4775-4782 (1982).
277. Rothblat, G.H., *et al.*, *J. Lipid Res.* **33**: 1091-1098 (1992).
278. Rust, S. *et al.*, *Nature Genetics* **20**: 96-98 (1998).
279. Rust, S. *et al.*, *Nature Genetics* **22**: 352-355 (1999).
280. Rye, K.A., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1167**: 316-325 (1993).
281. Rye, K.A., *J. Lipid Res.* **30**: 335-346 (1989).
282. Sakai, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **273**: 5785-5793 (1998).
283. Saku, K. *et al.*, *Thromb. Res.* **39**: 1-8 (1985).
284. Scanu, A.M. und Edelstein, C., *Anal. Biochem.* **44**: 576-588 (1971).
285. Schaefer, E.J. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **70**: 934-941 (1982).
286. Schaefer, E.J. *et al.*, *J. Lipid Res.* **23**: 1259-1273 (1982).
287. Schaefer, E.J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **299**: 905-910 (1978).
288. Schaefer, E.J., *Arterioscl.* **4**: 303-322 (1984).
289. Schaefer, H.E. *et al.*, *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **60**: 473 (1976).
290. Schaefer, H.E. und Assmann, G., *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **61**: 401 (1977).
291. Schaefer, H.E. und Assmann, G., *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **63**: 708 (1979).
292. Schmitz, G. *et al.*, *Arteriosclerosis* **10**: 1010-1019 (1990).
293. Schmitz, G. *et al.*, *EMBO J.* **4**: 613-618 (1985).
294. Schmitz, G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6305-6309 (1985).

295. Schroeder, F. und Nemezc, G., *In: Advances in Cholesterol Research*. Esfahani, M., Swaney, J., editors. Telford Press, Caldwell, NJ.: 47-87 (1990).
296. Segrest, J.P. *et al.*, *J. Lipid Res.* **33**: 141-166 (1992).
297. Serres, M. *et al.*, *Exp. Cell Res.* **231**: 163-172 (1997).
298. Seufferlein, T. und Rozengurt, E., *J. Biol. Chem.* **270**: 24334-24342 (1995).
299. Simionescu, N. *et al.*, *J. Cell Biol.* **97**: 1592-1600 (1983).
300. Simons, K. und Ikonen, E. *Nature* **387**: 569-572 (1997).
301. Siouffi, A.M., *J. Chromatography* **492**: 471-538 (1989).
302. Slotte, J.P. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **262**: 12904-12907 (1987).
303. Smith, P.K. *et al.*, *Anal. Biochem.* **150**: 76-85 (1985).
304. Spiegel, S., *J. Leukoc. Biol.* **65**: 341-344 (1999).
305. Spillane, D.M. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1254**: 283-294 (1995).
306. Steinberg, D. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **320**: 915-924 (1989).
307. Takakashi, Y. *et al.*, *J. Cell Physiol.* **178**: 69-75 (1999).
308. Tall, A.R. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **86**: 379-384 (1990).
309. Tall, A.R., *Ann. Rev. Biochem.* **64**: 235-242 (1995).
310. Tall, A.R., *J. Lipid Res.* **27**: 361-367 (1986).
311. Tall, A.R., *J. Lipid Res.* **34**: 1255-1267 (1993).
312. Tam, S.P. *et al.*, *J. Lipid Res.* **24**: 1343-1349 (1983).
313. Theret, N. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**: 1361-1367 (1990).
314. Thrift, R.N. *et al.*, *J. Lipid Res.* **27**: 236-243 (1986).
315. Tint, G.S., *et al.*, *New Engl. J. Med.* **330**: 107-113 (1994).
316. Tonks, N.K. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **263**: 6722-6730 (1988).
317. Tozuka, M. und Fidge, N.H. *Biochem. J.* **261**: 239-248 (1989).
318. Tu, A.Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**: 23098-23104 (1993).
319. van Dijk, M. *et al.*, *Biochem. J.* **323**: 693-699 (1997).
320. von Eckardstein, A. *et al.*, *J. Lipid Res.* **39**: 987-996 (1998).
321. von Eckardstein, A. *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 691-703 (1995).
322. von Eckardstein, A. *et al.*, *Atherosclerosis* **138**: 25-34 (1998).
323. von Eckardstein, A. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1301**: 255-263 (1996).
324. von Eckardstein, A. *et al.*, *Curr. opin. Lipidol.* **5**: 404-410 (1994).
325. von Eckardstein, A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268(4)**: 2616-2622 (1993).
326. Wahl, M. und Gruenstein, E., *Mol. Biol. Cell* **4**: 293-302 (1993).
327. Wald, J.H., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **265(32)**: 20044-20050 (1990).
328. Walter, M. *et al.*, *Arterioscler. Thromb.* **15**, 1975-1986 (1995).
329. Walter, M. *et al.*, *Atherosclerosis* **110**: 203-208 (1994).
330. Walter, M. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **205**: 850-856 (1994).
331. Walter, M. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **98**, 2315-2323 (1996).
332. Walter, M. *et al.*, *Z. Kardiol.* **83**: 381-385 (1994).
333. Wang, C.S. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **920**: 9-16 (1987).
334. Watkins, L.O. *et al.*, *Am. J. Cardiol.* **57**: 538-545 (1986).
335. Westermarck, J. *et al.*, *Biochem. J.* **308**: 995-999 (1995).
336. Wiechelman, G. *et al.*, *Anal. Biochem.* **175**: 231-237 (1988).
337. World Health Organisation, *The World Health Report* (1997).
338. Wright, T.M. *et al.*, *Biochem J.* **267**: 501-507 (1990).
339. Yamanaka, S. *et al.*, *Genomics* **54**: 191-199 (1998).
340. Yancey, P.G. *et al.*, *Biochemistry* **34**: 7955-7965 (1995).
341. Yokoyama, C. *et al.*, *Cell* **75**: 187-197 (1993).
342. Yokoyama S., *Biochim. Biophys. Acta* **1392**: 1-15 (1998).
343. Young, S.G. und Fielding, C.J., *Nature Genetics* **22**: 316-318 (1999).
344. Zuo, Z. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **273**: 12250-12258 (1998).

8. Lebenslauf

Gunnar Höbbel

Geboren am 1. Dezember 1967 in Dortmund

AUSBILDUNG

Schulbesuche: 1974 - 1978 Grundschule Aplerbecker Mark
1978 - 1987 Gymnasium an der Schweizer Allee in DO-Aplerbeck
Abitur: 25. Mai 1987
Berufsausbildung: 01.10.1987 - 30.01.1990 Berufsausbildung zum Kraftfahrzeug-
Mechaniker bei der Firma Hülpert GmbH & Co. in Dortmund.
Gesellenprüfung: 30. Januar 1990, Note „Sehr gut“.

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

Studienfach: Biologie an der Westfälischen-Wilhelms-Universität in Münster von
Oktober 1990 bis September 1995.
Diplom: 26. September 1995
Promotion: Oktober 1995 bis Dezember 1999 am Institut für Arteriosklerose-
forschung an der Universitätsklinik der Westfälischen-Wilhelms-
Universität Münster.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Entstehung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen:

Bei Anja Rademacher, meinen Eltern, Dr. Holger Reinecke (und Eva und Hendrik) und auch Fentje Lasczka, ohne die alle ich diese Arbeit nicht hätte anfertigen können.

Bei Prof. Dr. B. Bisping, der sich ohne zu zögern (und ohne zu wissen was wohl damit auf ihn zukommt...) bereit erklärt hat, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen.

Bei Dr. Michael Walter, der mich während dieser vier Jahre hervorragend betreut hat und nicht müde wurde, diese Arbeit wieder und wieder zu korrigieren...

Bei Prof. Dr. Assmann, der die Betreuung dieser Arbeit innerhalb der medizinischen Fakultät der WWU Münster übernahm und Geld und Arbeitsplätze zur Verfügung stellte.

Bei den Prfs. Dr. Francke und Dr. Bredehorst, die sich netterweise sofort bereit erklärten, die Promotionsprüfungen abzunehmen.

Bei Frau Gunrem und dem gesamten Fakultätsrat des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg, die im Laufe der Genehmigung dieser Dissertation wiederholt Weichen stellen mußten, um diese Promotion überhaupt zu ermöglichen.

Bei Frau Dipl.-Biol. Raphaela Blümer, deren Anwesenheit im Labor den tristen Arbeitsalltag erhellt hat. In diesem Zusammenhang müssen unbedingt noch Frau Dipl.-Biol. Ingrid Kemptner und die staatl. gepr. Lebensmittelchemikerin Frau Claudia Wenner erwähnt werden. Erste erwies sich als eine ausgezeichnete und ausdauernde Kuchenbäckerin (und später als eine gute Freundin – auch wenn der Kontakt in letzter Zeit unterbrochen ist...), letztere als Sonnenschein im Nebel des Alltags.

Bei Frau Dipl.-Chem. Susanne Idel, Frau Renate Kokott, Herrn Dipl.-Chem. Frank Kannenberg, Frau Dipl.-Chem. Anja Kassner, Frau Renata Feuerborn, Dr. Udo Seedorf, Dr. Markus Utech, Dr. Thomas Engel, Dr. Peter Ellinghaus, Dr. Roch Nofer, Frau Dipl.-Biol. Izabella Wolinska, Herrn Dipl.-Biol. Johannes Wiekowski und Frau Barbara Glass, mit denen ich vier Jahre zusammengearbeitet habe – ich werde zumindestens den größten Teil von Euch allen vermissen...

Auf keinen Fall vergessen darf man an dieser Stelle die Mitarbeiter der anderen Arbeitsgruppen, die mir im Laufe der letzten vier Jahre mehr oder weniger ans Herz gewachsen sind, auch wenn ich von vielen noch nicht einmal den Nachnamen kenne: Lisa, Tanja, Joke, Anja, Anja, Marianne, Andrea, Ulla, Dorothee und Bianca mit denen die Frühstückspausen erst wichtig wurden, Stefan, Paul, Karin, Wally, Hilde, Monika, Gudula, Susanne, Roland, Mario, Elke und Birgitta, sowie Alois, Claus, Isabell, Kirsten, Arnold, Xiao und Bertram.

Natürlich gibt es da dann immer noch Leute, die unbedingt erwähnt werden müssen, weil das Verhältnis zu jedem einzelnen von Ihnen einen Teil meines Selbst ausmacht (bei einigen etwas mehr, bei anderen etwas weniger...):

Frau Dipl.-Biol. Sandra Göbbels; meine Geschwister Holger und Svenja und deren Lebenspartner Sandra Grabowski und Wolfgang Steinbrink (an dieser Stelle muss ich natürlich auch Vivien erwähnen); die Familie meines Onkels Dr. Dieter Höbbel, seiner Frau Karin Höbbel und den Töchtern Tanja, Kathrin und Stefanie, sowie deren jeweilige Ehemänner Martin, Thomas und Thomas; meine Großmutter Gisela Höbbel, Katharina Kusenberg; Anja Blechschmidt (auch wenn ich seit einiger Zeit keinen Kontakt mehr zu Ihr habe...); Carolin Berger und Bernhard Max, mit denen ich dringend mal wieder was unternehmen muß; Carsten, Daniela, Jana und Kira Böckmann; Marion und Frank Bentler; meine Tante Brigitte Finkernagel und ihre Töchter Eva, Julia und Nina; die Familie meines Onkels Peter, Renate, Thorsten und Meike Höbbel; Dirk Goldner; Sandra und Lukas Kannenberg; Anja Schmidt und Marc Steden; Michael Kohlhaas (hoffentlich treffen wir uns mal wieder auf einem LARP); Jutta Musebrink; Boris Marxen; James Martin; Dirk und Dagmar Bock, Oda Hergemöller, Christian Severin und Dr. Arne Claussen; Christina Zeh, Heike Hoffmann und Karin Loser; Christian Sprenger, Olaf Haring, Rüdiger Greth;

Ich hätte gerne jeden von Euch nach vorne gestellt, aber dann stände dort nur ein schwarzer Tintenklecks, aus dem keiner schlau würde...