Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II –
Molekulare Zellbiologie

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

Rolle von LRP1 für das HDL-induzierte Recycling

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Malamatenia Panteli
aus Thessaloniki

Hamburg 2009

Angenommen von der medizinischen Fakültät am: 9.06.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof Dr. H. H. Schmale

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof Dr. T. Braulke

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung 1
2 Einleitung 2
2.1 Lipoproteine 2
2.1.1 Postprandialer Lipidstoffwechsel 3
2.1.2 Endogener Stoffwechselweg 5
2.1.3 Reverser Cholesterintransport 6
2.2 LDL-Rezeptor-Familie 7
2.2.1 LRP1 7
2.2.1.1 Die Bedeutung von LRP1 in der Signaltransduktion 9
2.2.1.2 Die Bedeutung von LRP1 in der Endozytose und im Lipoproteinstoffwechsel 10
2.3 ApoE 11
2.3.1 ApoE-Recycling 13
3 Material und Methoden 18
3.1 Geräte 18
3.2 Gebrauchswaren 19
3.3 Chemikalien, Lösungen und Medien 19
3.4 Antikörper 19
3.5 Zellkultur: 21
3.5.1 Material 21
3.5.2 Methode 21
3.6 Markierung von rekombinantem ApoE (rApoE) und Assoziation an TRL 22
3.6.1 Material 22
3.6.2 Methode 22
3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 23
3.7.1 Material 23
3.7.2 Methode 24
3.8 Western Blot 25
3.8.1 Material 25
3.8.2 Methode 26
3.9 In Gel Fluoreszenzdetektion und Quantifizierung 26
3.10 Indirekte Immunfluoreszenz 27
3.10.1 Material 27
3.10.2 Methode 28
3.11 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie 28
3.11.1 Prinzip der Fluoreszenz 28
3.11.2 Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie 29
4 Ergebnisse 32
4.1 Charakterisierung des LRP1-Kompartimentes 32
4.2 LRP1-vermitteltes intrazelluläres Prozessing 37
4.3 HDL-induziertes ApoE-Recycling 44
5 Diskussion 54
6 Zusammenfassung 60
7 Literaturverzeichnis 61
8 Abkürzungsverzeichnis 72
9 Danksagung 74
10 Lebenslauf 75
11 Eidesstattliche Erklärung 76

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Chylomikronen gehören sowie die *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL) zu den triglyceridreichen Lipoproteinen (TRL). Sie transportieren die Nahrungsfette im Blut, wo die endothelständige Lipoprotein Lipase (LPL) die Triglyzeride der Partikel hydrolysiert. Die nach der Hydrolyse mit Apolipoprotein(Apo) E angereicherten Remnants werden anschließend in die Leber aufgenommen. ApoE vermittelt die Remnants-Aufnahme durch die Bindung an hepatische Lipoprotein Rezeptoren, insbesondere das *Low Density Lipoprotein* (LDL) *Receptor Related Protein 1* (LRP1) und den LDL-Rezeptor. Nach Rezeptor vermittelter Aufnahme von Remnants in die Leber stellt sich der intrazelluläre Weg relativ komplex dar. Im Gegensatz zum klassischen, lysosomalen Abbau der LDL werden nicht alle Komponenten der endozytierten TRL-Partikel degradiert. ApoE wird nicht lysosomal abgebaut, sondern wird - induziert durch *High Density Lipoprotein* (HDL)- in das extrazelluläre Milieu re-sezerniert. Mit Hilfe von *Pulse-Chase* Experimenten und der konfokalen Lebendzellmikroskopie konnte gezeigt werden, dass ein intrazellulärer Komplex aus ApoE, Cholesterin und ApoAI gebildet wird, der im weiteren Verlauf in das Medium abgegeben wird. Die Bedeutung der Lipoproteinrezeptoren für das Recycling ist bislang unklar.

Ziel der anzufertigenden Doktorarbeit ist es, die Bedeutung und die intrazelluläre Lokalisation von LRP1 während des HDL-induzierten-Recyclings zu untersuchen.

2 Einleitung

2.1 Lipoproteine

Lipide sind zusammen mit den Kohlenhydraten und den Proteinen wichtige Bestandteile der menschlichen Nahrung und die wichtigsten Energielieferanten des Organismus. Der Lipidtransport zu den Geweben erfolgt mit dem Blut.

Während Fettsäuren durch Transportproteine wie Albumin im wässrigen Milieu des Blutes transportiert werden können, werden Lipide wie Triglyzeride, Phospholipide und Cholesterin in Form von mizellenähnlichen Partikeln aus Lipiden und Proteinen transportiert: den Lipoproteinen.

Man unterscheidet mehrere Lipoproteinklassen, die anhand ihrer Größe, Dichte und Zusammensetzung in fünf Gruppen unterteilt werden können: Chylomikronen, *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL), *Intermediate Density Lipoproteins* (IDL), *Low Density Lipoproteins* (LDL) und *High Density Lipoproteins* (HDL). Lipoproteine bestehen aus einem hydrophoben Lipidkern, der hauptsächlich Triglyzeride und Cholesterinester enthält, sowie einer amphiphatischen Oberfläche aus Phospholipiden und Cholesterin. Eingelagert in diese Oberfläche sind spezielle Proteine, die Apolipoproteine (Apo). Apolipoproteine sind wichtig für die strukturelle Integrität der Lipoproteine, sie dienen als Kofaktoren in enzymatischen Reaktionen und als Liganden für Lipoproteinrezeptoren und regulieren somit den Metabolismus der Lipoproteine. Das humane Plasma beinhaltet ungefähr zwölf verschiedene Apolipoproteine, die in fünf Hauptgruppen zusammengefasst werden (A, B, C, D und E) die wiederum in weitere Untergruppen unterteilt werden, z.B. ApoAI, ApoAII, ApoCII usw. (Havel und Kane, 2001).

Der Stoffwechsel der Lipoproteine wird in einen exogenen (postprandialen), einen endogenen und einen reversen Cholesterintransport unterteilt. Der exogene transportiert die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide, der endogene ist für den Transport der in der Leber produzierten Lipide zuständig. Beim reversen Cholesterintransport handelt es sich um den Rücktransport des Cholesterins aus der Peripherie des Organismus zurück zur Leber.

2.1.1 Postprandialer Lipidstoffwechsel

Der größte Teil der mit der Nahrung aufgenommenen Lipide sind Triglyzeride. Es werden zudem Cholesterin, Phospholipide und lipidlösliche Vitamine aufgenommen. Die Triglyzeride verbinden sich im Lumen des Dünndarms mit Gallensäuren zu kleinen Mizellen, die durch die Pankreaslipase hydrolysiert werden. Die dabei entstehenden freien Fettsäuren und Monoazylglyzeride werden über Fettsäuretransporter wie das *Fatty-Acid Transport Protein 4* (FATP4) in die Zellen aufgenommen (Stahl et al., 1999). Das Cholesterin wird getrennt von den aus den Triglyzeriden generierten Fettsäuren über einen anderen Mechanismus aufgenommen, der durch das *Niemann-Pick C1-like Protein 1* vermittelt wird (Altmann et al., 2004). In den Enterozyten werden die Fettsäuren zu Triglyzeriden re-verestert und diese dann zusammen mit Cholesterinestern, Phospholipiden und lipidlöslichen Vitaminen sowie Apolipoproteinen (ApoB48, ApoA-I, ApoA-IV) zu Triglyzerid-reichen Chylomikronen komplexiert. Diese werden dann in die Lymphe abgegeben und gelangen schließlich über den Ductus Thoracicus unter Umgehung der Leber im Blutkreislauf.

In den Kapillaren des Fett- und Muskelgewebes werden die Chylomikronen von der endothelständigen LPL hydrolysiert. LPL ist ein dimeres Glykoprotein welches zusammen mit der hepatischen Lipase und der Endothellipase zu der Gruppe der Triglyceridlipasen gehört. Die Orte ihrer Hauptsynthese sind das Herz, die Muskulatur und das Fettgewebe. Nach deren Synthese wird LPL zur luminalen Seite der Gefäße transportiert, wo sie vermittelt über Heparin-bindende Domänen mit Plasmamembran-assoziierten Heparansulfaten der Endothelzellen gebunden wird (Goldberg, 1996). Für ihre maximale Enzymaktivität benötigt sie sowohl *in vivo* als auch *in vitro* das aus der HDL auf die Chylomikronen transferierte ApoCII (LaRosa et al., 1970, Havel et al., 1973, Breckenridge et al., 1978). Die LPL-vermittelte Hydrolyse wird durch verschiedene Proteine beeinflusst, wobei u.a. gezeigt werden konnte, dass ApoAV ein wichtiger Modulator für die katalytische Funktion der LPL ist (Merkel und Heeren, 2005).

Während der Hydrolyse findet ein Austausch von Lipiden und Apolipoproteinen statt, insbesondere mit HDL. Der Lipid-Austausch der Kernkomponenten wird vom *Cholesterinester Transfer Protein* (CETP) katalysiert. Für den weiteren Stoffwechsel der Chylomikronen ist von besonderer Bedeutung, dass ApoE aus der HDL-Fraktion

auf die entstehenden kleineren Chylomikronen Remnants (CR) übertragen werden. Es wurde sowohl bei Tieren als auch bei Menschen gezeigt, dass LPL nach der Hydrolyse mit CR assoziiert und zusammen mit ApoE die schnelle Aufnahme in die Leber vermittelt (Xiang und Rensing, 1999, Heeren et al., 2002, Zheng et al., 2006). Der postprandiale Lipoproteinstoffwechsel ist schematisch in der Abbildung 1 zusammengefasst.

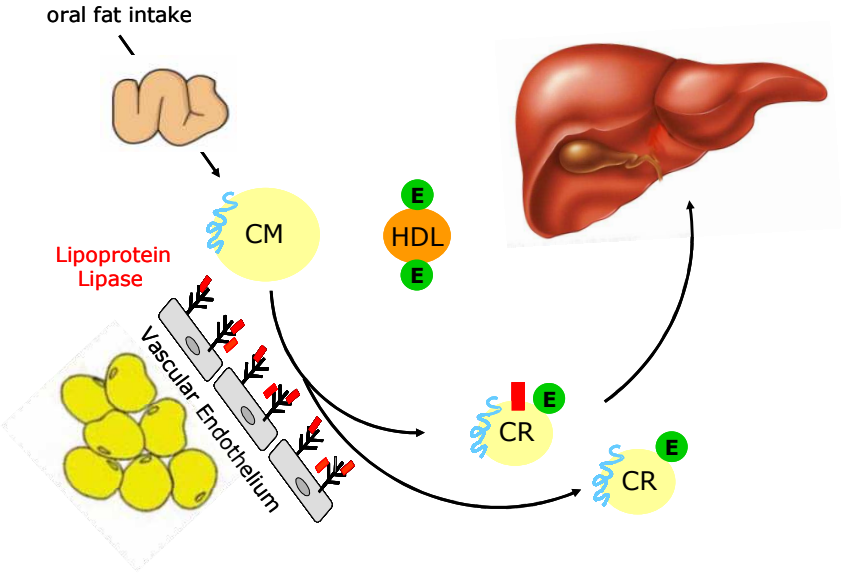

Abb. 1 Der exogene Lipoproteinstoffwechsel
Die Nahrungslipide werden im Darm mit ApoB48 (blauer Kringel) zu Chylomikronen (CM) komplexiert. Im Blut werden die Triglyzeride der Chylomikronen durch die Aktivität der Endothel-ständigen LPL (rotes Quadrat) hydrolysiert. Bei der Hydrolyse wird ApoE aus der HDL auf die entstehenden CR übertragen. Nachdem ca. 50% der Triglyzeride am Endothel des Muskel- bzw. Fettgewebes hydrolysiert wurden, löst sich LPL von den Proteoglykanen (schwarze Bäumchen) der Endothelzellen ab und assoziiert mit den entstandenen CR. Die so mit ApoE und LPL angereicherten CR werden schnell und effizient über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Leber und den Knochen (hier nicht gezeigt) aufgenommen.

Für die Erkennung der Partikel durch Leberzellen und deren Aufnahme ist ApoE zusammen mit LPL zuständig. *In vitro* Studien zeigten, dass zusammen mit LPL auch die hepatische Lipase (HL) eine Rolle bei der Aufnahme der CR durch die Leberzellen spielt (Krapp et al., 1996). Die Aufnahme der CR in Leberzellen erfolgt in zwei Schritten. Zuerst werden sie im Dissé-Raum mit *Heparan Sulfat* Proteoglykanen (HSPG) assoziiert (Mahley et al. 1999) und werden weiter von den Lipasen abgebaut (Beisiegel et al., 1991, Mulder et al., 1993, Ji et al., 1994, Shafi et al., 1994). Im zweiten Schritt binden die CR mit Hilfe von ApoE sowie LPL und HL an ihren Rezeptor und werden internalisiert (Mahley, 1996). Das erfolgt über den LDL-

Rezeptor (Ishibashi et al., 1994, Mahley und Ji, 1999), das LRP1 (Beisiegel et al., 1989, Rohlmann et al., 1998, Heeren et al., 2002, Verges et al., 2004) und zeitlich verzögert über HSPG allein (Fuki et al., 1997).

2.1.2 Endogener Stoffwechselweg

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan und versorgt den Organismus mit Lipiden. Das geschieht über in der Leber produziertes VLDL. Jedes VLDL-Partikel enthält ein Molekül ApoB100, ApoE und kleine Mengen von ApoC (Havel und Kane, 2001).

Die VLDL-Partikel werden über den Dissé-Raum der Leber direkt ins Blut sezerniert. Im Blut bekommen sie noch weitere ApoE und ApoC Moleküle von HDL. Außerdem werden -.vermittelt durch CETP - Triglyzeride im Austausch gegen freies Cholesterin auf HDL übertragen. Am Endothel werden sie ähnlich wie die Chylomikronen aus dem Darm mittels der LPL hydrolysiert. Während der Hydrolyse werden Phospholipide, vermittelt durch *Phospholipid Transfer Protein* (PLTP), und ApoC-Moleküle zu HDL transportiert. Nach der Hydrolyse verbleiben kleine Lipoproteinpartikel, die reich an Cholesterinester und ApoE sind: die VLDL-Remnants. Sie werden entweder ähnlich wie CR von der Leber aufgenommen oder weiter durch HL hydrolysiert. So entstehen IDL, die bedingt durch ihren hohen ApoE-Anteil über den LDL-Rezeptor wieder in die Leberzellen aufgenommen werden. Alternativ können IDL nach weiterer Hydrolyse und Lipidtransfer zu LDL werden. Dabei kommt es zu einem Verlust des ApoE-Anteils und zu einer CETP-vermittelten Cholesterinanreicherung aus HDL.

Die cholesterinreichen LDL-Partikel entstehen nicht nur durch Delipidierung von VLDL- Partikeln, sondern können auch direkt von der Leber sezerniert werden (Gaw et al., 1995). Sie enthalten als einziges Apolipoprotein ein Molekül ApoB100. Der größte Teil von LDL wird von der Leber katabolisiert. Ein Teil allerdings gelangt in die peripheren Gewebe. Dort wird das Cholesterin von Zellen aufgenommen und für den Aufbau von Zellmembranen, die Synthese von Steroidhormonen, Vitamin D und weitere Stoffwechselprozesse verwendet (Havel und Kane, 2001).

Die Aufnahme der LDL Partikel sowohl in hepatisches als auch in extrahepatisches Gewebe erfolgt über den LDL-Rezeptor durch die Bindung von ApoB100 (Brown und Goldstein, 1986).

2.1.3 Reverser Cholesterintransport

Obwohl das Cholesterin essentiell für die Zellen ist, wirkt es im Überfluss toxisch. Die peripheren Zellen können die Cholesterinstruktur nicht abbauen und somit sind sie auf einen Transportweg angewiesen, der das Cholesterin von der Peripherie zur Leber transportiert. Als Transportmolekül dient HDL. In der Leber angekommen, wird Cholesterin entweder direkt mit der Gallenflüssigkeit oder nach Umwandlung in Gallensäuren in den Darm ausgeschieden (Russell, 2009).

HDL besteht bis zu 70 Prozent aus ApoAI. Das native HDL wird hauptsächlich von der Leber und dem Darm in Form eines lipid- und cholesterinarmen Lipoproteins sezerniert. Diese Partikel werden noch mit Cholesterin und Phospholipiden angereichert. Dies geschieht sowohl über den Transport von Oberflächenkomponenten von Chylomikronen und VLDL während der LPL-regulierten Hydrolyse im Plasma als auch mittels verschiedener Transportproteine direkt über die peripheren Zellen. Als solche sind bis heute der *ATP Binding Cassette Transporter A1* (ABCA1), der *ATP Binding Cassette Transporter G1* (ABCG1) (Gelissen et al., 2006) und der *Scavenger Receptor Class B1* (SR-B1) bekannt. Der ABCA1 gehört in die gleiche Superfamilie der ABC-Transporter wie der ABCG1 und ist ein wichtiges zelluläres Protein, welches den Cholesterin- und Phospholipid-Transport von Zellen zu lipidarmen Lipoproteinen über eine Bindung mit ApoAI ermöglicht. Der ABCG1-Transporter wird reichlich in makrophagenreichen Geweben wie Nebennieren, Lunge und Milz exprimiert (Klucken et al., 2000). SR-B1 ist ein Glykoprotein, welches in Leber, ZNS, Darm, Makrophagen, Endothelzellen und Astrozyten zu finden ist (Acton et al., 1996, Rigotti et al., 1997, Krieger, 1999, Husemann und Silverstein, 2001, Srivastava, 2003). Außer bei der Bindung von freiem Cholesterin an HDL, spielt SR-B1 auch eine Rolle bei der Aufnahme von HDL in die Leber. Nach der Veresterung der Cholesterinmoleküle entstehen, vermittelt durch *Lezithin Cholesterin Acyl Transferase* (LCAT), sphärische HDL-Moleküle, sogenannte α-HDL. Sie tauschen dann CETP-vermittelt Triglyzeride gegen Cholesterinester mit VLDL, Chylomikronen, LDL, IDL und mittels PLTP bekommen sie Phospholipide von VLDL-Partikeln.

Die reifen HDL-Partikel werden entweder in der Leber von Cholesterinestern und anderen Lipiden in einem selektiven Entleerungs-Prozess vermittelt durch den SR-

B1 befreit (Trigatti et al., 2003, Trigatti et al., 2004, Brundert et al., 2005) oder sie werden mittels Rezeptoren als ganze Partikel in Leber und Niere internalisiert und abgebaut (Steinberg, 1996, Fidge, 1999).

2.2 LDL-Rezeptor-Familie

Die LDL-Rezeptor-Familie, deren Mitglieder im Lipoproteinstoffwechsel unabdingbar sind, besteht aus sieben strukturell verwandten membranständigen Rezeptoren, die diverse biologische Prozesse wie die Aktivität von Proteasen oder den Lipid- und Vitaminstoffwechsel regulieren. Manche davon spielen eine entscheidende Rolle in zellulären Signaltransduktionswegen und in der Entwicklung des Nervensystems (Beffert et al., 2004). Zu dieser Familie gehören der LDL-Rezeptor (Brown und Goldstein, 1986), LRP1 (Herz et al., 1988), der VLDL-Rezeptor (Takahashi et al., 1992), der Apolipoprotein E-Rezeptor 2 (Kim et al., 1996), Megalin (Raychowdhury et al., 1989), MEGF7 und der dem LRP1 besonders nah verwandte Rezeptor LRP1b (May, 2006).
Der zuerst entdeckte LDL-Rezeptor hat eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Cholesterinstoffwechsels. Genetische Defekte in diesem Rezeptor führen zu einer massiven Akkumulation von LDL-Partikeln in der Blutzirkulation (Goldstein und Brown, 2001) und in der Folge zu einer Hypercholesterinämie und frühzeitiger Atherosklerose.

2.2.1 LRP1

LRP1 wurde von Herz und Mitarbeitern im Jahr 1988 aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum LDL-Rezeptor als das zweite Mitglied der LDL-Rezeptor-Familie identifiziert. So wie alle Mitglieder dieser Familie besteht auch der LRP1 Rezeptor aus fünf strukturellen Einheiten. LRP1 wird als Vorläuferprotein von 600 kDa translatiert und erst nach einer proteolytischen Spaltung im Trans-Golgi-Apparat durch die Protease Furin zum reifen Rezeptor, der an der Zelloberfläche lokalisiert ist (Herz et al., 1990, Willnow et al., 1996). Der reife Rezeptor besteht aus einer C-terminalen 85kDa- und einer rein extrazellulären N-terminalen 515kDa-Untereinheit,

die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die Ligandenbindungsdomänen (siehe Abb. 2) lassen sich in die Bindungscluster I bis IV unterteilen.

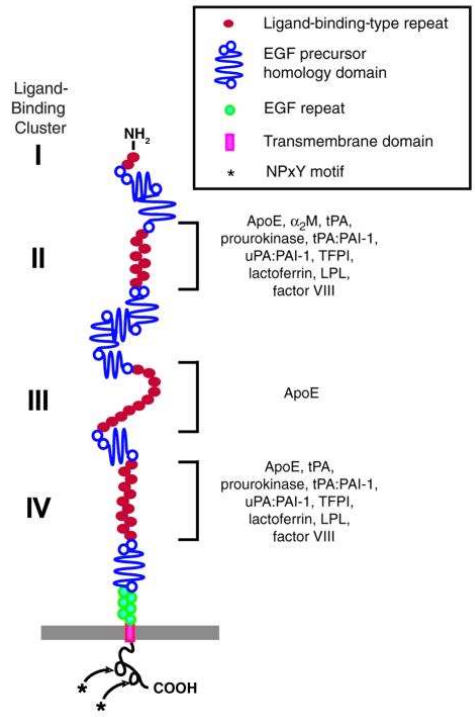

Abb. 2 Struktur des LRP1

Die Ligandenbindungsdomänen von LRP1 sind in vier Bindungsclustern angeordnet. Jedem Cluster folgt eine oder mehrere *Epidermal Growth Factor* (EGF) Homologiedomänen (blau). Der Transmembrandomäne gehen sechs EGF-*Repeats* voraus. Der zytoplasmatische Teil besteht aus zwei NPxY-Motiven. ApoE bindet in den Clustern II, III und IV bei Blotting des Liganden.
Adaptiert nach J Clin Invest. 2001 September 15;108(6):779-784

Für Cluster I ist bisher keine Liganden-Interaktion beschrieben. Cluster II und IV, die sehr ähnlich sind, binden die Mehrzahl der momentan beschriebenen LRP1-Liganden. ApoE bindet auch an Cluster III.
Anfangs wurde seine Funktion in der Endozytose von extrazellulären Liganden und als Rezeptor für ApoE-reiche Lipoproteine (Beisiegel et al., 1989) und Formen der α_2-Makroglobuline (Strickland et al., 1990) gesehen. Er wird ubiquitär exprimiert aber reichlich in Hepatozyten, Makrophagen und glatten Muskelzellen (Moestrup et al., 1992). Mittlerweile sind mehr als 30 extrazelluläre Liganden wie Lipoproteine, Proteasen, Viren und Wachstumsfaktoren identifiziert (Krieger und Herz, 1994, Herz und Strickland, 2001, Lillis et al., 2005).

Eine Studie von Gotthardt et al im Jahr 2000 zeigte, dass intrazelluläre Domänen des Rezeptors mit Adapter-Molekülen interagieren, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind. So wurde dem Rezeptor außer der Aufnahme extrazellulärer Proteine, die zum großen Teil in den Lysosomen abgebaut werden, auch eine Rolle in der Modulation von Signaltransduktionvorgängen zugewiesen (Gotthardt et al., 2000, Herz und Strickland, 2001). Dies könnte auch die frühe embryonale Letalität erklären, die bei konventionellen LRP1-knockout Mäusen auftritt (Herz et al., 1992). Diese wäre mit einem Defekt der Liganden-Endozytose allein nur schwer zu erklären.

Gleichwohl ist die Rolle von LRP1 in der Embryogenese bis heute nicht vollständig geklärt.

2.2.1.1 Die Bedeutung von LRP1 in der Signaltransduktion

Die Rolle von LRP1 bei Signaltransduktionswegen wurde in verschiedenen Geweben untersucht, wobei die wichtigsten Ergebnisse bei Blutgefäßen und Neuronen erzielt wurden (May et al., 2005).

Im Falle des Endothels ist die Rolle von LRP1 in dem *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF)-*Signalling* besonders eindrücklich (Herz und Hui, 2004). PDGF ist ein Wachstumsfaktor, der die Zellproliferation und Migration glatter Muskelzellen in der arteriellen Gefäßwand sowohl während ihrer Entwicklung (Hellstrom et al., 1999) als auch unter pathologischen Bedingungen wie der Atherosklerose (Abedi und Zachary, 1995) stimuliert. LRP1-Defizienz in glatten Muskelzellen führt im Tiermodell zu einer extremen Hyperplasie der Tunica Media und zu einer ausgeprägten Atheroskleroseneigung, die jedoch durch Gabe eines PDGF-Inhibitors verhindert werden könnte (Boucher et al., 2003, Boucher und Gotthardt, 2004). *In vitro*-Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen bestätigten die Interaktion von LRP1 mit dem PDGF Signalweg (Boucher et al., 2002, Loukinova et al., 2002, Newton et al., 2005, Takayama et al., 2005).

Neuere Experimente zeigen auch eine Beteiligung von LRP1 in der Regulation inflammatorischer Prozesse, welche die Aktivierung von Endothelzellen (Yu et al., 2005) und die Synthese von pro-inflammatorischen Molekülen beeinflussen (Zurhove et al., 2008). Außer im Gefäßendothel spielt LRP1 auch eine wichtige Rolle im Zentralnervensystem, wo es mit verschiedenen neuronalen Proteinen interagiert (Kinoshita et al., 2001, Pietrzik et al., 2002, May et al., 2004, Pietrzik et al., 2004) und für eine normale Neuronenaktivität wichtig ist (Herz und Beffert, 2000). Außerdem zeigten neuere Studien, dass LRP1 über N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren den Calcium-Einstrom in Neuronen moduliert und dadurch die Wirkung von Neurotransmittern wie Glutamat beeinflusst (Bacskai et al., 2000, Qiu et al., 2002).

Eine weitere Funktion des Rezeptors im Zentralnervensystem ist die Regulation des Stoffwechsels des β-Amyloid-Vorläufer-Protein (*Amyloid Precursor Protein*, APP), ein Molekül welches in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung involviert ist. Vermutlich ist eine übermäßige Ablagerung des β-Amyloid-Peptids, ein

proteolytisches Fragment des in der Plasmamembran vorkommenden APP, für einen Teil der Alzheimer-Pathologie verantwortlich (Gandy, 2005). Als Konsequenz einer vermehrten Internalisierung des APP durch LRP1, kommt es zu einer verstärkten Sekretion von Amyloid-β (Waldron et al., 2006). Darüber hinaus dient LRP1 wie oben beschrieben als Rezeptor für ApoE und α_2-Makroglobulin, beides Proteine, die an der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung beteiligt sind (Roses, 1996, Waldron et al., 2006).

2.2.1.2 Die Bedeutung von LRP1 in der Endozytose und im Lipoproteinstoffwechsel

Als Endozytose-Rezeptor reguliert LRP1 die Aufnahme von mehreren Liganden, unter anderem Lipoproteinen, Plasmaproteasen und Protease-Inhibitor-Komplexen. Die Aufnahme des Rezeptors nach der Bindung mit dem Liganden verläuft analog zum LDL-Rezeptor (Lund et al., 1989). Die Komplexe aus LRP1 und Ligand sammeln sich an sogenannten „*Coated-Pits*“ Regionen der Zellmembran, wo sie internalisiert werden (Kirchhausen, 2000). Die *Coated-Pits* weisen an ihrer zytoplasmatischen Oberfläche ein korbartiges Clathringerüst auf, das über Adaptine am Rezeptor befestigt ist. Adaptinkomplexe an der Plasmamembran vermitteln über Clathrin-bindende Domänen (Ahle et al., 1988, Robinson, 1994) Membranbindung und selektiven Vesikeltransport (Pearse, 1988, Keen und Beck, 1989). Die Plasmamembran stülpt sich ein und eine mit Clathrin umhüllte Kugel bildet sich. Die nun als „*Clathrin-Coated-Vesicles*“ (*Coated-Vesicles*) bezeichneten Zellorganellen verlieren unter Katalyse des „*Uncoating*-Enzyme“ ihren Clathrin-Mantel (Rothman und Schmid, 1986) und werden so zu Frühen Endosomen. Durch eine ATP-abhängige Absenkung des pH-Wertes in den Vesikeln kommt es zur Dissoziation von Rezeptor und Ligand (Nelson, 1992) und der Rezeptor kehrt zurück zur Plasmamembran. Die Rezeptoren stehen so erneut zur Bindung weiterer Liganden zur Verfügung. Die Vesikel mit den Liganden entwickeln sich zu Späten Endosomen und nach einer Fusionierung mit Prälysosomen zu Lysosomen, in denen der Vesikelinhalt degradiert wird.

Als Endozytose-Rezeptor für Serinproteasen und Proteaseinhibitoren reguliert LRP1 die proteolytische Aktivität im Blutkreislauf. Der *Urokinase-Type Plasminogen-Factor* (uPA) und der *Tissue-Type Plasminogen-Factor* (tPA) sind Serinproteasen, die entweder direkt oder indirekt über deren Inhibitor, Plasminogen Activator Inhibitor

Type I, mit LRP1 assoziieren. uPA und tPA aktivieren Plasminogen und spielen somit eine wichtige Rolle in Wundheilung, Tumorinvasion und der Zellmigration in normalen und pathologischen Zuständen. Über die Aufnahme von Matrixmetalloproteinasen, die an Tumorprogression und Metastasierung beteiligt sind, liegt eine Rolle von LRP1 bei der Kontrolle des invasiven Wachstums nahe (Kancha et al., 1994, Eccles et al., 1996).
Außerdem spielt LRP1 eine Rolle bei der Aufnahme von Rhinoviren oder Toxinen wie denen von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen (Kounnas et al., 1992, Hofer et al., 1994).
Die herausragende Rolle als Endozytose-Rezeptor spielt LRP1 allerdings im Lipoproteinstoffwechsel, was Thema dieser Arbeit sein soll.
Wie in 2.1 schon beschrieben, ist LRP1 für die hepatische Aufnahme von TRL zuständig. Es wurde gezeigt, dass eine *in vivo*-Inaktivierung von LRP1 bei LDL-defizienten Mäusen zu einer Ansammlung von CR und VLDL im Blutkreislauf führt (Willnow et al., 1994, Rohlmann et al., 1998). Allerdings hat alleinige LRP1-Defizienz keine Wirkung auf die Lipoproteinkonzentration im Plasma (Ishibashi et al., 1993). Dies bedeutet, dass die Rolle von LRP1 in vivo vom LDL-Rezeptor maskiert ist, der anscheinend den Verlust von LRP1 kompensieren kann. Dies passiert allerdings in Form einer Überexpression vom LDL-Rezeptor, was wiederum die Wichtigkeit von LRP1 betont, der somit kein *Back-Up*-Rezeptor ist (Rohlmann et al., 1998). Im Zusammenhang mit der Entstehung von Hyperlipoproteinämien bei Diabetes mellitus Typ2 ist von besonderem Interesse, dass kürzlich gezeigt werden konnte, dass Insulin in der postprandialen Phase LRP1 stimuliert und dadurch die effiziente Aufnahme von CR vermittelt (Laatsch et al., 2009). Die anti-atherogene Wirkung von LRP1 wird jedoch nicht nur über die Entfernung der Lipoproteine aus dem Blutkreislauf bestimmt, sondern auch über die Kontrolle der Aktivität von PDGF ausübt (Boucher et al., 2003).

2.3 ApoE

ApoE mit einem Molekulargewicht von ca. 34 kDa gehört zu den austauschbaren Apolipoproteinen. Es wird ubiquitär, jedoch hauptsächlich in Leber, Hirn, Milz, Lunge, Niere und Muskel synthetisiert (Elshourbagy et al., 1985). In seiner lipidfreien Form besteht es aus zwei voneinander unabhängigen Strukturdomänen: der N-terminalen

Domäne, bestehend aus vier α-Helices, die von Rezeptoren erkannt wird und der C-terminalen Domäne, deren Struktur noch nicht vollständig aufgeklärt und für die Assoziierung von ApoE mit Lipoproteinen verantwortlich ist (Wetterau et al., 1988, Morrow et al., 2000, Hatters et al., 2006).

Es gibt im Menschen drei ApoE-Isoformen, ApoE2, ApoE3 und ApoE4. Sie unterscheiden sich in den Positionen 112 und 158. ApoE3, die häufigste Form, hat Cystein und Arginin an diesen Positionen, ApoE2 hat zweimal Cystein und ApoE4 zweimal Arginin. Diese Strukturunterschiede haben wichtige biologische Konsequenzen. So werden sie unterschiedlich von Rezeptoren erkannt. Während ApoE3 und -4 an den LDL-Rezeptor mit gleicher Affinität binden, ist die Interaktion mit ApoE2 50- bis 100mal schwächer. Bei ApoE2 ist die Bindung mit HSPG ebenfalls deutlich schwächer (Schneider et al., 1981, Weisgraber et al., 1982). Das führt zu einer Akkumulation von Remnantpartikeln im Plasma, was die Assoziierung von ApoE2 mit der Typ III Hyperlipoproteinämie erklären kann (Mahley et al., 1995). Im Gegensatz zur Bindung an den LDL-Rezeptor unterscheiden sich die einzelnen ApoE-Isoformen nicht in ihrer Affinität hinsichtlich LRP1. Auch die Bindung an Lipoproteine ist unterschiedlich. Während ApoE2 und 3 präferenziell an kleine, dichte HDL-Partikel binden, assoziiert ApoE4 eher mit größeren LDL- und VLDL-Partikeln (Hatters et al., 2006). ApoE4 wiederum ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung der senilen Demenz vom Typ Alzheimer (Corder et al., 1993) und für kardiovaskuläre Erkrankungen (Luc et al., 1994). ApoE3 ist dagegen mit einem mittleren, ApoE2 mit einem niedrigen Krankheitsrisiko korreliert (Farrer et al., 1997). Die ApoE-Isoformen spielen allerdings auch eine verschieden starke neuroprotektive Rolle und sind wichtig in Reparationsprozessen und der Entwicklung von Neuronen (Nathan et al., 1994).

Alle Isoformen spielen allerdings eine sehr wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel des Plasmas. Erste Indikationen für die Rolle von ApoE in der Aufnahme der Lipoproteinreste kamen aus der Studie von Mahley, in der gezeigt wurde, dass die Infusion von ApoE in Kaninchen die hepatische Aufnahme der VLDL-Remnants aus dem Blut beschleunigte (Mahley et al., 1989). In späteren Studien zeigte sich bei ApoE-defizienten Mäusen eine defekte Lipoproteinaufnahme der Leber (Plump et al., 1992, Zhang et al., 1992). Studien mit Typ III Hyperlipoproteinämie-Patienten belegen auch die Notwendigkeit von ApoE für die Aufnahme von IDL bzw. CR (Mahley et al., 1995, Mahley, 1996). Ob die Herkunft des ApoE für die Aufnahme der

TRL wichtig ist, hat die Gruppe Linton untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass, obwohl die Aufnahme der Partikeln über den LDL-Rezeptor unabhängig von der Herkunft von ApoE erfolgt, eine hepatische ApoE-Expression für die Endozytose der Partikeln über LRP1 notwendig ist (Linton et al., 1995, Linton et al., 1998).
Abgesehen von seiner Rolle in der Aufnahme der Lipoproteinresten, ist ApoE auch in intrazellulären Lipidprozessen involviert. ApoE kann direkt die hepatische Produktion und Sekretion von VLDL stimulieren (Kuipers et al., 1997, Huang et al., 1998, van Dijk et al., 1999) und beeinflusst den Transport und Stoffwechsel von Fettsäuren und freiem Cholesterin (Schwiegelshohn et al., 1995). Es ist auch bekannt, dass ApoE den Cholesterol-Efflux in Makrophagen stimuliert (Huang et al., 1994, Cullen et al., 1998, Lin et al., 1999). Der Prozess des Cholesterin-Efflux ist in diesen Zellen ganz besonders wichtig, da sie selber die Aufnahme von Lipiden nicht limitieren können, was unter bestimmten Bedingungen zur Bildung von Schaumzellen und Atherosklerose führen kann. Aus den oben genannten Mechanismen sowie der Rolle von ApoE bei der Aufnahme von Lipoproteinen über den LDL-Rezeptor und LRP1 kann man die atheroprotektive Rolle von ApoE erklären.

2.3.1 ApoE-Recycling

Nach der rezeptorvermittelten Aufnahme von LDL über den LDL-Rezeptor werden LDL-assoziierte Proteine und Lipide komplett in Lysosomen abgebaut (Brown und Goldstein, 1986). Im Gegensatz dazu findet nach der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von TRL ein anderer intrazellulärer Prozess statt. Bei TRL werden die Mehrheit der Kernlipide und ApoB zu lysosomalen Kompartimenten geführt, wobei ApoE in einem Recycling-Prozess für die Synthese ApoE-haltiger HDL wiederbenutzt wird (Heeren et al., 1999, Heeren et al., 2003, Heeren et al., 2006). Dieses Recycling ist nicht zellspezifisch, findet aber in Hepatozyten (Fazio et al., 1999, Swift et al., 2001, Farkas et al., 2003), Hepatomazellen (Heeren et al., 1999, Rensen et al., 2000, Heeren und Beisiegel, 2001, Heeren et al., 2003), Fibroblasten (Heeren et al., 1999, Heeren et al., 2003) und Makrophagen (Lucas und Mazzone, 1996, Zhao und Mazzone, 2000) statt. Die physiologische Relevanz des ApoE-Recyclings ist jedoch noch ungeklärt.
Ein ApoE-Recycling wurde schon Ende der achtziger Jahre vermutet. Nach Injektionen von radiomarkierten Lipoproteinen in Ratten konnten mehr als 60% des intrahepatischen ApoE im Vergleich zu lediglich 10% des intrahepatischen ApoB im

Plasma nachgewiesen werden (Wong, 1989). Dies deutete auf einem inkompletten Abbau von ApoE hin. Bei β-VLDL-Aufnahme-Experimenten mit Mäuse-Makrophagen wurden Lipide von β-VLDL in Lysosomen detektiert (Heeren et al., 1999), während ApoE in peripheren Endosomen zu finden war (Tabas et al., 1990, Tabas et al., 1991, Myers et al., 1993). Weitere Experimente mit ^{125}I-markierten Lipoproteinen zeigten eine Sekretion von markiertem ApoE, was ebenso auf einen inkompletten Abbau des ApoE hinwies (Beisiegel, 1995, Chen et al., 1995). In verschiedenen Arbeitsgruppen wurde der intrazelluläre Weg aufgenommener TRL experimentell nachvollzogen. Nach Injektion von TRL in Ratten, wurden hepatische Endosomen isoliert. ApoE fand sich überwiegend in Recycling Endosomen und zu 40% in frühen endosomalen Strukturen. Das deutete daraufhin, dass ApoE über Recycling Endosomen sezerniert werden könnte (Heeren et al., 2001). Obwohl also nach Aufnahme von TRL, ApoB und Kernlipide fast komplett in Lysosomen abgebaut werden, befinden sich ApoE, ApoC und LPL in Recycling Endosomen für eine erneute Sekretion (Heeren et al., 1999, Heeren et al., 2001, Heeren et al., 2003).

Dieser intrazelluläre Weg der TRL wurde auch *in vivo* untersucht. Nach Injektion von ^{125}I- markierten VLDL in Mäuse, wurde ApoE in Golgi-Vesikeln entdeckt, was auf einen Sekretionsweg hindeutet (Fazio et al., 1999). Weitere Experimente zeigten ebenfalls einen verspäteten und verminderten Abbau von ApoE im Vergleich zu ApoB in Hepatozyten (Rensen et al., 2000). Für das ApoE-Recycling ist eine endogene ApoE-Produktion nicht notwendig, es findet aber auch bei intakter endogener Produktion statt (Farkas et al., 2003). In Zellexperimenten von ApoE-defizienten Mäusen wurde nach einer Knochenmarktransplantation von Wildtyp-Mäusen ApoE im Zellmedium nachgewiesen (Swift et al., 2001). In anderen Studien wurde ApoE in Golgi-Vesikeln von ApoE-defizienten Mäusen nach Injektion von VLDL gefunden (Fazio et al., 1999). ApoE- Recycling findet also auch im Falle einer extrahepatischen ApoE-Produktion in der Leber statt. Gleiches gilt auch für Makrophagen (Farkas et al., 2003) und Ovarialzellen (Braun et al., 2006).

Das ApoE-Recycling hat nicht die gleiche Dauer in allen Zellen. Es wurden Unterschiede bei Makrophagen gefunden, wobei das Recycling deutlich länger anhielt als bei Hepatozyten. ApoE verbleibt sehr lange in Makrophagen, was auf kontinuierliche Recycling-Zyklen hindeutet. Da selbst geringe ApoE-Mengen durch eine Stimulation des Cholesterineffuxes atheroprotektiv wirken (Hasty et al., 1999),

könnten Makrophagen in der Arterienwand arteriosklerotischer Plaques vom ApoE-Recycling profitieren.

Es wurde gezeigt, dass das ApoE-Recycling mit dem HDL-Metabolismus in Verbindung steht (Heeren et al., 1999, Heeren et al., 2001, Heeren et al., 2003, Hasty et al., 2005). HDL oder ApoAI stimulieren das ApoE-Recycling in Fibroblasten, Hepatomazellen und Makrophagen und führen sogar zu einer Steigerung des Recyclings um bis zu 45% (Heeren et al., 2003, Hasty et al., 2005). HDL wirkt auch als extrazellulärer Akzeptor für resezerniertes ApoE *in vivo* und *in vitro* in Hepatozyten (Heeren et al., 1999, Rensen et al., 2000, Heeren et al., 2001, Heeren et al., 2003). Es ist bekannt, dass HDL den Cholesterinefflux vermitteln kann (Fielding und Fielding, 2001b, von Eckardstein et al., 2001, Oram, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass ein gleichzeitiges ApoE-Recycling und Cholesterinefflux nach einer HDL-Inkubation in Leberzellen, nicht aber in neuronalen Zellen stattfindet (Heeren et al., 2003, Rellin et al., 2008). Zudem kolokalisierte ApoE mit Cholesterin in *Early Endosome Antigen 1* (EEA1) positiven Endosomen, was eine Verbindung zwischen ApoE-Recycling und dem Cholesterintransport von endosomalen Kompartimenten bestätigte. Allerdings können HDL und ApoE auch unabhängig voneinander zu Cholesterinefflux führen (Fielding und Fielding, 2001a, von Eckardstein et al., 2001, Oram, 2002, Heeren et al., 2003).

Anfänglich wurde vermutet, dass HDL das ApoE nach dessen Recycling erst an der Zelloberfläche abfängt. Bei den eingangs bereits beschriebenen radioaktiven Pulse-Chase Experimenten kolokalisierte ApoAI, welches von HDL stammte, mit ApoE und Cholesterin in EEA1 positiven Endosomen (Heeren und Beisiegel, 2001). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf eine Internalisierung von ApoAI in bereits vorexistierende ApoE-Cholesterin-Komplexe, um so das ApoE-Recycling und den Cholesterinefflux zu vermitteln. Ein Modell des ApoE-Recyclings basierend auf dem postpradialen Stoffwechsel ist in der Abbildung 3 gezeigt.

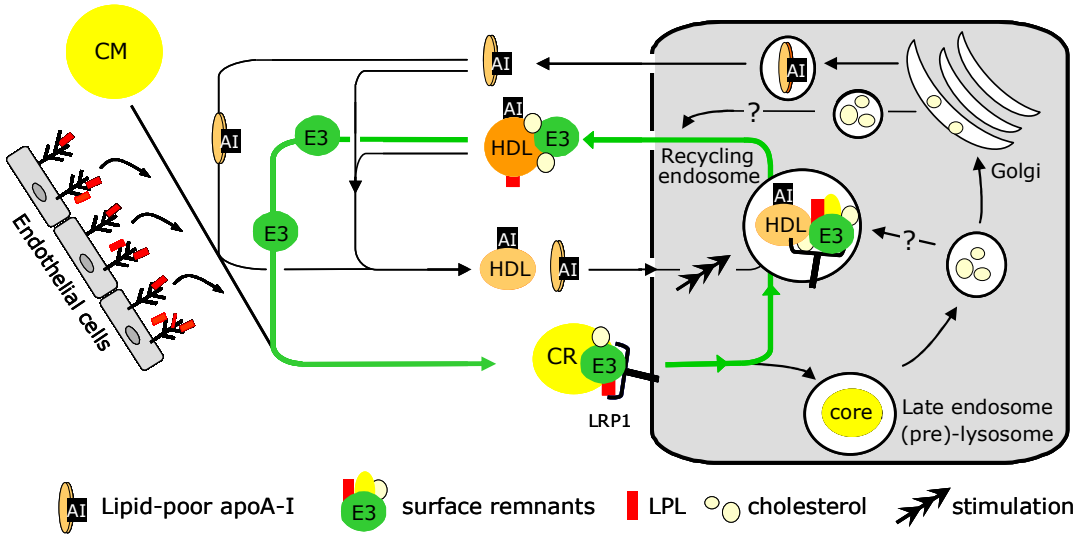

Abb. 3 Das ApoE-Recycling verbindet den Stoffwechsel von Chylomikronen und HDL
LPL vermittelt die Hydrolyse der Chylomikronen (CM) an der luminalen Seite der Endothelzellen von Muskel- und Fettgewebe mit Bildung von CR. LPL bleibt zu den CR assoziiert und die CR erhalten ApoE von HDL Partikeln. Sie werden dann über die Bindung von LPL und ApoE an LRP1 in die Leber aufgenommen. Obwohl die Kernlipide mit ApoB48 in den Späten Endosomen abgebaut werden, kommen ApoE, LPL und manche Lipide der Oberfläche in Frühen Endosomen vor und induzieren den Cholesterinefflux aus intrazellulären Kompartimenten. Dazu bilden sich ApoE-Cholesterin-Komplexe in EEA1 positiven Endosomen. HDL oder ApoAI kann aufgenommen werden und wird zu diesen Komplexen geführt, wo es dann zur Bildung von ApoE-haltigen HDL-Partikeln und letztlich zum Recycling und Cholesterinefflux kommt. Dieses Model erläutert den postprandialen ApoE-Zyklus am Beispiel von ApoE3. Adaptiert nach Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Mar;26(3):442-8.

Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen ApoE-Isoformen. Diese spiegeln sich nicht zuletzt im ApoE-Recycling wider. Obwohl mehr ApoE4 an der Oberfläche der Zellen gebunden und schneller internalisiert wird als ApoE3, sind sie beide in den gleichen endosomalen Strukturen zu finden (Heeren et al., 2004). Allerdings akkumuliert ApoE4 in den Zellen und wird nicht durch HDL zum Recycling stimuliert wie dies bei ApoE3 der Fall ist. Gleichzeitig ist der Cholesterinefflux vermindert. Dies könnte auch die pathologischen Eigenschaften von ApoE4 für den Lipoproteinstoffwechsel erklären. Durch die Ansammlung vom Cholesterin, wird die LDL-Rezeptor-Expression in der Leber herunterreguliert und die LDL-Konzentration im Plasma steigt, was mit einem erhöhten Arteriosklerose risiko einhergeht (Heeren et al., 2004, Heeren et al., 2006). In Neuronen nehmen ApoE3 und ApoE4 ebenfalls unterschiedliche intrazelluläre Wege (Huang et al., 2001). Es konnte kürzlich gezeigt, dass das Recycling von ApoE4 im Vergleich zum ApoE3 auch in neuronalen Zellen vermindert ist, wobei in diesem Zellsystem keine Unterschiede beim Cholesterinefflux detektiert wurden (Rellin et al., 2008). Welche Rezeptoren aber beim ApoE-Recycling beteiligt sind, wurde noch nicht vollständig

geklärt, und die Meinungen sind verschieden (Heeren et al., 2006). Studien mit LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen, in denen ebenso ApoE im Golgi-Vesikel zu finden war, zeigten, dass das ApoE-Recycling nicht allein vom LDL-Rezeptor abhängig ist (Fazio et al., 1999). Heeren et al (2001) zeigten, dass Aufnahme, Abbau und erneute Sekretion von ApoE bei LDL-Rezeptor-defizienten humanen Fibroblasten von Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie mit dem normaler Fibroblasten vergleichbar ist. Das bedeutet, dass der LDL-Rezeptor nicht notwendig für das Recycling ist und dass LRP1 eine wichtige Rolle in der Abwesenheit vom LDL-Rezeptor spielen könnte. Allerdings konkurrieren diese Ergebnisse mit denen von Rensen et al. (2000), die eine Abhängigkeit des metabolischen Verhaltens von ApoE vom LDL-Rezeptor nahelegten. Ob LRP1 für das ApoE-Recycling notwendig ist, wurde in murinen Hepatozyten untersucht, die kein *Receptor Associated Protein* (RAP) herstellen. RAP ist ein intrazelluläres Protein, das für eine normale LRP1 Bildung notwendig ist (Herz et al., 1991, Moestrup und Gliemann, 1991, Williams et al., 1992). Die ApoE-Aufnahme und erneute Sekretion war in diesen Hepatozyten mit reduzierter LRP1-Expression vergleichbar mit Hepatozyten, die aus Wildtyp und LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen isoliert wurden. Aus diesem Grund wurde die essentielle Rolle von LRP1 in Frage gestellt (Farkas et al., 2004).

Die exakte Rolle der unterschiedlichen Lipoprotein-Rezeptoren für das ApoE-Recycling bleibt allerdings bis heute weitgehend ungeklärt.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte die für die Experimente verwendet wurden

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Zellkultur VDE 0530	ABM
Brutschrank	Binder
Brutschrank	Heraeus
Casy® 1 TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Entwicklermaschine X-OMAT 1000 Processor	Kodak
Konfokales Laser Scanning Mikroskop „LSM 510 META“	Zeiss
Laborzentrifüge „1-15K“	Sigma
Lichtmikroskop CKX31	Olympus
Mikroskop Axiovert 100 mit Fluorezenzeinrichtung	Zeiss
Rollgerät RMS V-80	CAT
Schüttler „Vibrax-VXR“	IKA Labortechnik
Thermomixer „Compact“	Eppendorf
Tischabsaugpumpe „ECOM-P 4153“	Eppendorf
Ultrazentrifüge „Optima™ L-90K“ mit „Swing out Rotor SW 41“ und passenden Zentrifugationsröhrchen	Coulter Beckmann
Vortexer „Reax 2000“	Heidolph
Wärmebad	GLF 1083
Zellkultur Werkbank „Hera Safe“	Heraeus
Typhoon 9410 „Variable Mode Imager“	Amersham Biosciences

3.2 Gebrauchswaren

Alle Waren, die für diese Arbeit benutzt wurden, sind von der Firmen Eppendorf, Nunc, Falcon und Greiner bezogen.

3.3 Chemikalien, Lösungen und Medien

Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) oder der Firma Merck (Darmstadt), der Firma Sigma oder der Firma Fluka (Deisenhofen) bezogen.

3.4 Antikörper

Tabelle 2 Erste Antikörper die für die Immunfluoreszenz verwendet wurden

Antikörper gegen	Herkunftspezies	Verdünnung	Hersteller
LRP1 dolly	Sheep	1:50	Heeren et al., 2001
LRP1Monomix	Mouse	1:100	Progen Biotechnik GmbH
$LRP1_{377}$	Rabbit	1:100	Joachim Herz
Rab5	Rabbit	1:50	Santa Cruz Biotechnology
EEA1	Mouse	1:50	BD Biosciences
G58K	Mouse	1:100	Sigma
$LAMP1_{(1D4B)}$	Mouse	1:50	Hybridoma Bank
$LAMP2_{(GL2A7)}$	Rat	1:50	Hybridoma Bank
LDL Rezeptor	Chicken	1:50	Progen Biotechnik GmbH
AP2	Mouse	1:50	Ahle et al., 1988

Tabelle 3 zweite Antikörper die für die Immunfluoreszenz verwendet wurden

Antikörper	Herkunftspezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Mouse-Cy2	Donkey	1:100	Jackson Lab
Anti-Mouse-Cy3	Donkey	1:200	Jackson Lab
Anti-Rabbit-Cy2	Donkey	1:100	Jackson Lab
Anti-Rabbit-Cy3	Donkey	1:300	Jackson Lab
Anti-Rabbit-Cy5	Donkey	1:200	Jackson Lab
Anti-Sheep-Cy2	Donkey	1:100	Jackson Lab
Anti-Sheep-Cy3	Donkey	1:400	Jackson Lab
Anti-Chicken-Cy2	Donkey	1:100	Jackson Lab
Anti-Chicken-Cy3	Donkey	1:200	Jackson Lab
Anti-Chicken-Cy5	Donkey	1:200	Jackson Lab
Anti-Rat-Cy2	Goat	1:100	Jackson Lab
Anti-Rat-Cy3	Donkey	1:200	Jackson Lab

3.5 Zellkultur:

3.5.1 Material

- Humane Hepatomazellen HuH7
- Nährmedium:
  - Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Glutamax I (Gibco)
  - 10% Fetales Bovines Serum (Gibco)
  - 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco)
  - 0,1% Ciprofluxacin (Fluka)
- Phosphate Buffered Saline(PBS) (Gibco):
  2,7mM KCl, 1,5mM KH_2PO_4, 137mM NaCl, 8,1mM Na_2PO_4, pH 7,4
- Trypsin-/ EDTA Lösung (Gibco)
- Zellkulturflaschen T75

3.5.2 Methode

Die Zellkulturarbeiten wurden zur Vermeidung von Kontamination unter einer sterilen Kulturbank durchgeführt. Die HuH7-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -196° Celsius in 2 ml Kryoröhrchen aufbewahrt. Bei Bedarf wurden die Zellen für eine Minute im Wasserbad bei 37 Grad aufgetaut, anschließend in 10 ml frisches Medium gegeben, in zwei Kulturflaschen verteilt und durch weitere 8 ml Nährmedium ergänzt. Die Kulturflaschen wurden in einem Brutschrank bei 37 Grad Celsius und 5% CO_2 gelagert. Bei Erreichen einer Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert und mit Nährmedium erneut in Kulturflaschen verteilt oder für Experimente ausgesetzt.
Hierzu wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und mit 10 ml PBS abgewaschen, was anschließend auch abgesaugt wurde. Auf den Zellrasen wurden 4 ml Trypsin gegeben und nach 1 bis 2 Minuten wurden die Zellen abgeklopft. Um die Reaktion des Trypsins zu stoppen, wurden anschließend 8 ml Nährmedium zugesetzt und die 12 ml Trypsin und Nährmedium in ein 15 ml Röhrchen gegeben. Davon wurden erneut Zellen für neue Kulturflaschen oder für Experimente entnommen.

3.6 Markierung von rekombinantem ApoE (rApoE) und Assoziation an TRL

3.6.1 Material

- PD_{10}- Säule sephadex^{TM} G-25M (Amersham Biosciences)
- rApoE (freundlich zur Verfügung gestellt von Thomas Grewal und Kerry-Anne Rye, Sydney)
- PBS
- Fluoreszenz Farbstoff (Cy^{TM}5 monoreactive dye) (Amersham Biosciences)
- TRL (wurden von der Technischen Angestellten Sandra Ehret aus dem Plasma von ApoCII-defizienten Patienten nach Heeren et al., 1999 isoliert und für die Experimente zur Verfügung gestellt)
- 1M Sodium Bicarbonat ($NaHCO_3$) (Fluka)
- 1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)/HCL, pH 7,4 (Sigma/Merck)
- L7-55 Ultrazentrifuge mit Swing-out-Rotor (SW 40) (Beckman)
- 60% Sucrose (Merck)
- Unterschichtungskanüle

3.6.2 Methode

Eine PD_{10}-Säule wurde dreimal mit PBS äquillibriert. Anschließend wurden 1500 µl vom rekombinanten ApoE mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml ,welches bei –80° C gelagert wurde und in TBS gelöst war, auf die Säule gegeben und mit PBS ad 2,9 ml aufgefüllt. Nach Gabe von 1800 ml PBS wurde das in PBS gelöste ApoE, welches sich im unteren Teil der Säule befand, in einem Eppendorfcup aufgefangen. Die rApoE-Lösung wurde in Cy5-Farbstoff gelöst und um den Farbstoff zu aktivieren wurde nun 10% des Volumens der rApoE-Lösung, bzw 200 µl an 1M NAHCO3 zugegeben. Anschließend wurde eine halbe Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 10 % des Volumens der rApoE-Lösung, bzw 200 µl an 1M TRIS/HCl, pH 7,4 zugegeben. Um die mit dem Farbstoff markierten rApoE nun an trypsinierte TRL zu assoziieren, wurde die rApoEx-Lösung mit etwa 500 µl TRL gemischt und die 2700 µl Lösung wurde über Nacht bei 4° C rollend inkubiert.

Für die Re-Isolation der Cy5-ApoE-TRL wurden zunächst 500 µl 60% Sucrose hinzugefügt und der Ansatz wurde in einem Zentrifugenröhrchen unter 9 ml PBS

geschichtet. Es folgte die Ultrazentrifugation bei 25.000 rpm für 60 Minuten in einem swing-out Motor, wobei die leichteren, mit Cy5 markierten ApoE gekoppelten TRL, vom freien Farbstoff getrennt wurden. Der Überstand, die Cy5-rApoE-TRL, wurden quantitativ mit einer Kanüle in 2ml Gesamtvolumen abgenommen und anhand dieses Volumens wurde die Konzentration der Cy5-rApoE-TRL berechnet.

3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.7.1 Material

- Murine Hepatozyten auf Coverslips (freundlich zur Verfügung gestellt von Sandra Ehret, Technische Assistentin im Labor der Molekularen Zellbiologie)
- Mit Adenoviren transfizierte Hepatozyten auf Coverslips (freundlich zur Verfügung gestellt von Sandra Ehret, Technische Assistentin im Labor der Molekularen Zellbiologie)
- Nährmedien
    - DMEM mit GlutaMAX-I (Gibco)
    - DMEM mit 2,5% Fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin
    - DMEM mit 2% Bovinem Serum-Albumin (BSA Fraktion V von Sigma)
- Aufnahmelösung:
    - DMEM (Gibco) mit 2% BSA (Sigma)
    - Cy5-gelabelte ApoEx assoziiert mit TRL
- Recyclinglösung:
    - DMEM with Glutamax I mit 0,5% BSA
    - Cy3 markiertes ApoE freie HDL
- Waschpuffer
    - PBS (Gibco, Invitrogen)
    - PBS mit Heparin(Ratiopharm)
- Puffer
    - Zelllysispuffer (50 mM TRIS, 80 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 1% Triton X100) mit 0,5% SDS in 0,25 M TRIS pH 8,0 und Protease-Inhibitoren im Verhältnis 1:100 bis 1:1000
    - Reduzierter Mix (2 Teile 10% SDS in 0,25 M TRIS pH 8,0 + 1 Teil Bromphenolblau in 99% Glycerin + 1 Teil Mercaptoethanol (Serva))

- Rainbow Marker RPN800 (Amersham Biosciences)
- BSA (2 mg/ml) (Pierce)
- 4-12% Bis-TRIS-Gradientengel NuPAGE, 1.0 mm x 10-Well mit MES SDS Running Buffer und zugehöriger „xCell Sure Lock“ Elektrophoresekammer (alles von Invitrogen)

3.7.2 Methode

Je nach Experiment wurden murine Hepatozyten oder Ad Cre infizierte Hepatozyten in einer Dichte von 200.000 Zellen pro Well in 6-Well-Platten, die pro Well vier Coverslips enthielten, ausgesetzt und im Brutschrank gelagert. Nach dem Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die Zellen mit einer Pinzette kurz auf Filterpapier abgetupft und in eine Schachtel mit Parafilm verbracht. Hier wurden 60 µl der Aufnahmelösung auf die Zellen pro Coverslip gebracht und für 30 Minuten bei 37℃ mit dieser inkubiert. Anschließend wurden die Coverslips in PBS und heparinisiertem PBS gewaschen, um an der Oberfläche der Zellen gebundene Liganden zu entfernen.
Die Zellen wurden dann, pro Coverslip in etwa 40 µl Zelllysispuffer 2% lysiert und anschließend mittels einer Pipette unter Resuspension abgenommen. Die Proben wurden daraufhin 10 Minuten in der Laborzentrifuge „1-15K“ von Sigma bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen. Es wurde aus jeder Probe 10 µg Protein mit Zelllysispuffer bzw. 2% SDS auf 60 µl aufgefüllt und mit 30 µl reduziertem Mix gemischt, dieser enthielt neben SDS, eine Glycerin-Lösung zum Beschweren der Probe und Bromphenolblau zur Sichtbarmachung der Lauffront.
Bei den Recycling-Experimenten erfolgte nach dem Waschvorgang eine 30minütige Efflux-Phase, in der die Coverslips mit 80 µl der Recyclinglösung bei 37℃ bei unterschiedlichen Zeiten inkubiert wurden. Anschließend, statt der Zelllyse, wurden die Überstände mittels einer Pipette abgenommen und ebenso wie die Zelllysate mit reduziertem Mix gemischt. Nach 10minütiger Inkubation bei 40℃, anschließender Abkühlung und kurzer Zentrifugation, wurden die Proben einer SDS-PAGE mit 4-12%igen Gradientengelen (Invitrogen) unterzogen. Dabei wurden pro Well 25 µl einer Probe pipettiert und eine Spannung von 200 V angelegt. Der Gellauf wurde bis zum Erreichen der gewünschten Auftrennung durchgeführt. Die Proteine trennen sich ihrer Größe nach auf, wobei die Porengröße des Gels von oben nach unten

abnimmt. Der in einer Linie sich auftrennende Marker, gibt durch unterschiedliche Farben die Größen der jeweiligen Banden an.
Je nach Experiment erfolgte danach ein Western Blot bzw. eine in Gel Fluoreszenzdetektion und Quantifizierung.

3.8 Western Blot

3.8.1 Material

- Blotting-Puffer:
  - 150 mM Glycin (Roth)
  - 20 mM TRIS(Sigma)
  - 1 l Methanol (Serva)
  - Aqua dest. ad 5 l
- Membran: Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm (PROTRAN von Schleicher und Schuell)
- Gel-Blotting-Papier (Schleicher und Schuell)
- Schwämme
- Roller
- „Trans-Blot“ Cell-Apparatur (BioRad)
- Blotting - Power Supply „2301 Macrodrive 1 Power Supply” (LKB Bromma)
- Ponceau-Färbelösung: 0,2% in 3% TCA (Serva)
- Waschpuffer
  - 154 mM NaCl
  - 20 mM TRIS
  - 0,1% Tween 20 (BioRad)
  - ad 5 l Aqua dest.
  - pH 7,4
- PBS
- Blocklösung: 10% Milchpulver in Waschpuffer
- ECL Entwicklungsreagenz (Amersham Biosciences)
- 1. Antikörper : anti-ApoE (Dako) 1:5000 in Waschpuffer mit 5% BSA
- 2. Antikörper : Peroxidase-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (Garpo)
  1:5000 frisch in Blocklösung angesetzt

3.8.2 Methode

Nach vorherigem Aufnahme-Experiment und SDS-PAGE folgte der Proteintransfer in Blotting-Puffer auf eine Nitrocellulose-Membran. Dabei war besonders auf das ständige Feuchthalten der Membran und das luftblasenfreie Auflegen des Gels auf diese zu achten. In einer Trans-Blot Cell-Apparatur wurde bei 4℃ unter konstanter Stromstärke vier Stunden bei 400 mA bzw. über Nacht bei 200 mA geblottet.
Zur Kontrolle der Blot-Effizienz erfolgte die Ponceau-Färbung. Dabei wurde die Membran für 10 Minuten mit Ponceau-Lösung unter leichtem Schütteln gefärbt. Überschüssige Ponceau-Lösung wurde mit Aqua dest. abgewaschen bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Nach Trocknen, Markierung der Markerbanden und Dokumentation, wurde die Membran mit PBS wieder entfärbt.
Die anschließende Immundetektion erfolgte angelehnt an Beisiegel et al. (Beisiegel et al., 1982). Zunächst wurden die noch freien Bindungsstellen der Membran durch einstündige Inkubation mit 10% Milchpulver enthaltendem Waschpuffer blockiert.
Anschließend wurde die Blocklösung mittels Waschpuffer unter leichtem Schütteln abgewaschen und die Membran über Nacht bei 4℃ mit dem ersten Antikörper in Waschpuffer mit 5% BSA inkubiert. Vor Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde dreimal 10 Minuten mit dem Waschpuffer gewaschen. Es folgte die 90minütige Inkubation mit einem zweiten Antikörper 1:5000 verdünnt in Blocklösung. Nach erneuter dreimaliger mit dem Waschpuffer erfolgter Waschserie, verblieb die Membran bis zur Weiterverarbeitung in PBS.
Die Membran wurde nun leicht mit Gel-Blotting-Papier abgetupft und für eine Minute mit ECL-Lösung inkubiert, diese wurde dann mittels Blotting-Papier wieder abgenommen. Die entstehende Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes detektiert. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach Bedarf unterschiedlich lang belichtet. Nach Entwicklung waren die Banden als dunkle Bereiche zu erkennen.

3.9 In Gel Fluoreszenzdetektion und Quantifizierung

Bei den Recycling-Experimenten wurde die Fluoreszenz im Gel direkt nach dem SDS-Page und vor dem Western Blot mittels eines Fluoreszenzscanners (Typhoon 9410) gescannt und quantifiziert. Dabei wurde der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (670 BP

30 Cy5) bei einer Wellenlänge von 633 nm (Red) detektiert. Mit dem Programm Typhoon Scanner Control v5.0 konnten die Banden schließlich quantifiziert und zum Vergleich der aufgenommen ApoE in den Proben mit unterschiedlichen Inkubationsansätzen herangezogen werden.

3.10 Indirekte Immunfluoreszenz

3.10.1 Material

- Zellen:HuH7 auf Coverslips
- Aufnahme Lösung:
  - DMEM with Glutamax I mit 0,5% BSA
  - Cy5 markierte ApoE beladene TRL(je nach Versuchsansatz $ApoE_2$ oder $ApoE_3$)
- Recyclinglösung:
  - DMEM with Glutamax I mit 0,5% BSA
  - Cy3 markiertes ApoE freie HDL
- Fixationslösung: 4% Paraformaldehyd(PFA) (Sigma) in PBS
- Waschlösungen:
  - DMEM with Glutamax I mit 0,5% BSA
  - PBS
  - PBS mit 100U/ml Heparin
  - PGS : PBS mit 0,5% Glycin und 0,05% Saponin (Sigma)
- Blocklösung : 1% BSA und 0,05% Saponin in PBS
- 1. Antikörper-Lösungen: Blocklösung mit unterschiedlichen Antikörper (siehe Tabelle in verschiedenen Konzentrationen je nach Aufnahmeansatz
- 2.Antikörper-Lösung:Blocklösung mit unterschiedlichen Antikörpern je nach Experiment:
- 0,1% 1,2 Phenylendiamin(PPD) (Merck) in Mowiol (Calbiochem)
- 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (Sigma)
- Nagellack
- Filterpapier
- Objektträger

3.10.2 Methode

HuH7 Zellen wurden auf autoklavierte Coverslips in 6-Well-Platten ausgesetzt (mit 100.000 Zellen pro Well) und im Brutschrank gelagert. Nach 1 bis 3 Tagen (abhängig von der erwünschten Konfluenz der Zellen) wurden sie für die Experimente entnommen. Die Coverslips wurden mit DMEM+0,5%BSA Lösung gewaschen und für 30 Minuten mit dem Aufnahmeansatz bei 37 Grad inkubiert. Danach wurden sie mit PBS-Heparin auf dem Schüttler gewaschen, um Rückstände der Aufnahmelösung zu entfernen und schließlich mit PBS noch einmal gewaschen. Dann wurden die Recyclingansätze auf die Coverslips pipettiert und für unterschiedliche Zeiten bei 37 Grad inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und für 30 Minuten in 4% PFA-PBS Lösung fixiert. Nach viermaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit der Blocklösung für 20 Minuten inkubiert, um unspezifische Kreuzreaktionen der Antikörper zu vermindern. Zur Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Coverslips mit der 1. Antikörperlösung bei 37 Grad im Brutschrank für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PGS-Lösung, welche die fixierten Zellmembranen permeabel für die Antikörper macht und störende Aldehydgruppen absättigt, wurden die Zellen mit dem zweiten Antikörper für 45 Minuten bei 37 Grad im Brutschrank inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS und einmaligem Waschen mit PBS plus DAPI, welches die DNA und somit die Zellkerne färbt, wurden die Coverslips mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger gegeben, nachdem ein Tropfen 0,1% PPD in Mowiol auf den Objektträger aufgebracht wurde. Zum luftdichten Abschluss wurden die Coverslips mit Nagellack umrandet. So wurden die Strukturen der Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

3.11 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

3.11.1 Prinzip der Fluoreszenz

Zur Analyse der mittels Immunfluoreszenz markierten Zellstrukturen, wurde die Methode der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie angewandt, die wie die herkömmliche Auflichtfluoreszenzmikroskopie auf dem Phänomen der Fluoreszenz basiert. Darunter versteht man, dass bei der Absorption von Licht definierter

Wellenlänge (=Anregungslicht) bei bestimmten Molekülen, die Fluorochrome heißen, die Emission von Licht mit größerer Wellenlänge zu beobachten (=Emissionslicht) ist. Bestimmte Elektronen dieser Moleküle absorbieren hierbei die Photonen und gelangen dadurch auf ein höheres Energieniveau. Sie können sich allerdings auf diesem Niveau nicht halten und fallen wieder nach wenigen Nanosekunden auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Aufgrund der Energieverluste durch Schwingungsrelaxationen wird nur ein Teil der aufgenommenen Energie als Fluoreszenz freigesetzt, weshalb diese immer eine größere Wellenlänge als das Anregungslicht besitzt (Stokesches Prinzip). Die als Stokes-Verschiebung bezeichnete Differenz in der Wellenlänge des absorbierten und emittierten Photons ist von größerer Bedeutung, um in der Fluoreszenzmikroskopie durch eine geschickte Auswahl an Filtern das helle Anregungslicht und das schwache Fluoreszenzlicht im Strahlengang des Mikroskops zu trennen. Dadurch gelangt nur noch das Fluoreszenzlicht zur Bildentstehung.

3.11.2 Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie

Die konfokale Laserscanningmikroskopie bietet gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie erhebliche Vorteile. Hervorzuheben sind die stark verbesserte axiale Auflösung und die Möglichkeit einer Aussage über die dreidimensionale Verteilung von Fluoreszenzsignalen innerhalb des zu untersuchenden Objektes. Zusätzlich ist durch eine besser lokalisierte Anregung der Fluoreszenz mit Hilfe eines fokussierten Laserstrahls auch die laterale Auflösung erhöht.

Beim konfokalen Mikroskop dient nicht eine Xenon- oder Quecksilberdampflampe wie beim herkömmlichen Mikroskop, sondern der Laser als Quelle für das monochromatische Anregungslicht einer definierten Wellenlänge. Nach der Passage einer konfokalen Lochblende (*Pinhole*) trifft das Licht auf einen dichroitischen Spiegel, welcher transparent für das Anregungslicht und reflektierend für das emittierte Licht ist. (siehe Abb. 4) Danach erreicht das Laserlicht über einen doppelseitigen drehbaren Spiegel und ein Linsensystem sehr fokussiert das Meßobjekt. Über die Steuerung der Position der doppelseitigen drehbaren Spiegel wird der Laserstrahl Punkt für Punkt über das Objekt geführt. Die Fluoreszenzsignale kehren auf inversem Weg zum dichroitischen Spiegel zurück und

gelangen von dort durch eine zweite Lochblende (*Pinhole*) auf einen lichtempfindlichen Empfänger (Detektor) zum Beispiel einen Photomultiplier, aus dessen Signal dann punktweise ein (Schnitt-)Bild zusammengesetzt wird.

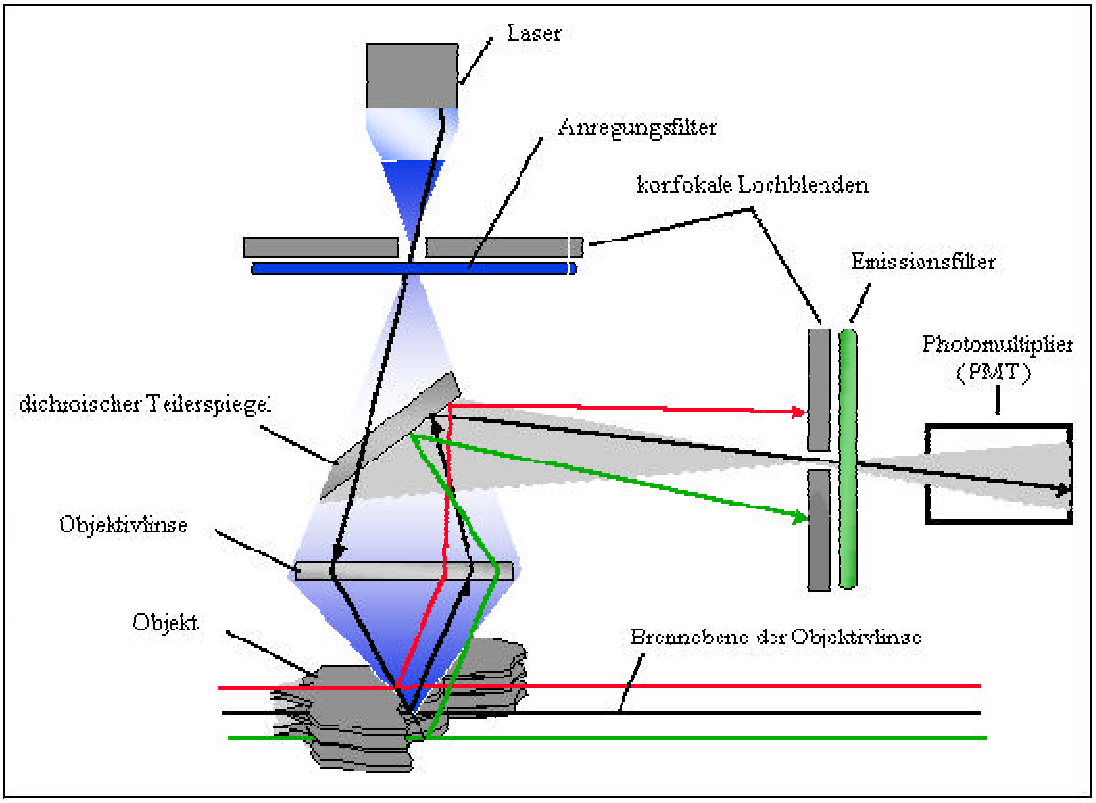

Abb. 4 Prinzip des *Laser Scanning Mikroskops* (LSM)

Durch die Einschaltung von den zwei konfokal zur Brennebene der Objektivlinse angeordneten Lochblenden in den Strahlengang wird Licht, welches nicht aus der Fokusebene stammt, ausgeblendet. Die Lochblenden, die beliebig variabel sind, dienen als Raumfilter. Somit wird Licht, was von oberhalb oder unterhalb der Fokusebene stammt, nicht detektiert. Die Durchmesser der Lochblenden bestimmen zusammen mit dem Mikroskopobjektiv die Dicke des optischen Schnittes, die bis zur unter 1µm eingegrenzt werden können.

Die Enstehung der Aufnahmen dieser Arbeit erfolgte mit dem *Laser-Scanning-Mikroskop* LSM 510 der Firma Zeiss. Es wurde ein 63x Objektiv verwendet.

Die Anregungs- und Emissionswellenlänge der verwendeten Fluorochrome ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 4 Einstellung zur Detektion verschiedener Fluorophore mit dem LSM 510

Fluorophor	Anregungslicht	Emissionslicht	Zugeordneter Farbstoff
Cy2	488nm	505-530nm	grün
Cy3	543nm	560-615nm	rot
Cy5	633nm	> 650nm	rosa
DAPI	364nm	385-470nm	blau

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die intrazelluläre Lokalisation des LRP1-Rezeptors und seine Bedeutung für das ApoE-Recycling untersucht werden. Da HDL das ApoE-Recycling beeinflusst, sollte auch die Lokalisation von HDL im Vergleich zur LRP1 und ApoE während des Recyclings beurteilt werden.

Für diesen Zweck wurden zunächst TRL aus humanem Plasma mit Hilfe der Ultrazentrifugation isoliert. Diese Partikel enthalten primär ApoB48 und zu einem geringen Anteil ApoB100. Da diese Partikel somit keiner sauberen Chylomikronen-Präparation entsprechen, werden sie im Folgenden als TRL bezeichnet. Bakteriell hergestelltes ApoE wurde mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und an den TRL assoziiert. Für die Experimente wurden humane Hepatomazellen der Zelllinie HuH7 (Nakabayashi et al., 1982) verwendet. Zuerst wurde das LRP1-Kompartiment charakterisiert. Dafür wurden endogen synthetisiertes LRP1 sowie Markerproteine endosomaler Kompartimente mit spezifischen Antikörpern detektiert. Im zweiten Teil wurde die LRP1-vermittelte intrazelluläre Prozessierung untersucht, indem LRP1 und aufgenommenes ApoE lokalisiert wurden. Im dritten Teil der Arbeit wurde unter dem Einfluss von HDL das LRP1 induzierte intrazelluläre Recycling in kurzen zeitlichen Abständen untersucht. Die Kolokalisationsanalysen wurden mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie durchgeführt. Um die Bedeutung von LRP1 für das HDL-induzierte-Recycling zu untersuchen, wurden die Experimente auch in primären Hepatozyten durchgeführt, die durch genetische Manipulation LRP1 defizient sind.

4.1 Charakterisierung des LRP1-Kompartimentes

LRP1 wird ubiquitär exprimiert und ist reichlich in Hepatozyten zu finden. Die Liganden-Aufnahme über *Coated Pits* ist - wie in Anschnitt 2.2.1.2 beschrieben - vergleichbar mit dem LDL-Rezeptor. In dieser Arbeit sollte seine intrazelluläre Lokalisation genauer charakterisiert werden. Dafür wurde der Rezeptor mit Cy2 markiert und seine Lokalisation im Vergleich zu Markerproteinen endosomaler Kompartimente untersucht. Zunächst wurde die Lokalisation von LRP1 im Vergleich zu frühen endosomalen Strukturen ermittelt. Um die Frühen Endosomen sichtbar zu

machen, wurde ein Antikörper gegen das Markerprotein EEA1 verwendet (Christoforidis et al., 1999). Abbildung 5 zeigt die konfokalen Aufnahmen dieser Untersuchungen.

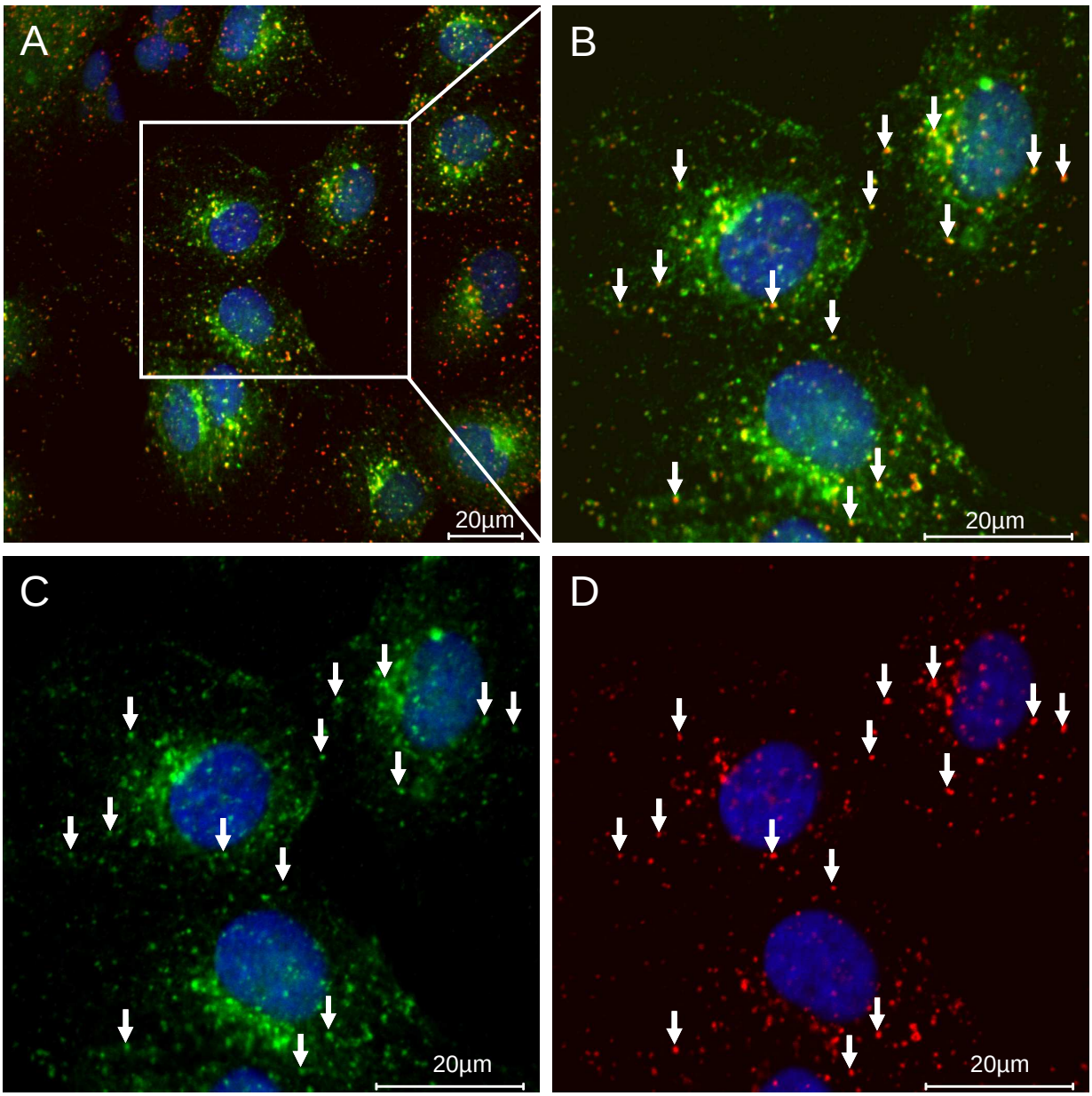

Abb. 5 A-D: Lokalisation von LRP1 und EEA1 in intrazellulären Kompartimenten. HuH7-Zellen wurden in 6-Well-Platten auf Coverslips ausgesetzt und in folgenden Tag nach Waschungen mit PBS in PFA fixiert. Nach 30minütiger Fixation wurden die Coverslips nach erneuten Waschschritten in Blockinglösung blockiert. Es folgte die einstündige Erstantikörperinkubation zur Detektion von LRP1 und EEA1. Vor der 45minütigen Zweitantikörperinkubation mit anti-rabbit-Cy2 und anti-maus-Cy3 waren erneute Waschschritte nötig. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes wurden die Coverslips nun in 0.1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Die abgebildeten HuH7-Zellen zeigen je nach eingesetztem Antikörper und Wellenlänge des konfokalen Mikroskopes unterschiedlich angefärbte intrazelluläre Strukturen. Abb. B zeigt eine Zoom-Aufnahme der Abb. A. In Abb. C sieht man LRP1 in grün und in D EEA1 in rot abgebildet. Die mit einem Pfeil markierten Strukturen kolokalisieren in der „*Overlay*-Darstellung“.

In der Abbildung 5A ist das zusammengesetzte Bild aller Fluoreszenkanäle gezeigt. Der Bereich des Kastens wurde in der Abbildung 5B-D vergrößert dargestellt. Die vesikulären Strukturen in der Abbildung 5C entsprechen LRP1, jene in Abbildung 5D Frühen Endosomen. Gut zu erkennen ist die typische, regelmäßig beobachtete, perinukleäre Lokalisation des LRP1 in diesen Strukturen. Eine Färbung der Plasmamembran, wie sie für den LDL-Rezeptor typisch ist, ist für LRP1 nicht zu erkennen. Die Kolokalisation zwischen LRP1 und EEA1 ist deutlich in der Abbildung 5B zu erkennen. Dies bedeutet, dass LRP1 in frühen endosomalen Strukturen zu finden ist, von denen sich viele perinukleär befinden.

Um zu überprüfen ob LRP1 auch im Golgi-Apparat lokalisiert ist, wurden in HuH7 Zellen LRP1 und das Golgi-System markiert (Abb. 6). Als Marker für den Golgi-Apparat wurde der monoklonale Anti-Golgi 58K Protein (G58K) verwendet. Wie für die Abbildung 5 beschrieben, ist in der Abbildung 6A das zusammengesetzte Bild aller Fluoreszenkanäle gezeigt. Der Bereich des Kastens wurde in der Abbildung 6B-D vergrößert dargestellt.

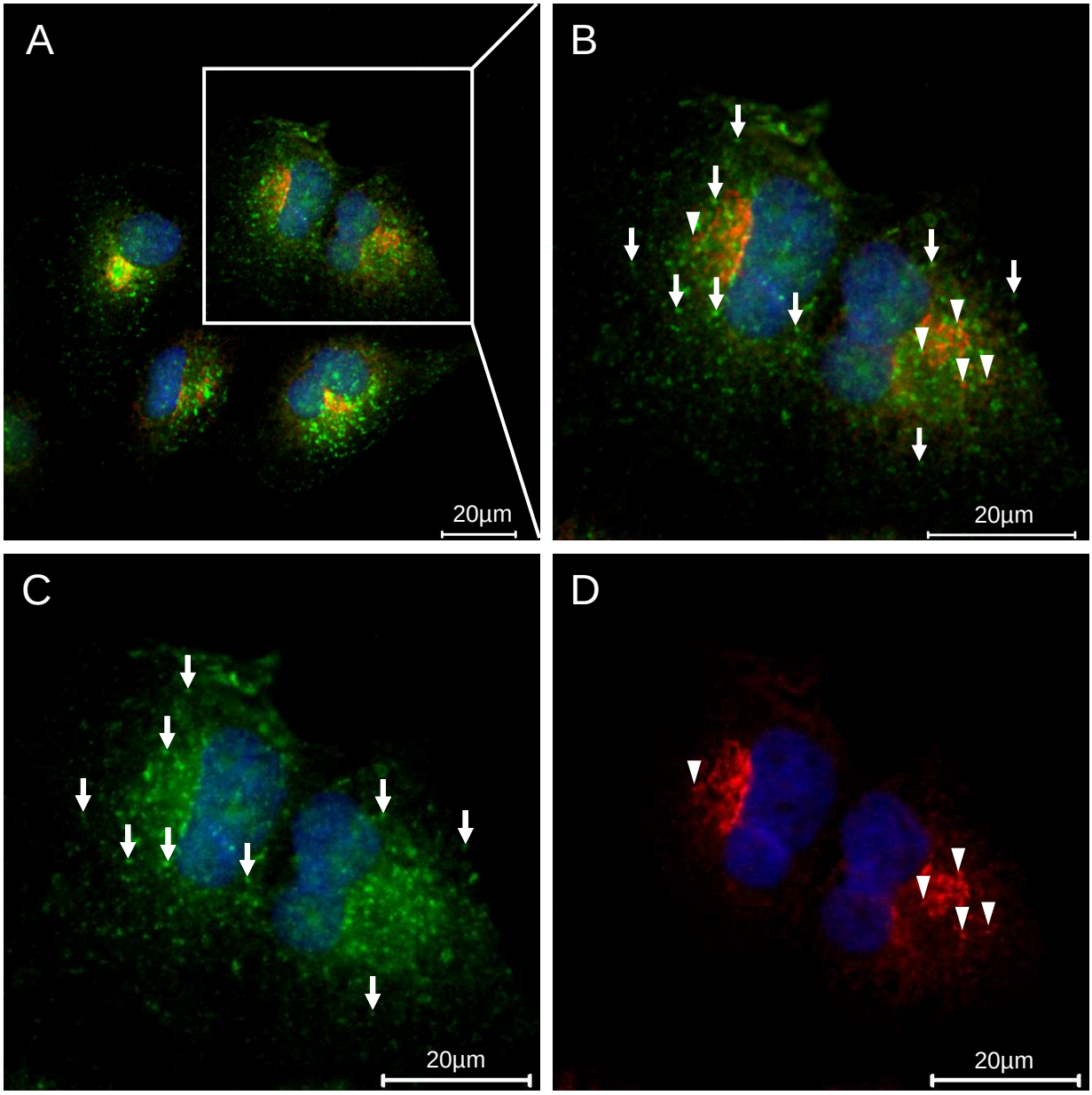

Abb. 6 A-D Intrazelluläre Lokalisation von LRP1 und Golgi- Apparat.

HuH7 Zellen wurden in 6-Well Platten auf Coverslips ausgesetzt und nach Erreichen der gewünschten Konfluenz nach Waschungen mit PBS in PFA fixiert. Nach der Fixation erfolgten mehrere Waschschritte und das Blocken mit der Blocklösung. Die Zellen wurden anschließend mit Erstantikörper gegen LRP1 und G58K inkubiert. Die Zweitantikörperinkubation mit anti-rabbit-Cy2 und anti-mouse-Cy3 dauerte 45 Minuten. Nach einer DAPI Färbung, bei der die Kerne gefärbt werden, und mehreren Waschschritten, wurden die Coverslips in 0.1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Die Abb. B ist eine Zoom-Aufnahme der Abb. A. In Abb. C ist LRP1 in grün und in Abb. D G58K in rot zu sehen. Die Pfeile zeigen auf mit LRP1 angereicherte Vesikel und die Pfeilspitzen auf Vesikel des Golgi Systems.

Sowohl viele der Vesikel, die LRP1 (Abb. 6C) enthalten, als auch die meisten derjenigen des Golgi-Systems (Abb. 6D) sind perinukleär zu sehen. Allerdings kolokalisiert LRP1 nicht mit dem G58K (Abb. 6B). Das bedeutet, dass das LRP1 sich offenbar nicht im Golgi-System oder Golgi-assoziierten Recycling-Systemen wie das Trans-Golgi-Netzwerk befindet.

Um zu überprüfen, ob es eine mögliche Assoziation von LRP1 mit späten endosomalen Vesikeln gibt, wurden erneut HuH7 Zellen für ein Experiment ausgesetzt und mit Markern für Späte Endosomen/Lysosomen inkubiert. Letztere wurden mit Antikörpern gegen *Lysosome-associated membrane protein 1* (LAMP1) markiert (Eskelinen et al., 2003). Wie für die Abbildung 5 beschrieben zeigt Abbildung 7 die Ergebnisse dieses Experiments.

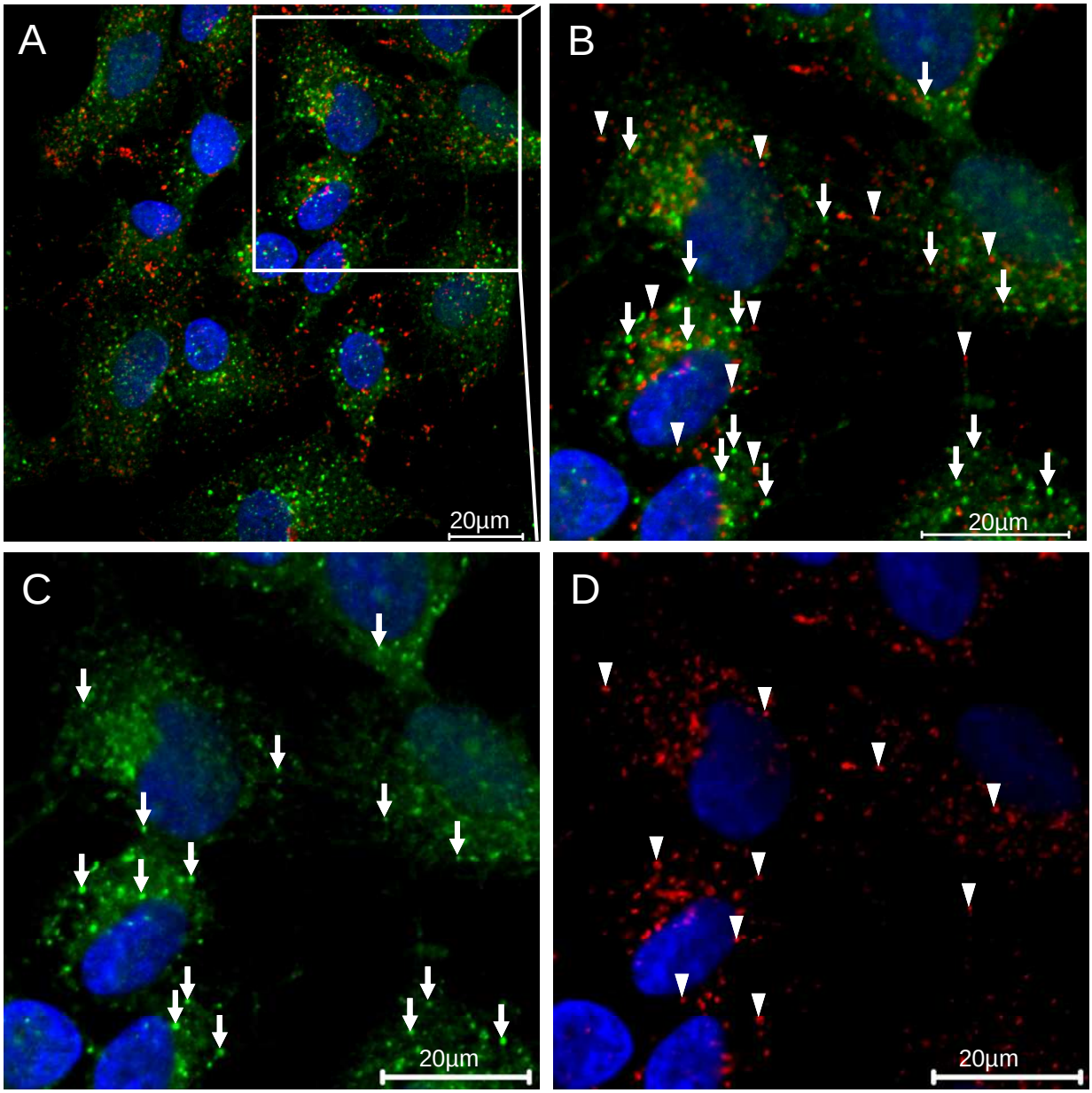

Abb. 7 A-D Lokalisation von LRP1 und LAMP1 in intrazellulären Kompartimenten

HuH7 Zellen wurden für das Experiment in 6-Well-Plates ausgesetzt und nach mehreren Waschungen mit PBS in PFA fixiert. Weitere Waschungen folgten und nach dem anschließendem Blocken mit BSA/Saponin in PBS-Lösung wurden die Zellen mit dem Erstantikörper inkubiert. Dazu wurden anti-LRP1 und anti-LAMP1 verwendet. Nach einer einstündigen Inkubation und weiteren Waschschritten wurden die Zellen für 45 Minuten mit anti-rabbit-Cy2 und anti-mouse-Cy3 inkubiert. Nach einer DAPI Färbung der Kerne und erneuten Waschschritten wurden die Coverslips in 0.1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Abb. B ist eine Zoom-Aufnahme der Abb.

A. In Abb. C ist LRP1 in grün und in Abb. D LAMP1 in rot zu sehen. Die Pfeile zeigen auf mit LRP1 angereicherte Vesikel und die Pfeilspitzen auf Vesikel der Späten Endosomen.

Die Bilder der Abbildung 7 zeigen eindeutig, dass die Lokalisation von LRP1 in der Zelle nicht mit der Lokalisation der Antikörper gegen Späte Endosomen übereinstimmt. Zusammenfassend zeigen diese ersten Experimente, dass sich LRP1 in Hepatomazellen weder im Golgi-System noch in lysosomalen Strukturen befindet, sondern betont in perinukleären Frühen Endosomen zu finden ist.

4.2 LRP1-vermitteltes intrazelluläres Prozessing

LRP1 dient mit Hilfe von ApoE und eventuell LPL oder HL wie in Abschnitt 2.1 bereits beschrieben als Rezeptor für die hepatische Aufnahme von TRL. Nachdem wir im ersten Schritt die Lokalisation von LRP1 ermittelt haben, soll nun die Interaktionen zwischen LRP1 und ApoE beim ApoE-Recycling untersucht werden. Es ist gezeigt worden, dass LRP1 nicht in der Lage ist, lipidfreies ApoE zu binden und seinen Stoffwechselweg zu initiieren (Ruiz et al., 2005). Daher wurde ApoE mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert und im Anschluss an TRL assoziiert, um in die Zellen aufgenommen werden zu können. Die Herstellung von markierten ApoE-reichen-TRL wurde im Teil Material und Methoden beschrieben.
Die Wahl der geeigneten ApoE-Isoform für die Experimente basierte auf den unterschiedlichen Eigenschaften der drei Isoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4. ApoE3 und ApoE4 binden an den LDL-Rezeptor mit einer vergleichbaren Affinität, die Bindung von ApoE2 ist dagegen 50- bis 100-mal schwächer (Schneider et al., 1981, Weisgraber et al., 1982, Mahley und Rall, 2000). Das ApoE4-Recycling in der Zelle ist im Vergleich zu ApoE3 deutlich vermindert (Heeren et al., 2004). Aus diesen Gründen verwenden wir bei unseren Experimenten die zudem häufigste Isoform ApoE3 (Weisgraber et al., 1981).
Zur Kontrolle der erfolgreichen Markierung wurden die Liganden einer SDS-PAGE unterzogen und mit Hilfe des Fluoreszenzscanners die Cy5-Fluoreszenz im Gel detektiert (siehe Abb. 8).

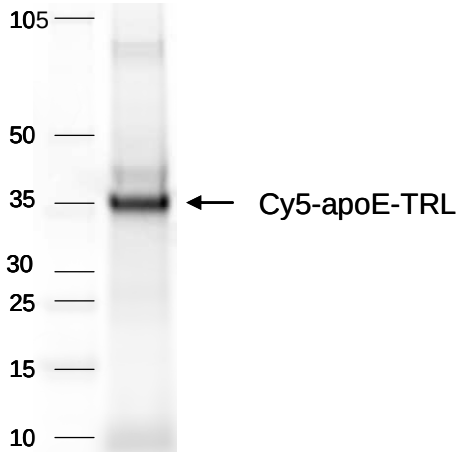

Abb. 8 Ligandengel Cy5-ApoE-TRL

Nach Herstellung der Liganden (siehe 3.6) erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung. Dafür wurde Cy5-ApoE-TRL aufgetragen. Die Abbildung zeigt die mit dem Fluoreszenzscanner sichtbar gemachte Fluoreszenzmarkierung der an TRL gekoppelten ApoE-Isoform bei einer Größe von 34 kDa.

Um die erfolgreiche Aufnahme der Cy5-ApoE-TRL in den Zellen zu überprüfen wurden Hepatomazellen auf Coverslips für ein Experiment ausgesetzt und nach 30minütiger Inkubationsphase bei 37℃ mit Cy5-ApoE- TRL wurden die Zellen fixiert und die Fluoreszenzanalyse mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt (Abb. 9).

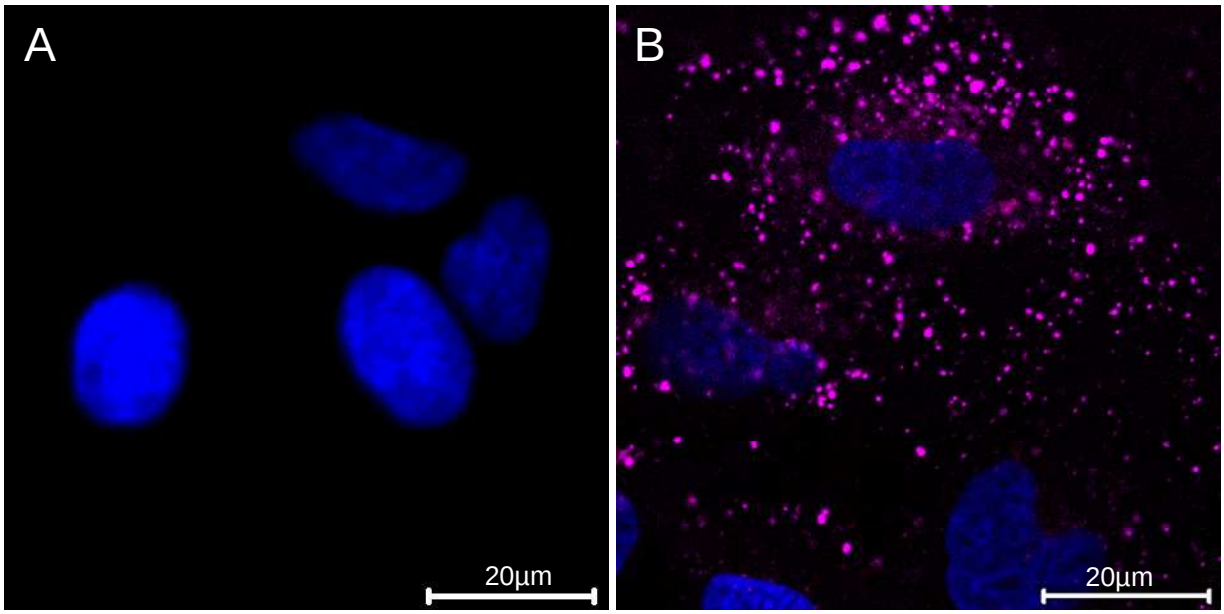

Abb. 9 A-B Aufnahme von Cy5-ApoE-TRL

HuH7-Zellen wurden in 6-Well-Platten auf Coverslips ausgesetzt und am folgenden Tag nach Waschungen mit PBS mit Cy5-ApoE-TRL für eine halbe Stunde bei 37 Grad in CO_2 inkubiert. Anschließend wurden sie mit Heparin in PBS Lösung gewaschen und in PFA fixiert. Einige Coverlips wurden ohne die Inkubation mit der Aufnahmelösung direkt fixiert. Nach 30minütiger Fixation wurden die Coverslips mehrmals gewaschen. Zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes wurden die Coverslips nun in 0.1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Abb. A zeigt die Zellen ohne, Abb. B diejenige mit 30minütiger Inkubation mit TRL.

Abbildung 9B zeigt, dass die markierten TRL in die Zelle internalisiert wurden und dass Cy5-ApoE in peripher gelegenen Endosomen detektiert werden kann.

Mit radioaktiv-markiertem ApoE wurde gezeigt, dass ApoE an LRP1 binden kann. In dem folgenden Experiment sollte die Lokalisation des internalisierten ApoE im Vergleich zum LRP1 untersucht werden.

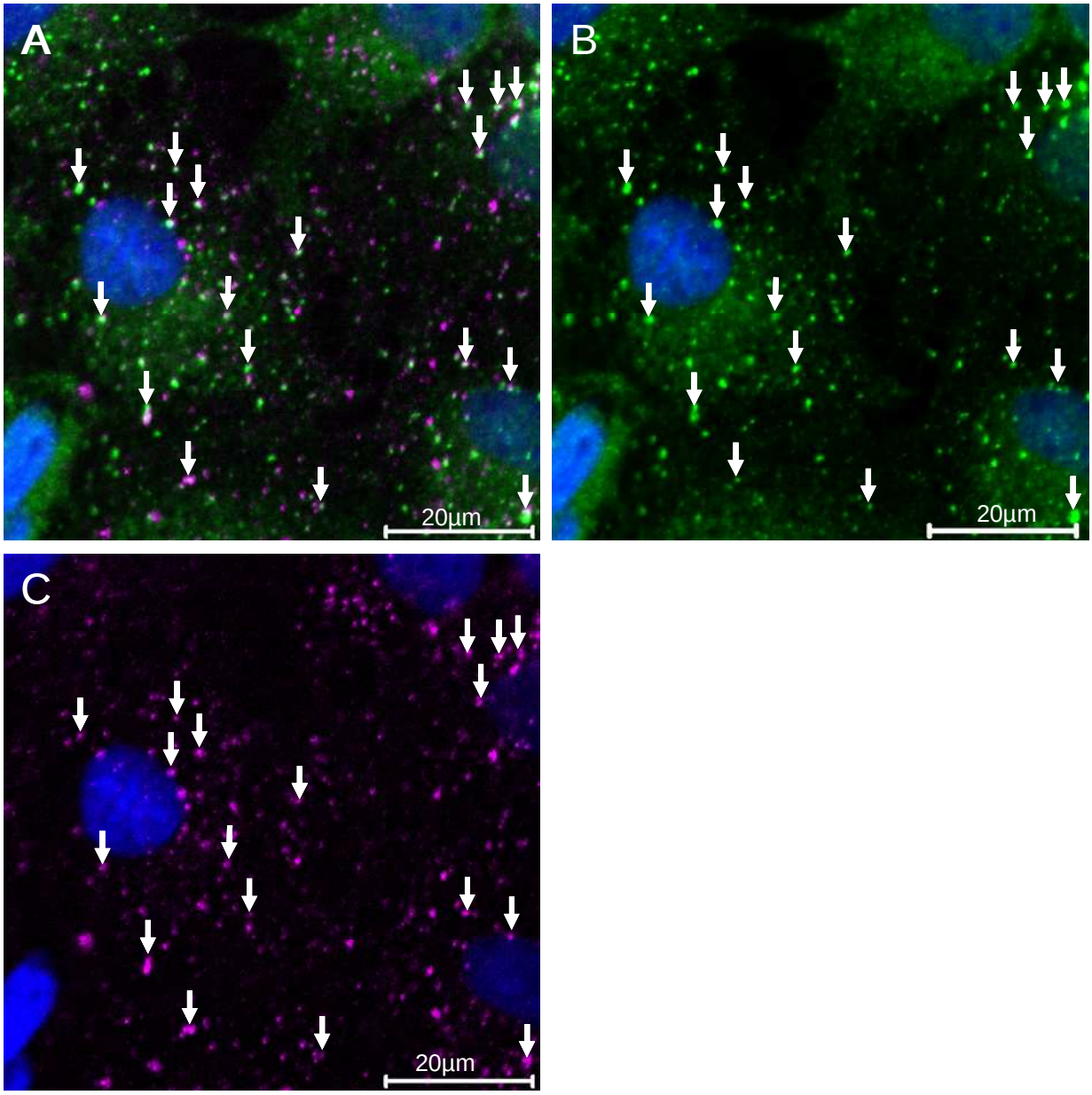

Abb. 10 A-C Lokalisation von ApoE-Cy5-TRL und LRP1 in Hepatoma Zellen.
Hepatomazellen wurden auf Coverslips ausgesetzt. Nach Erreichen einer ausreichenden Konfluenz und Waschung erfolgte die Inkubation mit ApoE-Cy5-TRL-Lösung für 30 Minuten. Nach weiteren Waschvorgängen, Fixierung und Inkubation mit einer Blocklösung, wurde anti-LRP_{377} als erster Antikörper aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation und erneuten Waschungen wurde anti-rabbit-Cy2 als Zweitantikörper verwendet. In Abb. B ist LRP1, in Abb. C sind die ApoE-gekoppelten TRL markiert. Die Pfeile zeigen auf Ko-Lokalisationen.

In der Abbildung 10 sind viele Endosomen zu detektieren (siehe Pfeile), die LRP1 enthalten und mit Cy5-ApoE kolokalisieren. Hieraus lässt sich ableiten, dass sich das TRL-assoziierte ApoE nach seiner Aufnahme in die Zelle in den gleichen Endosomen wie sein Rezeptor befindet.

Um nun jene Endosomen zu charakterisieren, in denen sich das ApoE zusammen mit LRP1 befindet, wurden im folgenden Experiment gleichzeitig Frühe Endosomen markiert und ihre Lokalisation in Beziehung zu ApoE und LRP1 untersucht (Abb. 11).

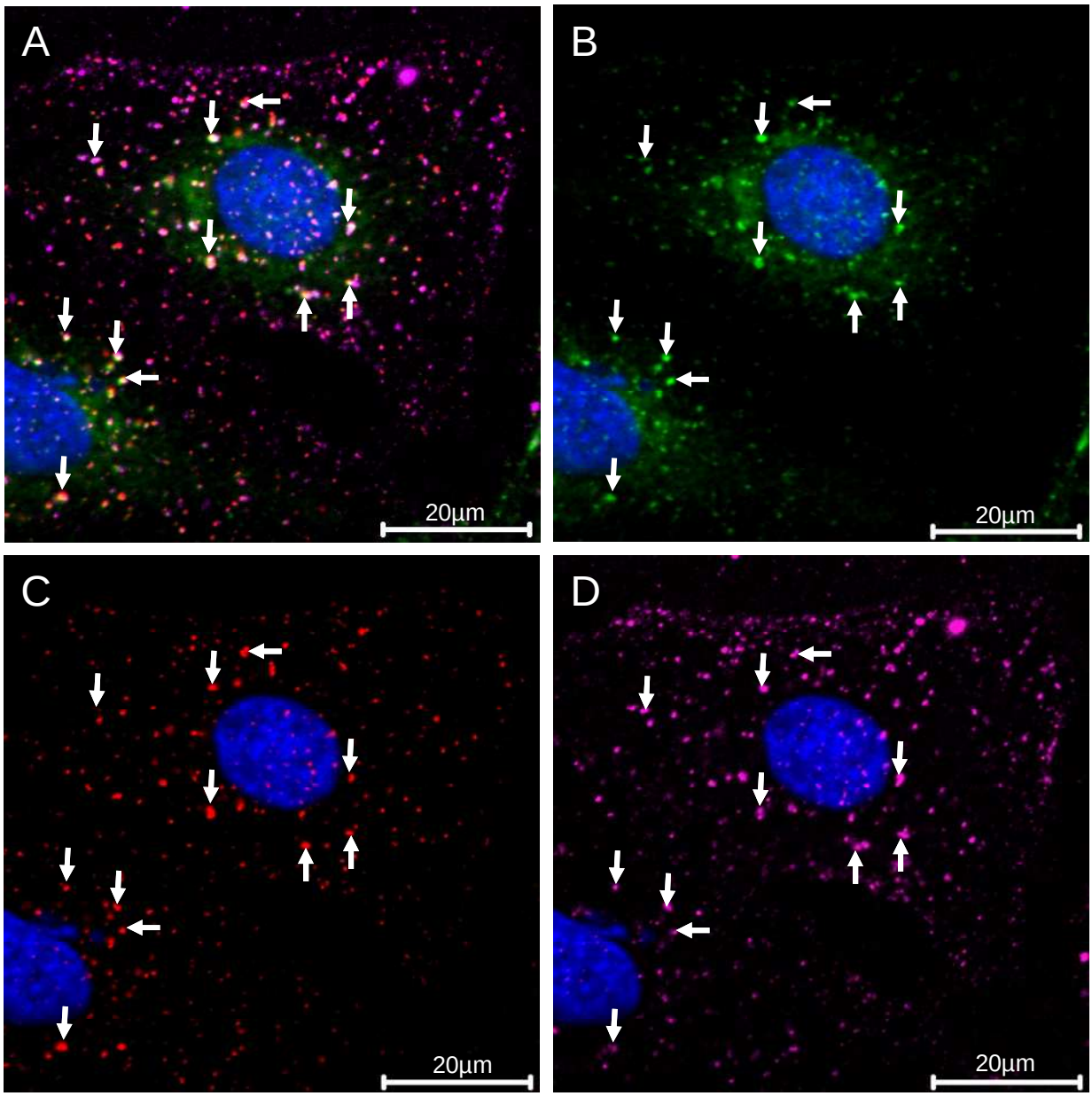

Abb. 11A-D:Lokalisation von LRP1,Cy5-ApoE-TRL und EEA1 in intrazellulären Kompartimenten
HuH7-Zellen wurden in 6-Well-Platten auf Coverslips ausgesetzt und 48 Stunden später für das Experiment mit PBS gewaschen. Es folgte die 30minütige Inkubation mit der Cy5-ApoE-TRL-enthaltenden Aufnahmelösung. Anschließend wurden die Coverslips nach mehreren Waschschritten mit PFA/PBS fixiert und in Blockinglösung blockiert. Es folgte die 60minütige Erstantikörperinkubation mit anti-LRP1 und anti-EEA1.Vor der 45minütigen Zweitantikörperinkubation mit anti-Rabbit-Cy2 und

anti-Maus-Cy3 waren erneute Waschschritte nötig. Zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes wurden die Coverslips nun in 0.1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Die abgebildete HuH7-Zelle zeigt je nach eingesetztem Antikörper und Wellenlänge des konfokalen Mikroskops unterschiedlich angefärbte intrazelluläre Strukturen. In Abb. B ist LRP1, in Abb. C EEA1 und in Abb. D TRL zu sehen. Die mit einem Pfeil markierten Strukturen kolokalisieren in der „*Overlay*-Darstellung“ (Abb. A).

In HuH7 Zellen kolokalisieren LRP1, ApoE und EEA1 in über das Zytoplasma verteilten endosomalen Strukturen. Diese Kolokalisation spricht für einen TRL-Transport mit Hilfe von LRP1 über EEA1-positive Strukturen, die am ehesten Frühen Endosomen entsprechen. Diese Ergebnisse unterstützten die Erkenntnisse, dass ApoE über periphere Kompartimente zurück zur Plasmamembran transportiert und nicht abgebaut wird (Heeren et al., 1999, Heeren et al., 2001)

Um zu untersuchen, ob ApoE auch in andere zelluläre Kompartimente transportiert wird, wurde eine Triple-Immunfluoreszenz mit Markierung der Golgi-Strukturen mit dem G58K Antikörper durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 zu sehen.

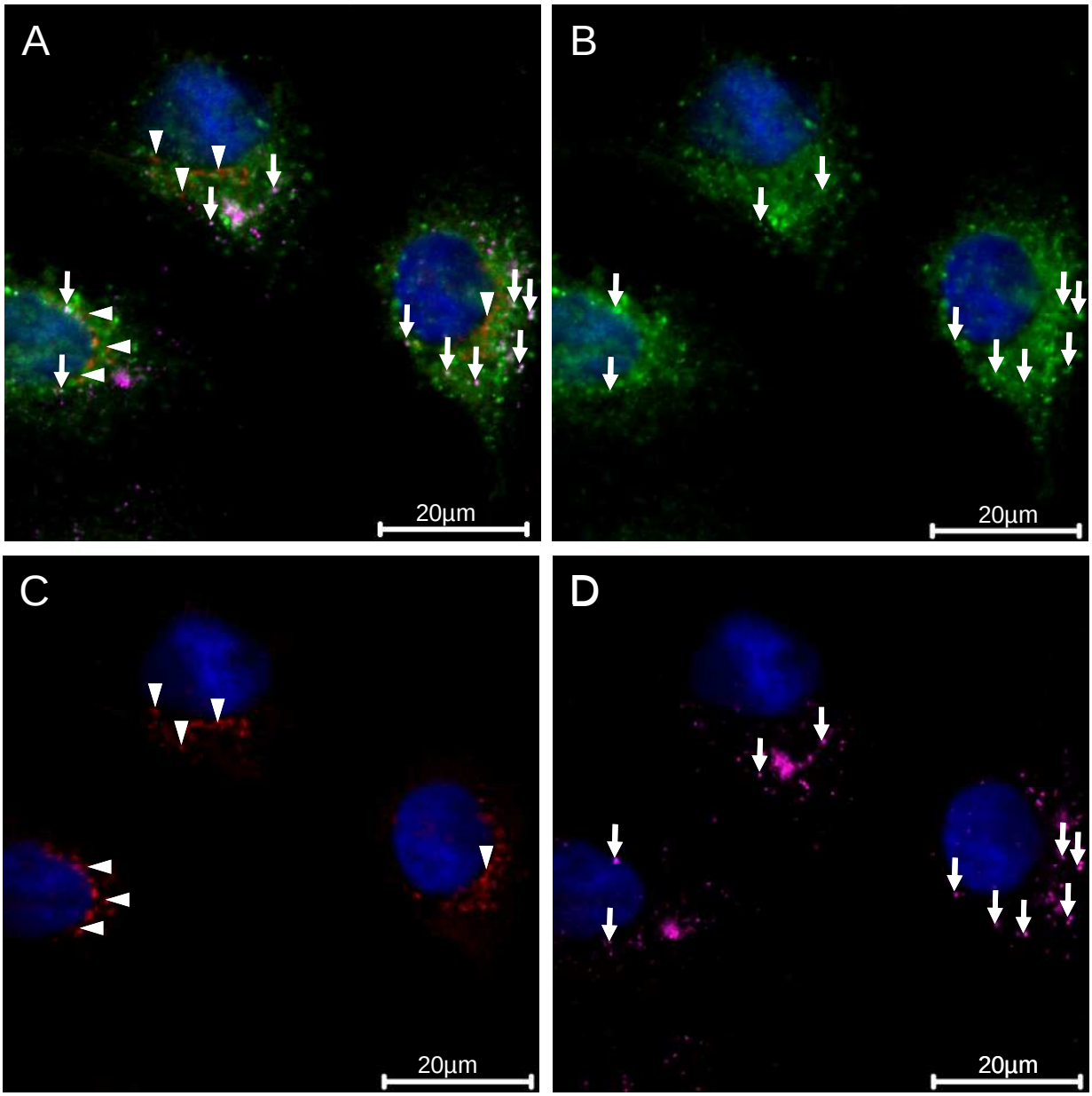

Abb. 12 A-D: Lokalisation von LRP1, Cy5-ApoE-TRL und G58K in intrazellulären Kompartimenten
Die HuH7-Zellen mit PBS gewaschen und für 30 Minuten in einer Cy5-ApoE-TRL-Lösung inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS und PBS-Heparin und Fixierung mit PFA/PBS, wurden die Coverslips mit Blocklösung geblockt. Es folgte die einstündige Erstantikörperinkubation mit anti-LRP1 und anti-G58K. Nach der 45minütiger Zweitantikörperinkubation mit Anti-rabbit-Cy2 und Anti-mouse-Cy3 wurden die Coverslips in 0,1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Die Fluoreszenzen konnten dann im konfokalen Mikroskop bei entsprechender Wellenlänge erkannt und dargestellt werden. Die mit Pfeilen beispielhaft markierten Strukturen stellen zytoplasmatische, LRP1(Abb. B) und ApoE-TRL(Abb. D) enthaltende Vesikel dar und die Pfeilspitzen zeigen auf mit G58K(Abb. C) markierten Strukturen.

In der oberen Abbildung ist die Kolokalisation von LRP1 und ApoE-TRL Partikel bestätigt worden, während keine Kolokalisation G58K zu detektieren ist. Das bedeutet, dass sich ApoE nach seiner Aufnahme in der Zelle mit Hilfe des LRP1

nicht in G58K-positiven Strukturen befindet, die am ehesten dem Golgi-Apparat entsprechen.

Um zu überprüfen, ob sich ApoE in lysosomalen Strukturen befindet, wurden in den folgenden Immunfluoreszenzexperimenten die Späten Endosomen mit Hilfe des Markers LAMP1 markiert und ihre Lokalisation mit der von LRP1 und ApoE verglichen.

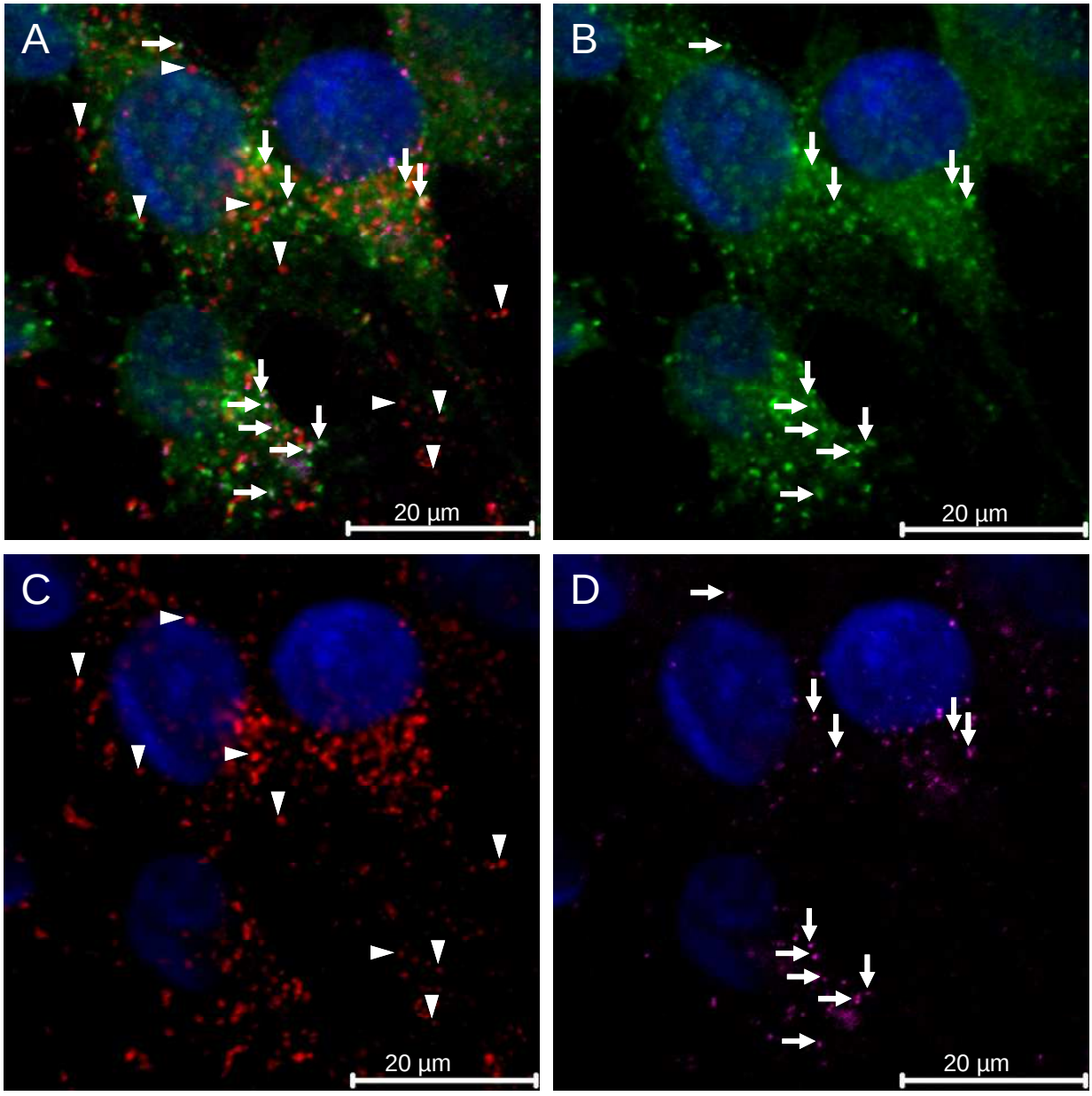

Abb. 13 Intrazelluläre Lokalisation von LRP1 ,Cy5-ApoE-TRL und LAMP1.
HuH7-Zellen wurden in 6-Well-Platten auf Coverslips ausgesetzt und 48 Stunden später für das Experiment mit PBS gewaschen. Es folgte die 30minütige Inkubation mit der Cy5-ApoE-TRL-enthaltenden Aufnahmelösung. Anschließend wurden die Coverslips nach mehreren Waschschritten mit PFA/PBS fixiert und in Blockinglösung blockiert. Es folgte die 60minütige Erstantikörperinkubation mit anti-LRP1 und anti-LAMP1. Vor der 45minütigen Zweitantikörperinkubation mit anti-Rabbit-Cy2 und anti-Maus-Cy3 waren erneute Waschschritte nötig. Zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes

wurden die Coverslips nun in 0.1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Die abgebildeten HuH7-Zellen zeigen je nach eingesetztem Antikörper und Wellenlänge des konfokalen Mikroskops unterschiedlich angefärbte intrazelluläre Strukturen. In 13B ist LRP1, in 13C LAMP1 und in 13D ApoE zu sehen. Die Pfeile zeigen auf mit LRP1(Abb. B) und ApoE(Abb. D) und die Pfeilspitzen auf mit LAMP1(Abb. C) reichen Vesikeln.

In Abbildung 13 sieht man keine Kolokalisation von ApoE und LAMP1 (siehe Pfeilspitzen in Abb. 13). Während die Kolokalisation zwischen LRP1 und ApoE bestätigt werden konnte, wird nach Inkubation mit TRL weder ApoE noch LRP1 in lysosomalen Kompartimenten detektiert (Heeren et al., 1999).

Zusammenfassend wurde mit den in diesem Abschnitt beschriebenen Experimenten gezeigt, dass ApoE nach seiner zellulären Aufnahme mit Hilfe von LRP1 wie auch auf seinem Recyclingweg nicht im Golgi-System und auch nicht in Lysosomen zu finden ist. Vielmehr ist anzunehmen, dass ApoE zusammen mit seinem Rezeptor LRP1 in frühen endosomalen Strukturen verbleibt (siehe Abb. 11).

4.3 HDL-induziertes ApoE-Recycling

HDL im extrazellulären Medium kann das ApoE-Recycling über periphere Recycling Endosomen induzieren (Heeren et al., 1999, von Eckardstein et al., 2001, Heeren et al., 2003). Das ApoE-Recycling kann auch ohne HDL-Stimulation erfolgen, allerdings ist die Anwesenheit eines extrazellulären Akzeptors sehr hilfreich (Heeren et al., 2001, Heeren et al., 2003). Um die Lokalisation von ApoE und LRP1 vor dem Recycling mit der Lokalisation während des Recyclings zunächst unstimuliert (d.h. ohne HDL) zu vergleichen, wurden für das Folgeexperiment HuH7 Zellen mit Cy5-ApoE-TRL inkubiert.

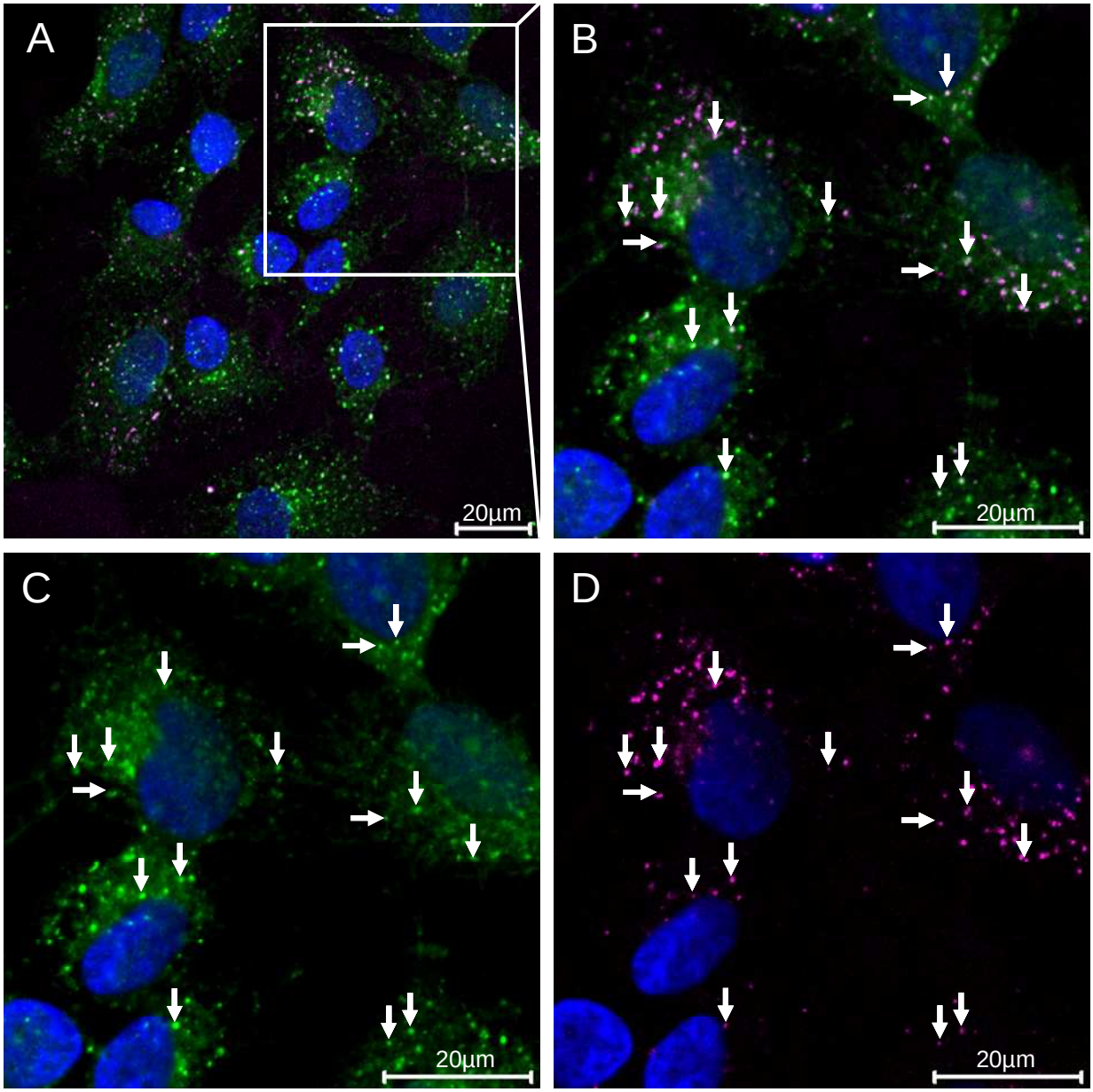

Abb. 14 A-D Lokalisation von LRP1 und Cy5-ApoE-TRL in intrazellulären Kompartimenten vor dem Recycling.
Hepatomazellen wurden auf Coverslips ausgesetzt. Nach Erreichen einer ausreichenden Konfluenz und Waschung erfolgte die Inkubation mit ApoE-Cy5-TRL-Lösung für 30 Minuten. Nach weiteren Waschvorgängen, Fixierung und Inkubation mit einer Blocklösung, wurde anti-LRP_{377} als erster Antikörper aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation und erneuten Waschungen wurde anti-rabbit-Cy2 als Zweitantikörper verwendet. Am Ende wurden die Coverslips auf dem Objektträger mit Nagellack fest umrandet. Die Abb. B ist eine Zoomaufnahme von A. In Abb. C ist LRP1 zu sehen und in D Cy5-ApoE-TRL. Die mit einem Pfeil markierten Strukturen kolokalisieren in der „*Overlay*-Darstellung".

Wie in den entsprechenden Vorexperimenten (siehe Abb. 10) befindet sich ApoE nach Aufnahme in den gleichen intrazellulären Strukturen wie LRP1.

Im folgenden Schritt wurden HuH7 Zellen nach der ApoE-TRL Aufnahme für unterschiedliche Dauer mit HDL inkubiert, um die Induktion des intrazellulären Recycling durch Gabe von HDL zu charakterisieren und die intrazelluläre

Lokalisation von HDL zu ermitteln. Dabei wurde auf die Lokalisation von ApoE, HDL und LRP1 und ihre Position zueinander geachtet. Das HDL wurde mit Cy3 markiert.

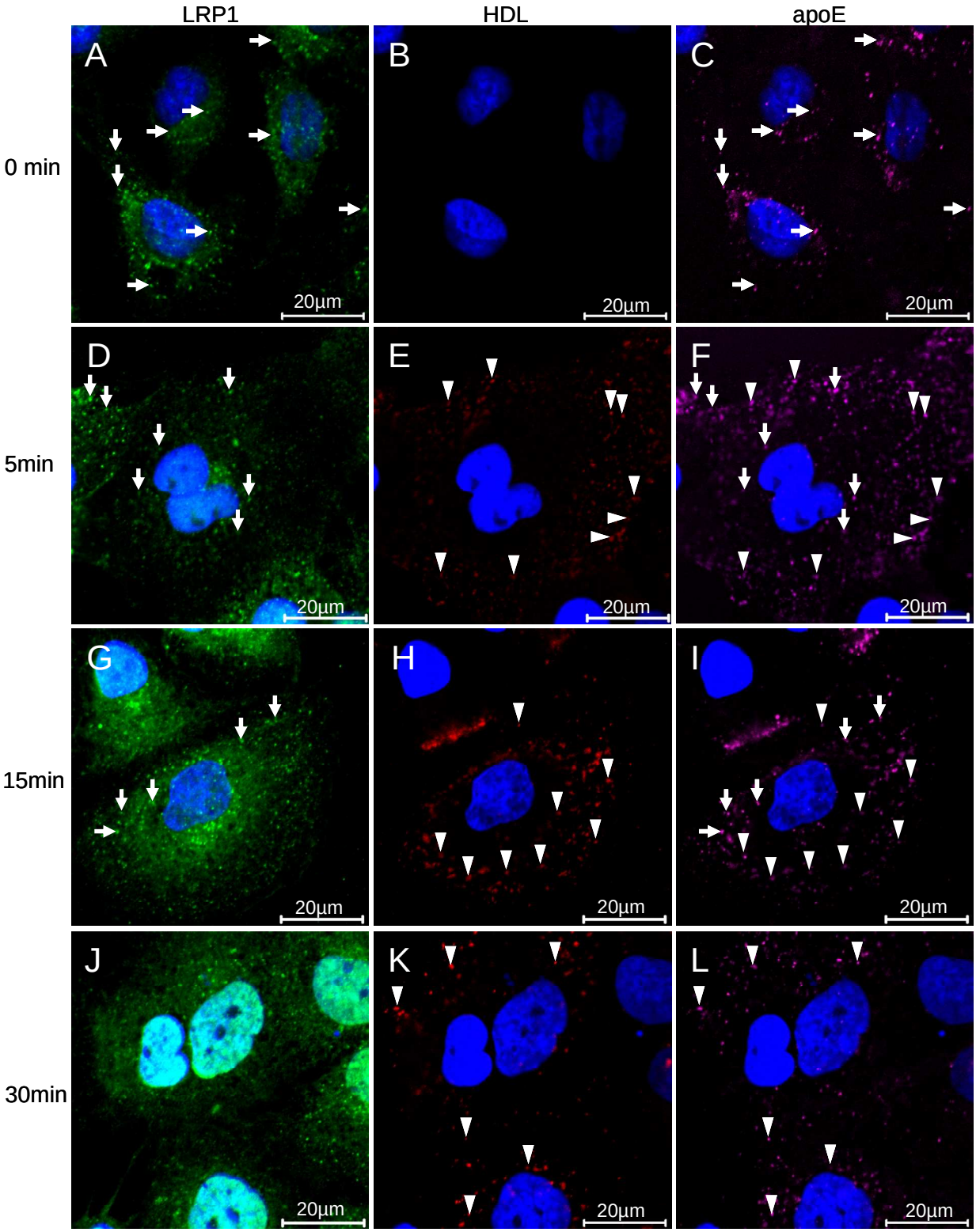

Abb. 15 A-L: Lokalisation von LRP1, Cy5-ApoE-TRL und HDL in intrazellulären Kompartimenten nach 0, 5,15 und 30 Minuten Inkubation mit HDL
Die in 6-Well-Platten auf Coverslips ausgesetzten HuH7-Zellen wurden nach 48 Stunden mit PBS und DMEM+BSA gewaschen und für 30 Minuten bei 37 Grad mit einer Cy5-ApoE-TRL-Lösung inkubiert.

Nach erneuten Waschschritten mit PBS-Heparin und PBS folgte die Inkubation der HuH7 Zellen mit einer Cy3-apoE-freie-HDL-Lösung für jeweils 5,15 und 30 Minuten. Vor der 30minütige Fixierung mit PFA waren erneute Waschschritte erforderlich. Die Coverslips wurden nun mit PBS gewaschen und mit dem ersten Antikörper (anti-LRP1) bei 37 Grad inkubiert. Nach der 45minutigen Zweitantikörperinkubation mit Anti-rabbit-Cy2 wurden die Coverslips in 0,1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Die Fluoreszenzen konnten dann im konfokalen Mikroskop bei entsprechender Wellenlänge erkannt und dargestellt werden. Die mit Pfeilen beispielhaft markierten Strukturen stellen kolokalisierende LRP1 und ApoE-TRL enthaltende Vesikel dar und die Pfeilspitzen zeigen auf kolokalisierenden HDL und ApoE-TRL enthaltenen Strukturen.

Wie in der Abbildung 15 zu sehen ist zum Zeitpunkt 0 min, wie zu erwarten, eine starke Kolokalisation von ApoE und LRP1 zu sehen. Dies belegt erneut die initiale Verbindung von ApoE mit seinem Rezeptor. Schon nach einer 5minütigen HDL-Inkubation sind Endosomen zu detektieren, die ApoE und LRP1 als auch solche die ApoE und HDL enthalten. ApoE scheint demnach an HDL zu binden und das Recycling einzuleiten. Nach 15 Min sind die Kolokalisationen zwischen LRP1 und ApoE deutlich geringer, nach 30 Minuten sind fast nur Vesikel zu erkennen, die ApoE und HDL enthalten. Mit zunehmender HDL-Induktion scheint sich das ApoE von seinem Rezeptor zu entfernen und sich mit HDL zu verbinden. Man kann mit längerer HDL-Inkubation eine intrazelluläre Abnahme der ApoE-Konzentration beobachten, die durch die Sekretion in das Medium zu erklären ist.

In Abschnitt 4.2 wurde gezeigt, dass die intrazellulären Strukturen, in denen sich ApoE und LRP1 zusammen befinden, Frühe Endosomen sind (siehe auch Abb. 11). Um den Aufenthalt von ApoE und HDL beim HDL-induzierten Recycling zu charakterisieren, wurden HuH7 Zellen mit ApoE-TRL und HDL inkubiert und Frühe Endosomen mittels EEA1 detektiert (Abb. 16).

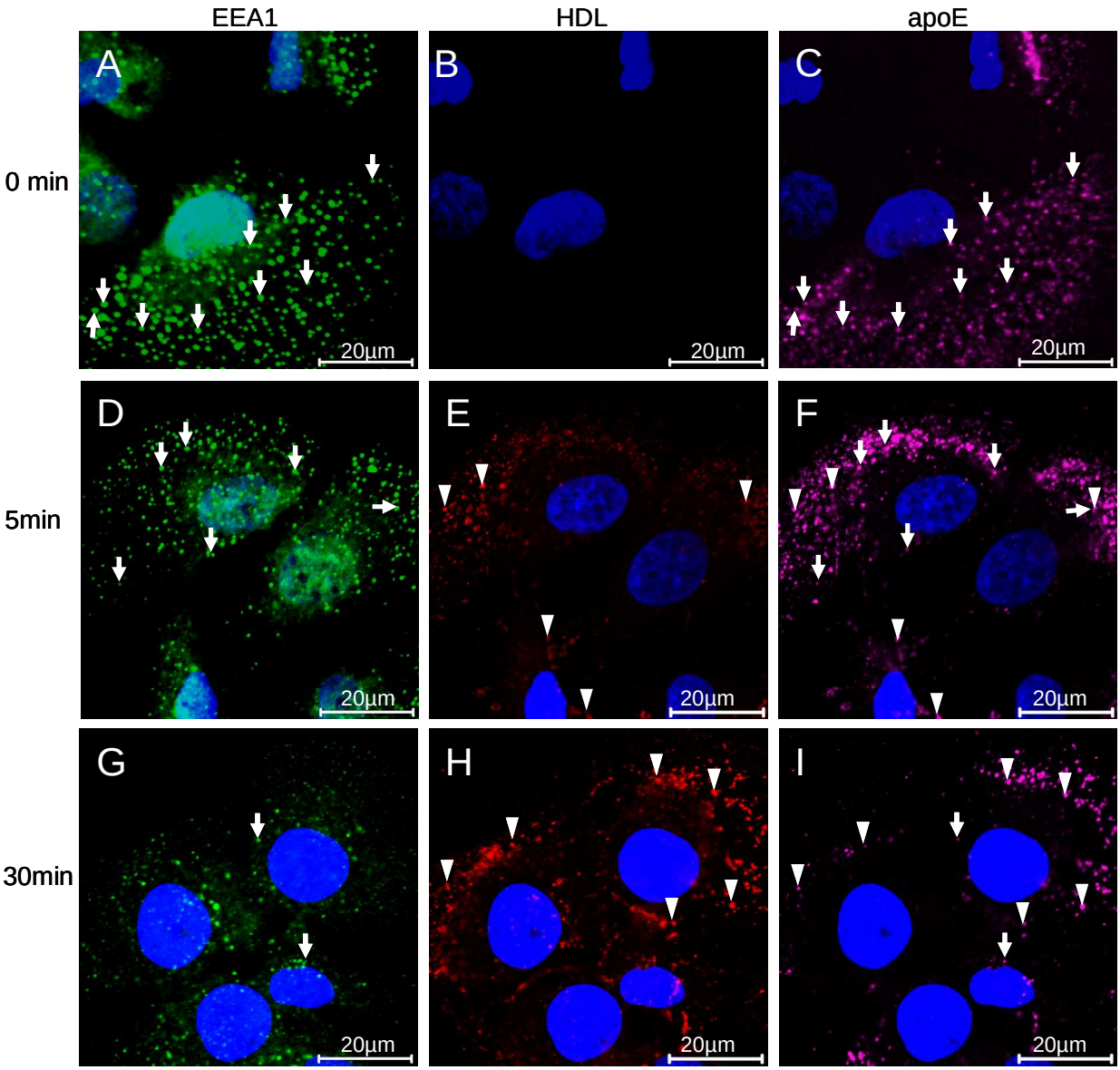

Abb. 16 A-I: Lokalisation von EEA1, Cy5-ApoE-TRL und HDL in intrazellulären Kompartimenten nach 0, 5 und 30 Minuten Inkubation mit HDL
Die in 6-Well-Platten auf Coverslips ausgesetzten HuH7-Zellen wurden nach 48 Stunden mit PBS und DMEM+BSA gewaschen und für 30 Minuten bei 37 Grad mit einer Cy5-ApoE-TRL-Lösung inkubiert. Nach erneuten Waschschritten mit PBS-Heparin und PBS folgte die Inkubation der HuH7 Zellen mit einer Cy3-apoE-freie-HDL-Lösung für jeweils 5,15 und 30 Minuten. Vor der 30minütigen Fixierung mit PFA waren erneute Waschschritte erforderlich. Die Coverslips wurden nun mit PBS gewaschen und mit dem ersten Antikörper (anti-EEA1) bei 37 Grad inkubiert. Nach der 45minutigen Zweitantikörperinkubation mit Anti-rabbit-Cy2 wurden die Coverslips in 0,1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Die Fluoreszenzen konnten dann im konfokalen Mikroskop bei entsprechender Wellenlänge erkannt und dargestellt werden. Die mit Pfeilen beispielhaft markierten Strukturen stellen kolokalisierende zytoplasmatische, EEA1und ApoE-TRL enthaltende Vesikel dar und die Pfeilspitzen zeigen auf kolokalisierende HDL und ApoE-TRL enthaltende Strukturen

In Abbildung 16 sieht man zum Zeitpunkt 0 Min eine Kolokalisation von ApoE und EEA1 wie in den vorigen Abschnitten beschrieben. Nach der HDL-Inkubation ist eine zunehmende Kolokalisation von HDL und ApoE zu beobachten und gleichzeitig eine

abnehmende Anzahl von Endosomen, die EEA1 und ApoE positiv sind. Schon nach 30 Minuten ist die Mehrzahl des ApoE nicht mehr in EEA1 positiven Strukturen sondern in HDL enthaltenden Endosomen nachweisbar. Dies lässt vermuten, dass ApoE zunehmend an HDL gebunden aus Frühen Endosomen austritt. Ferner befindet sich ApoE nach 15 und 30 Minuten in Plasmamembran-nahen Vesikeln. Gleiches gilt für HDL. Viele dieser Vesikel kolokalisieren, was einer Bewegung der ApoE-HDL-Vesikel in Richtung Zellmembran im Rahmen des Recyclings nahelegt.

Um zu überprüfen, ob LRP1 für das ApoE-Recycling unter physiologischen Bedingungen notwendig ist, wurden Experimente in primären Hepatozyten durchgeführt, die kein LRP1 exprimieren. Es ist bekannt, dass ein konventionelles knockout-Modell des LRP1-Gens nicht mit einer normalen embryologischen Entwicklung vereinbar ist (Herz et al., 1992). Daher wurden nach einer adenoviralen Infektion mit dem *Cre-Rekombinase*-Gen Hepatozyten aus $LRP1^{flox/flox}$ Mäusen präpariert. Hierdurch wird, wie von Rohlmann beschrieben, das LRP1-Gen in der Leber funktionell ausgeschaltet (Rohlmann et al., 1998). Zur Kontrolle wurden hier Hepatozyten verwendet, die mit dem Markergen *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) transfiziert wurden.
Die Expression von LRP1 wurde durch Western Blotting des Zellproteins und anschließende Detektion der Rezeptorproteine mit spezifischen Antikörpern verifiziert. Die Aufnahmen nach der Entwicklung des Röntgenfilms sind in Abbildung 19A zu sehen.
Zusätzlich wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt, um den Erfolg des Ausschaltens von LRP1 in diesem Modell zu zeigen und Bilder mit dem konfokalen Mikroskop angefertigt (Abb. 17B, C).

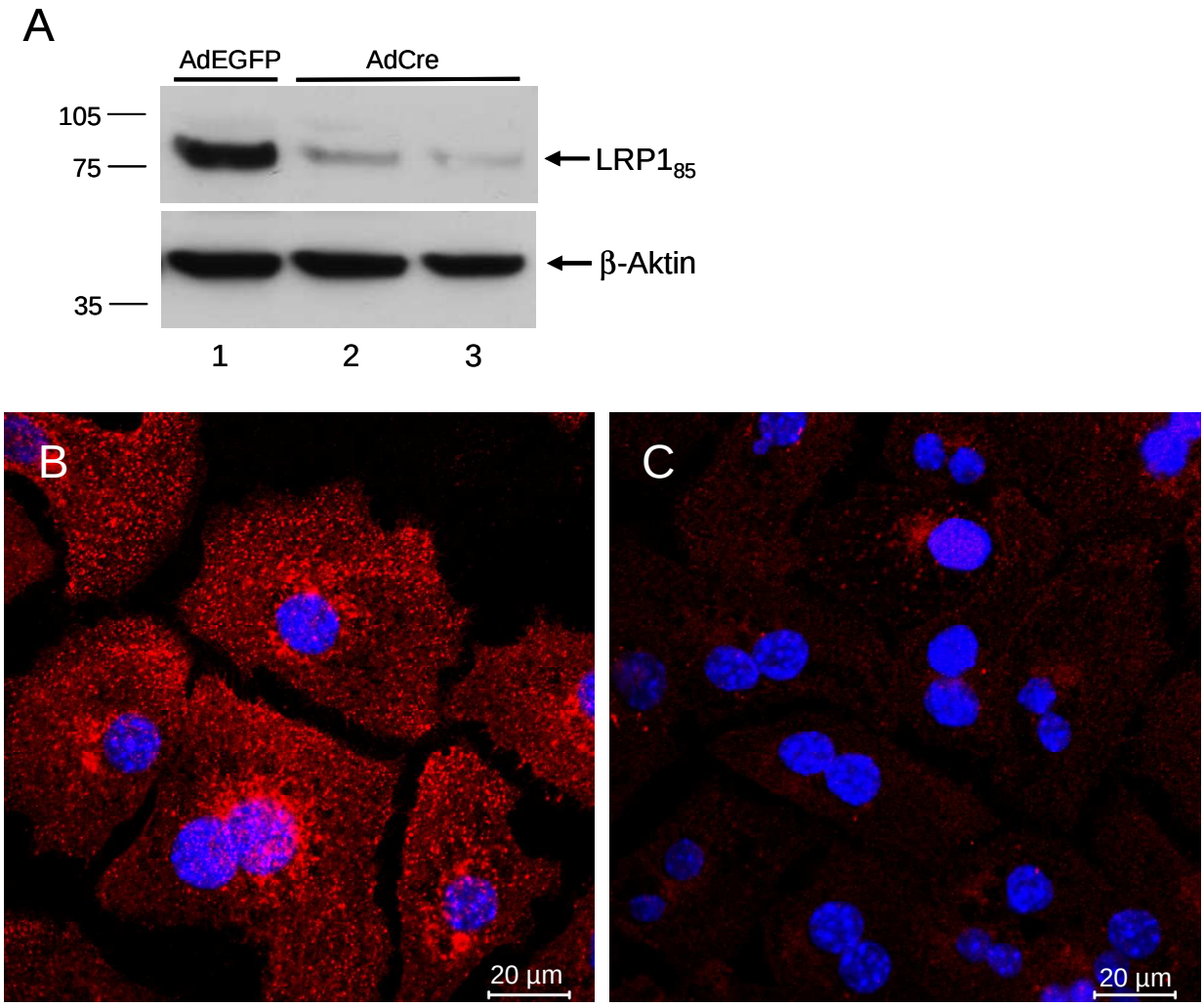

Abb. 17 LRP1 Expression in primären Hepatozyten nach AdEGFP und AdCre Infektion
Abb. 17A: Western Blot mit Antikörper gegen die ß-Untereinheit von LRP1. Primäre murine Hepatozyten wurden auf 6-Well-Plates für ein Experiment ausgesetzt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und nach einer Proteinbestimmung und einen SDS-Page, wurde das Gel über Nacht mit einem ersten Antikörper aus dem Schaf, der gegen die 85 kDa große ß-Untereinheit von LRP1 gerichtet ist. Anschließende Inkubation mit einem zweiten Antikörper erlaubt mittels ECL-Lösung und Entwicklung das Sichtbarmachen der Untereinheit. In den Proben 1 bis 3 wurde endogenes LRP1 bei EGFP-infizierten (1) und bei AdCre infizierten (2 und 3) Hepatozyten detektiert. Es sind Banden bei 85kDa zu erkennen. Die Detektion von □-Actin zeigt die gleichmäßige Beladung.
Abb. 17 B,C: Immunfluoreszenz von primären murinen Hepatozyten. Hepatozyten wurden in 6-Well-Platten auf Coverslips ausgesetzt und im folgenden Tag nach Waschschritte mit PBS in PFA fixiert. Anschließend erneut mit PBS gewaschen und in Blockinglösung blockiert. Es folgte die einstündige Erstantikörperinkubation mit anti-LRP377. Vor der 45minütigen Zweitantikörperinkubation mit anti-rabbit-Cy3 waren erneute Waschschritte nötig. Zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes wurden die Coverslips nun in 0.1% PPD in Mowiol eingebettet und auf einem Objektträger luftdicht umrandet. Mit Hilfe der konfokaler Mikroskopie wurden in AdEGFP-infizierten Zellen LRP1 positive Endosomen (B) detektiert, während in AdCre infizierten Hepatozyten keine oder nur eine schwache LRP1-Färbung zu sehen ist.

Im Western Blot sieht man in den Kontrollansätzen eine deutliche Expression der kleinen Untereinheit des LRP1 Rezeptors. Verglichen dazu sind die Banden der AdCre-infizierten Hepatozyten stark vermindert, was zeigt, dass die *Cre*-Expression

zur Deletion des *LRP1*-Gens führt und folglich keine LRP1-Expression ermöglicht. In den Konfokalbildern nach Immunfluoreszenz sieht man den Unterschied anhand der Detektion von LRP1 in jenen primären Hepatozyten, die mit AdEGFP, im Vergleich zu denen, die mit AdCre infiziert wurden. In Abb. 19C sind in den meisten Hepatozyten keine LRP1-Vesikel sichtbar. Dies belegt erneut, dass eine Infektion von Hepatozyten mit AdCre eine LRP1-Defizienz erzeugt.

Um nun die Wechselwirkung von ApoE mit LRP1 und die Konsequenzen einer verminderten Expression von LRP1 für das ApoE-Recycling näher zu untersuchen, wurden primäre Hepatozyten mit und ohne vorangegangene AdCre Infektion nach einer Cy5-ApoE-TRL Aufnahme mit HDL inkubiert, um das ApoE-Recycling zu induzieren. Die Überstände wurden gesammelt und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe des Fluoreszenzscanners konnte das Cy5-ApoE in den Überständen detektiert und sichtbar gemacht werden. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 19.

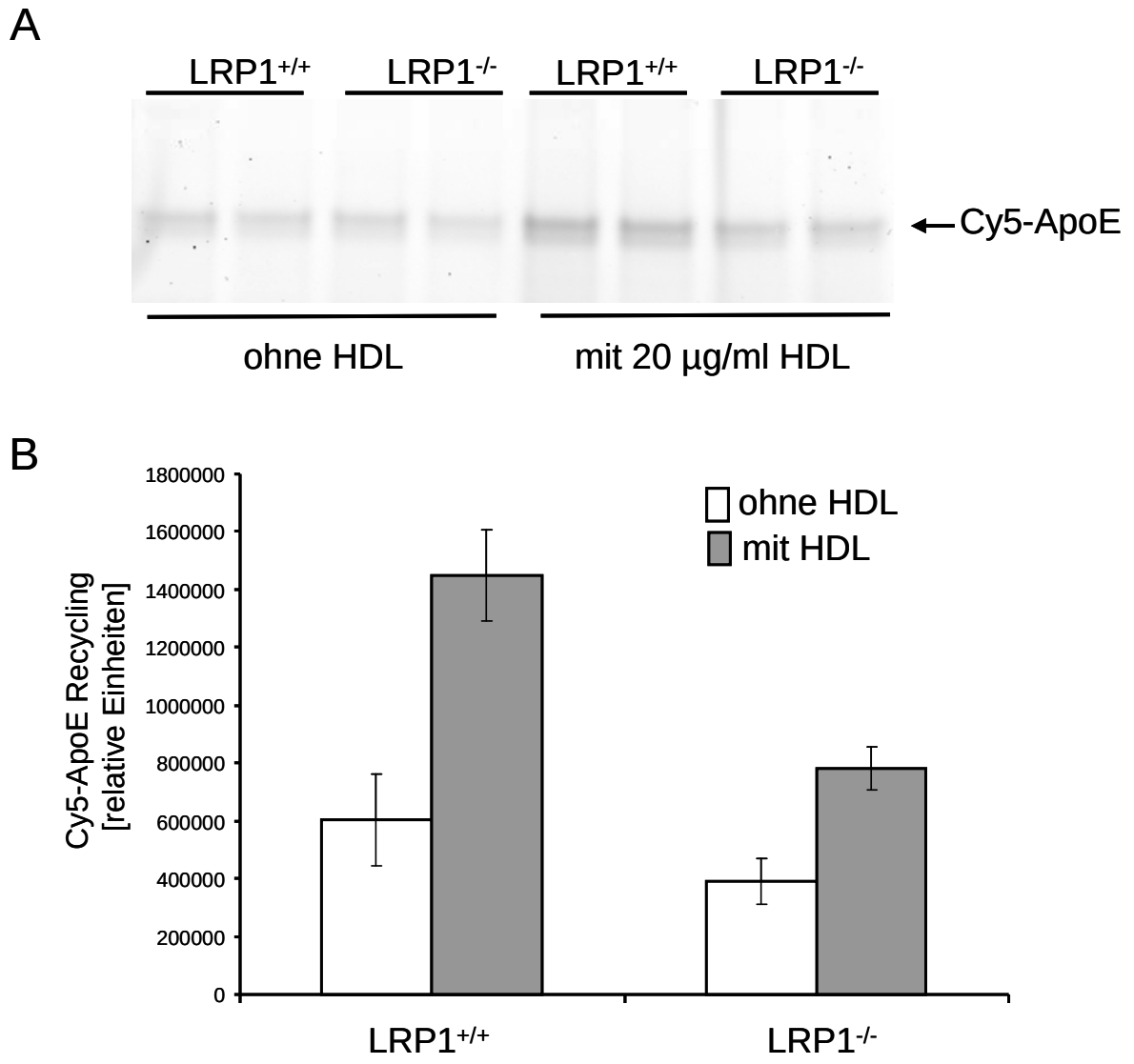

Abb. 18 A-B: HDL-induziertes-Recycling von Cy5-ApoE-TRL in Wildtyp- und LRP1-defizienten Hepatozyten.
Nach deren Infektion mit jeweils AdCre und AdEGFP, wurden die Hepatozyten auf 6-Well-Platten ausgesetzt und nach 24 Stunden mit DMEM gewaschen. Es folgte die 30minutige Inkubation mit der Cy5-ApoE-TRL-enthaltenden Aufnahmelösung bei 37 Grad. Anschließend wurden die Coverslips nach mehreren Waschschritten mit PBS und PBS/Heparin mit der Recyclinglösung (HDL in DMEM) für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Überreste mit einer Pipette abgenommen. Nach einer Zentrifugation bei 3000rpm, wurden 50 µl des Überstandes mit 50µl SDS/Bromphenolmischung versetzt. Jeweils 25 µl der Proben wurden auf einen 4-12% Gradientengel aufgetragen. Die Proteine trennen sich nach Größe und mit Hilfe des Fluoreszenzscanners konnte Cy5-ApoE-TRL sichtbar gemacht werden (A). B zeigt die Quantifizierung des ApoE-Recyclings.

In der Gel-Fluoreszenzdetektion erkennt man einerseits, dass die Menge an ApoE in den Überständen nach HDL–Inkubation größer ist als ohne die Stimulation des ApoE-Recyclings durch HDL. Dieser Effekt ist nach der Quantifizierung in Abbildung 18B deutlicher zu sehen. Es wird sowohl bei Wildtyp-Hepatozyten als auch bei LRP1-defizienten Zellen mehr ApoE im Medium nach HDL-Gabe detektiert. Im vorliegenden Experiment erkennt man auch anhand des Vergleiches der Mengen

des recycled ApoE nach HDL-Induktion, dass zwischen den Wildtyp und den LRP1-defizienten Hepatozyten ein Unterschied besteht. Im Vergleich zu den LRP1-defizienten Hepatozyten führt die HDL-Inkubation in den Wildtyp-Hepatozyten zu einem effizienteren ApoE-Recycling. Das lässt vermuten, dass ein Verlust der Funktion von LRP1 mit einem verminderten ApoE-Recycling einhergeht. Durch die Quantifizierung der Banden in Abbildung 20B wird die Signifikanz des Unterschiedes deutlicher.

Zusammenfassend wurde mit den Ergebnissen in Abschnitt 4.3 das ApoE-Recycling mit Hilfe der Konfokalmikroskopie visualisiert und die herausragende Bedeutung von LRP1 belegt. HDL kann das ApoE-Recycling stimulieren und ist auch intrazellulär zu finden. ApoE befindet sich nach seiner Aufnahme über LRP1 zunächst mit seinem Rezeptor in den gleichen Vesikeln, die EEA1 positiv sind und Frühen Endosomen entsprechen. Nach Gabe von HDL erkennt man eine Bewegung der ApoE-Partikel im Sinne eines Recyclings von perinukleären Endosomen zu HDL-positiven Endosomen. In primären LRP1-defizienten Hepatozyten findet sich eine signifikante Reduktion des ApoE-Recyclings im Vergleich zum Wildtyp,

5 Diskussion

TRL werden im Rahmen des Stoffwechsels von der Leber aufgenommen. Diese Aufnahme findet mit Hilfe von ApoE, LPL und über die Lipoproteinrezeptoren statt. Für die Aufnahme der TRL sind hauptsächlich der LDL-Rezeptor und LRP1 zuständig (Rohlmann et al., 1998). Nach der Aufnahme durch Hepatozyten folgen die Bestandteile von TRL unterschiedlichen Wegen (Heeren et al., 2006). Obwohl ApoB und der größte Teil der Kernlipide zu Lysosomen geführt und dort abgebaut werden, folgen ApoE, LPL und ApoC einem Recyclingweg und werden zur Plasmamembran zurückttransportiert (Heeren et al., 1999, Rensen et al., 2000, Heeren et al., 2003). Inwiefern diese Rezeptoren aber auch das Recycling selbst und insbesondere das Recycling von ApoE beeinflussen, ist noch nicht abschließend geklärt worden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Bedeutung von LRP1 für das ApoE-Recycling untersucht.

Im Gegensatz zum LDL-Rezeptor, der primär in *Clathrin Coated Pits* der Zellmembran zu finden ist, gibt es einige Hinweise, dass LRP1 zu einem großen Anteil in endosomalen Kompartimenten lokalisiert ist (Harasaki et al., 2005, Laatsch et al., 2009). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie zunächst die LRP1 Lokalisation in humanen Hepatomazellen charakterisiert. Bisher sind die LRP1-Kompartimente als kleine, punktförmige Signale in fixierten Zellen beschrieben (Llorente-Cortes et al., 2000, Newton et al., 2005). Unsere Experimente konnten diese Verteilung bestätigen (Abb. 5). Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich LRP1 in der Zellperipherie aber auch häufig in perinukleären Kompartimenten befindet. Es ist bekannt, dass LRP1 nach seiner Aufnahme nicht abgebaut, sondern wie der LDL-Rezeptor zurück zur Plasmamembran recycled wird, um weitere, potentiell atherogene TRL zu binden und aus dem Kreislauf zu entfernen (Lund et al., 1989). Welche Art von Vesikeln aber LRP1 nach seiner Aufnahme enthalten, war bisher unvollständig geklärt. Wie in Abbildung 5 zu erkennen, konnten wir zeigen, dass sich LRP1 in EEA1 positiven Vesikeln befindet, die Frühen Endosomen entsprechen (Christoforidis et al., 1999).

Frühe Endosomen unterscheiden sich von Recycling Endosomen, die bereits für den TRL-Cholesterin-Efflux und das ApoE-Recycling beschrieben wurden, anhand morphologischer Gesichtspunkte, dem Transport von Metaboliten und der räumlichen Aufteilung der Kompartimente in der Zelle. Für die Beziehungen

zwischen den Kompartimenten gibt es unterschiedliche Modelle. Einerseits werden Frühe- und Recycling Endosomen als getrennt voneinander bestehende Kompartimente gesehen (Klumperman, 2000, Pelletier et al., 2000), anderseits könnten Recycling Endosomen auch aus tubulären Ausläufern der Frühen Endosomen hervorgehen (Mellman, 1996). Das Vorkommen des Recycling-endosome-spezifischen Markers Rab11 in Frühen Endosomen scheint dieses Modell zu unterstützen. (Sonnichsen et al., 2000, Sheff et al., 2002). Es gibt aber auch Hinweise, dass das Recycling auch direkt über einen Recycling-Endosomen-unabhängigen Weg und zwar wie im Falle des Transferrins (Sheff et al., 2002) über Frühe Endosomen stattfindet.

Aufgrund der in Abbildung 5 gezeigten Kolokalisation mit EEA1 ist es wahrscheinlich, dass das LRP1-Recycling ebenso direkt über die Frühen Endosomen stattfindet und, wie in den Abbildungen 6 und 7 zu sehen, weder mit dem Golgi-System noch mit lysosomalen Strukturen in Verbindung steht. Allerdings wären weitere Kolokalisationsexperimente mit verschiedenen Markerproteinen der Recycling- und Frühen Endosomen notwendig, um diese Auffassung zu bestätigen.

Die Beziehung und Lokalisation von LRP1 im Vergleich zu ApoE nach seiner Aufnahme wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht. Für die Aufnahme der TRL durch Hepatozyten ist ApoE essentiell. TRL binden zusammen mit LPL an LRP1, (Beisiegel et al., 1991, Heeren et al., 2002, Zheng et al., 2006), was zur Endozytose dieser triglyzeridreichen Partikel führt. Danach erfolgt die beschriebene Trennung der TRL, wobei ApoE-haltige, peripher verbleibende '*Surface Remnants*' in Frühen Endosomen verbleiben (siehe Abb. 9 und auch (Heeren et al., 1999, Heeren et al., 2003). In der Abbildung 10 ist zu sehen, dass ApoE nach seiner Aufnahme mit LRP1 zunächst verbunden bleibt. Das zeigt, dass sich ApoE im Gegensatz zu anderen Liganden wie das RAP (Laatsch et al., 2004) nicht direkt von seinem Rezeptor trennt, was erstens auf einen anfänglich gemeinsamen intrazellulären Weg hindeutet und zweitens zeigt, dass LRP1 die Speicherung von ApoE in endosomalen Kompartimenten bewirkt.

Mit Hilfe von Pulse-Chase Experimenten in Fibroblasten zeigten Heeren et al. eine intrazelluläre Kolokalisation von ApoE und Cholesterin mit EEA1-positiven Strukturen (Heeren et al., 2003). Die Abbildung 11 zeigt, dass auch in Hepatomazellen ApoE zusammen mit LRP1 in EEA1-positiven Strukturen lokalisiert ist. Es liegt nahe, dass ApoE- und LRP1-Recycling bereits in Frühen Endosomen unabhängig vom Zelltyp

stattfinden, von denen sich, wie oben erwähnt, möglicherweise die Recycling Endosomen herleiten.

Weitere Experimente, die die Lokalisation des Golgi-Systems sichtbar machten, zeigten keine Kolokalisation mit ApoE oder LRP1. Weder ApoE noch LRP1 wurden während des Recyclings im Trans-Golgi Netzwerk nachweisbar (siehe Abb. 12). Über die Beteiligung des Golgi-Systems am ApoE-Recycling gibt es allerdings unterschiedliche Auffassungen. In Experimenten der Gruppe Swift et al. wurde aufgenommenes ApoE in isolierten Golgi-Fraktionen aus Mäuse-Lebern gefunden, was für Beteiligung vom Golgi-System beim ApoE-Recycling sprechen würde (Fazio et al., 1999, Swift et al., 2001). Fehlende Kolokalisation von ApoE und *Adaptor Protein 1* (AP1), einem weiteren Marker für das Golgi-System (Ahle et al., 1988, Heeren et al., 2003), wie auch die Erkenntnis, dass das ApoE-Recycling nicht von einem defekten Golgi-System kompromittiert wird (Farkas et al., 2004), legten allerdings nahe, dass das ApoE-Recycling nicht über das Golgi-System stattfindet. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Auffassung.

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten unterschiedliche Recycling-Wege für das ApoE sein. So könnte man vermuten, dass ein schneller Haupt-Recyclingweg über Frühe Endosomen stattfindet. Daneben könnte bei längerem intrazellulärem Aufenthalt von ApoE ein langsamerer Weg eine Rolle spielen, der über das Golgi-System vermittelt ist. Allerdings ist zu befürchten, dass die Studien in der Arbeitsgruppe Swift Kontaminationen von ApoE-enthaltenden Frühen Endosomen in ihren ersten Studien detektiert haben. Eine Beteiligung des Golgi-Apparates wurde durch ihre eigenen späteren Studien widerlegt.

Analysen mit lysosomalen Markerproteinen zeigten (siehe Abb. 13) eine fehlende Kolokalisation von ApoE und LRP1 mit Lysosomen, was die beschriebenen Erkenntnisse über das ApoE-Recycling stützt, wobei hier gezeigt werden konnte, dass LRP1 nicht in pre- und lysosomalen Kompartimenten an der Proteinsortierung beteiligt ist. Ein solcher Weg wurde für LRP2, einem endozytotisch wirksamen Lipoprotein Rezeptor mit sehr ähnlicher Struktur beschrieben (Czekay et al., 1997). Das ApoE-Recycling wird von HDL oder ApoAI induziert. HDL dient hierbei als extrazellulärer Akzeptor für ApoE (Heeren et al., 2003). Im dritten Teil dieser Arbeit wurde das HDL-induzierte-Recycling mittels konfokaler Mikroskopie visualisiert und die Bedeutung von LRP1 untersucht.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen erneut, wie in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt, dass ApoE über seinen Rezeptor LRP1 in die Zelle eintritt und zunächst im frühen endosomalen Kompartiment verbleibt. Bereits fünf Minuten nach der HDL-Inkubation zeigt sich eine Assoziation von ApoE mit HDL, welches in die Zelle aufgenommen wurde. ApoE kolokalisiert schon nach kurzer Zeit fast vollkommen mit HDL und entfernt sich von seinem Rezeptor und den Frühen Endosomen (siehe Abb. 16 und 17). Ob sich HDL in den Endosomen erst mit ApoE verbindet und schließlich als Komplex von den Frühen Endosomen trennt oder aber ApoE allein aus den Frühen Endosomen zu HDL transportiert wird, ist noch nicht abschließend geklärt worden.

Anfänglich wurde vermutet, dass HDL erst an der Plasmamembran ApoE aus der Zelle aufnimmt (Heeren et al., 2001). Folgende Arbeiten entdeckten ApoAI und seine Rezeptoren in intrazellulären Kompartimenten (Silver et al., 2001, Oram, 2002, Smith et al., 2002). Mittlerweile ist bekannt, dass HDL -induziertes ApoE-Recycling mit der Internalisierung von ApoAI und gesteigertem Cholesterinefflux einhergeht und dass ApoAI mit Cholesterin und ApoE in Frühen Endosomen kolokalisiert und somit die Entstehung ApoE- und Cholesterin angereicherter HDL-Partikel vermittelt (Heeren et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Ansicht nachhaltig.

Die HDL und ApoE angereicherten Vesikel scheinen sich über die Zeit peripher zu sammeln. Dabei scheint die intrazelluläre ApoE-Konzentration abzunehmen, was auf eine Bewegung der ApoE-HDL Partikel nach extrazellulär im Sinne einer ApoE-Sezernierung schließen lässt. Ob LRP1 nach der Entfernung von ApoE in Frühen Endosomen verbleibt, ist unklar und müsste mit weiteren Experimenten untersucht werden. Es ist in jedem Fall denkbar, dass LRP1 über Frühe Endosomen nach der Aufnahme der TRL zur Plasmamembran zurückgeführt wird. Das Recycling über Frühe Endosomen wird auch durch die Ergebnisse neuerer Studien unterstützt, die zeigten, dass eine Sortierung von LRP1 abhängig von *Sorting Nexin 17* (Snx17) ist, das in Frühen Endosomen gefunden wird (Stockinger et al., 2002, van Kerkhof et al., 2005).

Welchen quantitaiven Einfluss LRP1 für das ApoE-Recycling hat, zeigt die Abbildung 18. Nach Ausschalten der LRP1-Expression in primären Maus-Hepatozyten mit Hilfe der Cre/Lox Systems (siehe Abb. 17), wurde das ApoE-Recycling dieser Zellen mit dem normaler Hepatozyten verglichen. LRP1-defiziente Hepatozyten re-sezernieren dabei signifikant weniger ApoE als die Wildtypzellen. In beiden Fällen war das ApoE-

Recycling durch HDL-Inkubation erhöht. Daraus lässt sich schließen, dass LRP1 einen großen Anteil an dem HDL-unabhängigen und insbesondere dem HDL-abhängigen ApoE-Recycling vermittelt. Außerdem kann HDL das ApoE-Recycling unabhängig von LRP1 vermitteln, wie die Ergebnisse in Abbildung 18B zeigen. Eine verminderte Aufnahme von ApoE durch eine verminderte Expression von LRP1 ist wenig wahrscheinlich, da der LDL-Rezeptor nicht ausgeschaltet worden ist und die Aufnahme von ApoE kompensieren kann.

Die Abnahme des ApoE-Recycling durch die LRP1-Defizienz scheint komplementär zu neueren Ergebnissen der Gruppe Farkas et. al zu sein. In primären Hepatozyten konnten sie keinen signifikanten Unterschied in Zellen mit reduzierter LRP1-Expression und Kontrollzellen zeigen (Farkas et al., 2004). Die ließe sich eventuell dadurch erklären, dass bei den verwendeten RAP-defizienten Hepatozyten mit ca. 75%iger Reduktion in der LRP1-Expression, während bei den LRP1-defizienten Hepatozyten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, die LRP1-Expression nicht nachweisbar ist. LRP1 könnte also auch noch bei sehr geringer Expression seine Rolle erfüllen und nur im Falle einer kompletten Defizienz zur Abnahme des ApoE-Recycling führen.

Mit den Daten der vorliegenden Arbeit und vor dem Hintergrung des HDL-induzierten ApoE-Recyclings (Heeren et al., 2003) könnte man der physiologischen Bedeutung von LRP1 im ApoE-Recycling näher kommen. Es ist denkbar, dass dieser Weg ein Teil des Kreislaufes ist, dessen erster Teil der schon früh beschriebene intravaskuläre ApoE-Transfer von HDL zu TRL(Imaizumi et al., 1978, van't Hooft und Havel, 1981). In der postprandialen Phase ist die Clearance der atherogenen TRL (Mahley et al., 1991, Mahley et al., 1995) aus dem Blutkreislauf sehr wichtig, um das Risiko einer Atherosklerose zu mindern. Wenn der ApoE-Bestand der Zelle erschöpft ist, und überdies eine Neubildung von ApoE zu viel Zeit in Anspruch nehmen würde, wäre das ApoE Recycling ein idealer und schneller Weg, um neues ApoE bereitzustellen. Das recycled ApoE wird dann von der Zelle an HDL abgegeben, von wo aus es für einen erneuten Aufnahmezyklus der CR zur Verfügung steht. Dieses Recycling geht dann so lange weiter, bis keine CR mehr aufgenommen werden müssen und die postprandiale Phase beendet ist.

Es konnte auch gezeigt werden, dass durch HDL-Induktion das Entfernen von ApoE aus den LRP1 positiven Vesikeln und seine Re-Assoziation mit HDL bereits in den Frühen Endosomen unmittelbar nach seiner Endozytose stattfindet. LRP1 befindet

sich auch in den Frühen Endosomen und wird vermutlich über diese zur Plasmamembran zurückgeführt. Diese Zusammenhänge könnten die Voraussetzung für die mechanistisch noch immer unverstandene hohe Geschwindigkeit der Aufnahme der äußerst atherogenen TRL aus dem Plasma sein.

Es ist etabliert, dass LRP1 zusammen mit LDL-Rezeptor essentiell für die Aufnahme der TRL ist (Rohlmann et al., 1998). Allerdings gehen die Meinungen über die Beteiligung der Rezeptoren am ApoE-Recycling auseinander. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Ansicht, dass LRP1 signifikant am ApoE-Recycling beteiligt ist (Fazio et al., 1999, Heeren et al., 2001, Heeren et al., 2003). Es bleibt allerdings offen, ob der LDL-Rezeptor ebenso wichtig oder wichtiger ist (Rensen et al., 2000). Viele Autoren geben beiden Rezeptoren eine wichtige Rolle, die aber auch aufgrund der möglichen Beteiligung mehrerer intrazellulären Recycling-Wege (Farkas et al., 2004) noch nicht eindeutig zu klären ist.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die zelluläre Lokalisation vom Lipoprotein Rezeptor LRP1 in humanen Leberzellen zu charakterisieren und die Bedeutung von hepatischem LRP1 beim HDL-induzierten Recycling von ApoE zu untersuchen. Zur Analyse der zellulären Lokalisation des Rezeptors und der Kolokalisation mit verschiedenen Markern endosomaler Kompartimente wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz und konfokaler Laserscanningmikroskopie angewandt. Nach der Inkubation mit direkt Fluoreszenz-markierten ApoE-gekoppelten Triglyceridreichen Lipoproteinremnants und *High-Density Lipoproteins* (HDL) wurden die Wechselwirkungen von ApoE, LRP1 und HDL beim ApoE-Recycling untersucht. Um quantitativ die Bedeutung von LRP1 beim ApoE-Recycling zu untersuchen, wurden *Pulse-Chase* Experimente mit primären LRP1- defizienten murinen Hepatozyten durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich LRP1 vor und nach der Aufnahme von ApoE weder im Golgi-System noch in den Lysosomen befindet, sondern in EEA1-positiven Frühen Endosomen. Im Verlauf der Endozytose wurde eine Akkumulation von ApoE in LRP1-positiven, Frühen Endosomen beobachtet. Sowohl ApoE als auch LRP1 wurden während der intrazellulären Sortierung weder im Golgi-System noch in lysosomalen Kompartimenten detektiert. Die kinetische Analyse der gleichzeitigen ApoE, LRP1 und HDL Lokalisation während des HDL-induzierten ApoE-Recyclings zeigte, dass die HDL-Stimulation die Freisetzung von ApoE aus dem LRP1-Kompartiment induziert und zu einer intrazellulären Assoziation von ApoE mit HDL führt. Pulse-Experimente in LRP1-defizienten Hepatozyten unterstützten die Hypothese, dass LRP1 für das ApoE-Recycling auch quantitativ eine bedeutende Rolle spielt. Zusammenfassend konnten diese Experimente zeigen, dass LRP1 nicht nur bei der Aufnahme sondern auch beim ApoE-Recycling eine wichtige Rolle spielt. Klinisch könnte dies von Bedeutung sein, da ein reduziertes ApoE-Recycling eine Akkumulation von Remnant-Lipoproteinen verursachen könnte, da in diesem Fall der ApoE-Plasmapool insbesondere in der postprandialen Stoffwechselsituation schnell erschöpft sein würde.

7 Literaturverzeichnis

Abedi, H. and Zachary, I., 1995. Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. Cardiovasc Res. 30, 544-556.

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. and Krieger, M., 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science. 271, 518-520.

Ahle, S., Mann, A., Eichelsbacher, U. and Ungewickell, E., 1988. Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. Embo J. 7, 919-929.

Altmann, S. W., Davis, H. R., Jr., Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N. and Graziano, M. P., 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. Science. 303, 1201-1204.

Bacskai, B. J., Xia, M. Q., Strickland, D. K., Rebeck, G. W. and Hyman, B. T., 2000. The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 11551-11556.

Beffert, U., Stolt, P. C. and Herz, J., 2004. Functions of lipoprotein receptors in neurons. J Lipid Res. 45, 403-409.

Beisiegel, U., 1995. Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. Curr Opin Lipidol. 6, 117-122.

Beisiegel, U., Schneider, W. J., Brown, M. S. and Goldstein, J. L., 1982. Immunoblot analysis of low density lipoprotein receptors in fibroblasts from subjects with familial hypercholesterolemia. J Biol Chem. 257, 13150-13156.

Beisiegel, U., Weber, W. and Bengtsson-Olivecrona, G., 1991. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 88, 8342-8346.

Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. and Stanley, K. K., 1989. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. Nature. 341, 162-164.

Boucher, P. and Gotthardt, M., 2004. LRP and PDGF signaling: a pathway to atherosclerosis. Trends Cardiovasc Med. 14, 55-60.

Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W. P., Anderson, R. G. and Herz, J., 2003. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. Science. 300, 329-332.

Boucher, P., Liu, P., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Anderson, R. G. and Herz, J., 2002. Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low Density lipoprotein receptor-related protein in caveolae. J Biol Chem. 277, 15507-15513.

Braun, N. A., Mohler, P. J., Weisgraber, K. H., Hasty, A. H., Linton, M. F., Yancey, P. G., Su, Y. R., Fazio, S. and Swift, L. L., 2006. Intracellular trafficking of recycling apolipoprotein E in Chinese hamster ovary cells. J Lipid Res. 47, 1176-1186.

Breckenridge, W. C., Little, J. A., Steiner, G., Chow, A. and Poapst, M., 1978. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. N Engl J Med. 298, 1265-1273.

Brown, M. S. and Goldstein, J. L., 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science. 232, 34-47.

Brundert, M., Ewert, A., Heeren, J., Behrendt, B., Ramakrishnan, R., Greten, H., Merkel, M. and Rinninger, F., 2005. Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25, 143-148.

Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D. and Zerial, M., 1999. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. Nature. 397, 621-625.

Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L. and Pericak-Vance, M. A., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science. 261, 921-923.

Chen, C.-M., Al-Haideri, M., Presley, J. F., Maxfield, F. R., Vogel, T., Galeano, N. F., Sturley, S. L., and Deckelbaum, R. J. (1995) Circulation 92, (suppl.)I-691

Cullen, P., Cignarella, A., Brennhausen, B., Mohr, S., Assmann, G. and von Eckardstein, A., 1998. Phenotype-dependent differences in apolipoprotein E metabolism and in cholesterol homeostasis in human monocyte-derived macrophages. J Clin Invest. 101, 1670-1677.

Czekay, R. P., Orlando, R. A., Woodward, L., Lundstrom, M. and Farquhar, M. G., 1997. Endocytic trafficking of megalin/RAP complexes: dissociation of the complexes in late endosomes. Mol Biol Cell. 8, 517-532.

Eccles, S. A., Box, G. M., Court, W. J., Bone, E. A., Thomas, W. and Brown, P. D., 1996. Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94). Cancer Res. 56, 2815-2822.

Elshourbagy, N. A., Liao, W. S., Mahley, R. W. and Taylor, J. M., 1985. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 203-207.

Eskelinen, E. L., Tanaka, Y. and Saftig, P., 2003. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. Trends Cell Biol. 13, 137-145.

Farkas, M. H., Swift, L. L., Hasty, A. H., Linton, M. F. and Fazio, S., 2003. The recycling of apolipoprotein E in primary cultures of mouse hepatocytes. Evidence for a physiologic connection to high density lipoprotein metabolism. J Biol Chem. 278, 9412-9417.

Farkas, M. H., Weisgraber, K. H., Shepherd, V. L., Linton, M. F., Fazio, S. and Swift, L. L., 2004. The recycling of apolipoprotein E and its amino-terminal 22 kDa fragment: evidence for multiple redundant pathways. J Lipid Res. 45, 1546-1554.

Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., Myers, R. H., Pericak-Vance, M. A., Risch, N. and van Duijn, C. M., 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. Jama. 278, 1349-1356.

Fazio, S., Linton, M. F., Hasty, A. H. and Swift, L. L., 1999. Recycling of apolipoprotein E in mouse liver. J Biol Chem. 274, 8247-8253.

Fidge, N. H., 1999. High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. J Lipid Res. 40, 187-201.

Fielding, C. J. and Fielding, P. E., 2001a. Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. Adv Drug Deliv Rev. 49, 251-264.

Fielding, C. J. and Fielding, P. E., 2001b. Cellular cholesterol efflux. Biochim Biophys Acta. 1533, 175-189.

Fuki, I. V., Kuhn, K. M., Lomazov, I. R., Rothman, V. L., Tuszynski, G. P., Iozzo, R. V., Swenson, T. L., Fisher, E. A. and Williams, K. J., 1997. The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro. J Clin Invest. 100, 1611-1622.

Gandy, S., 2005. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. J Clin Invest. 115, 1121-1129.

Gaw, A., Packard, C. J., Lindsay, G. M., Griffin, B. A., Caslake, M. J., Lorimer, A. R. and Shepherd, J., 1995. Overproduction of small very low density lipoproteins (Sf 20-60) in moderate hypercholesterolemia: relationships between apolipoprotein B kinetics and plasma lipoproteins. J Lipid Res. 36, 158-171.

Gelissen, I. C., Harris, M., Rye, K. A., Quinn, C., Brown, A. J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L. and Jessup, W., 2006. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26, 534-540.

Goldberg, I., 1996. Lipid metabolism. Curr Opin Lipidol. 7, U184-192.

Goldstein, J. L. and Brown, M. S., 2001. Molecular medicine. The cholesterol quartet. Science. 292, 1310-1312.

Gotthardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M. F., Shelton, J., Richardson, J. A., Stockinger, W., Nimpf, J. and Herz, J., 2000. Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. J Biol Chem. 275, 25616-25624.

Harasaki, K., Lubben, N. B., Harbour, M., Taylor, M. J. and Robinson, M. S., 2005. Sorting of major cargo glycoproteins into clathrin-coated vesicles. Traffic. 6, 1014-1026.

Hasty, A. H., Linton, M. F., Brandt, S. J., Babaev, V. R., Gleaves, L. A. and Fazio, S., 1999. Retroviral gene therapy in ApoE-deficient mice: ApoE expression in the artery wall reduces early foam cell lesion formation. Circulation. 99, 2571-2576.

Hasty, A. H., Plummer, M. R., Weisgraber, K. H., Linton, M. F., Fazio, S. and Swift, L. L., 2005. The recycling of apolipoprotein E in macrophages: influence of HDL and apolipoprotein A-I. J Lipid Res. 46, 1433-1439.

Hatters, D. M., Peters-Libeu, C. A. and Weisgraber, K. H., 2006. Apolipoprotein E structure: insights into function. Trends Biochem Sci. 31, 445-454.

Havel, R. J., Fielding, C. J., Olivecrona, T., Shore, V. G., Fielding, P. E. and Egelrud, T., 1973. Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoproteins lipase from different sources. Biochemistry. 12, 1828-1833.

Havel RJ, Kane JP. Introduction: structure and metabolism of plasmalipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill;1995:1841-1851.

Heeren, J. and Beisiegel, U., 2001. Intracellular metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. Curr Opin Lipidol. 12, 255-260.

Heeren, J., Beisiegel, U. and Grewal, T., 2006. Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26, 442-448.

Heeren, J., Grewal, T., Jackle, S. and Beisiegel, U., 2001. Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. J Biol Chem. 276, 42333-42338.

Heeren, J., Grewal, T., Laatsch, A., Becker, N., Rinninger, F., Rye, K. A. and Beisiegel, U., 2004. Impaired recycling of apolipoprotein E4 is associated with intracellular cholesterol accumulation. J Biol Chem. 279, 55483-55492.

Heeren, J., Grewal, T., Laatsch, A., Rottke, D., Rinninger, F., Enrich, C. and Beisiegel, U., 2003. Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. J Biol Chem. 278, 14370-14378.

Heeren, J., Niemeier, A., Merkel, M. and Beisiegel, U., 2002. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. J Mol Med. 80, 576-584.

Heeren, J., Weber, W. and Beisiegel, U., 1999. Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. J Cell Sci. 112 (Pt 3), 349-359.

Hellstrom, M., Kalen, M., Lindahl, P., Abramsson, A. and Betsholtz, C., 1999. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. Development. 126, 3047-3055.

Herz, J. and Beffert, U., 2000. Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci. 1, 51-58.

Herz, J., Clouthier, D. E. and Hammer, R. E., 1992. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. Cell. 71, 411-421.

Herz, J., Goldstein, J. L., Strickland, D. K., Ho, Y. K. and Brown, M. S., 1991. 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. J Biol Chem. 266, 21232-21238.

Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H. and Stanley, K. K., 1988. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. Embo J. 7, 4119-4127.

Herz, J. and Hui, D. Y., 2004. Lipoprotein receptors in the vascular wall. Curr Opin Lipidol. 15, 175-181.

Herz, J., Kowal, R. C., Goldstein, J. L. and Brown, M. S., 1990. Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. Embo J. 9, 1769-1776.

Herz, J. and Strickland, D. K., 2001. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. J Clin Invest. 108, 779-784.

Hofer, F., Gruenberger, M., Kowalski, H., Machat, H., Huettinger, M., Kuechler, E. and Blaas, D., 1994. Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 91, 1839-1842.

Huang, Y., Liu, X. Q., Rall, S. C., Jr., Taylor, J. M., von Eckardstein, A., Assmann, G. and Mahley, R. W., 1998. Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia. J Biol Chem. 273, 26388-26393.

Huang, Y., Liu, X. Q., Wyss-Coray, T., Brecht, W. J., Sanan, D. A. and Mahley, R. W., 2001. Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 98, 8838-8843.

Huang, Y., von Eckardstein, A., Wu, S., Maeda, N. and Assmann, G., 1994. A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with gamma mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 91, 1834-1838.

Husemann, J. and Silverstein, S. C., 2001. Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain. Am J Pathol. 158, 825-832.

Imaizumi, K., Fainaru, M. and Havel, R. J., 1978. Composition of proteins of mesenteric lymph chylomicrons in the rat and alterations produced upon exposure of chylomicrons to blood serum and serum proteins. J Lipid Res. 19, 712-722.

Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E. and Herz, J., 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. J Clin Invest. 92, 883-893.

Ishibashi, S., Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J. L. and Brown, M. S., 1994. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 91, 4431-4435.

Ji, Z. S., Fazio, S. and Mahley, R. W., 1994. Variable heparan sulfate proteoglycan binding of apolipoprotein E variants may modulate the expression of type III hyperlipoproteinemia. J Biol Chem. 269, 13421-13428.

Kancha, R. K., Stearns, M. E. and Hussain, M. M., 1994. Decreased expression of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in invasive cell clones derived from human prostate and breast tumor cells. Oncol Res. 6, 365-372.

Keen, J. H. and Beck, K. A., 1989. Identification of the clathrin-binding domain of assembly protein AP-2. Biochem Biophys Res Commun. 158, 17-23.

Kim, D. H., Iijima, H., Goto, K., Sakai, J., Ishii, H., Kim, H. J., Suzuki, H., Kondo, H., Saeki, S. and Yamamoto, T., 1996. Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. J Biol Chem. 271, 8373-8380.

Kinoshita, A., Yamada, S., Haslam, S. M., Morris, H. R., Dell, A. and Sugahara, K., 2001. Isolation and structural determination of novel sulfated hexasaccharides from squid cartilage chondroitin sulfate E that exhibits neuroregulatory activities. Biochemistry. 40, 12654-12665.

Kirchhausen, T., 2000. Three ways to make a vesicle. Nat Rev Mol Cell Biol. 1, 187-198.

Klucken, J., Buchler, C., Orso, E., Kaminski, W. E., Porsch-Ozcurumez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., Allikmets, R. and Schmitz, G., 2000. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 817-822.

Klumperman, J., 2000. Transport between ER and Golgi. Curr Opin Cell Biol. 12, 445-449.

Kounnas, M. Z., Morris, R. E., Thompson, M. R., FitzGerald, D. J., Strickland, D. K. and Saelinger, C. B., 1992. The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. J Biol Chem. 267, 12420-12423.

Krapp, A., Ahle, S., Kersting, S., Hua, Y., Kneser, K., Nielsen, M., Gliemann, J. and Beisiegel, U., 1996. Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor-related protein (LRP). J Lipid Res. 37, 926-936.

Krieger, M., 1999. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. Annu Rev Biochem. 68, 523-558.

Krieger, M. and Herz, J., 1994. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). Annu Rev Biochem. 63, 601-637.

Kuipers, F., Jong, M. C., Lin, Y., Eck, M., Havinga, R., Bloks, V., Verkade, H. J., Hofker, M. H., Moshage, H., Berkel, T. J., Vonk, R. J. and Havekes, L. M., 1997. Impaired secretion of very low density lipoprotein-triglycerides by apolipoprotein E- deficient mouse hepatocytes. J Clin Invest. 100, 2915-2922.

Laatsch, A., Merkel, M., Talmud, P. J., Grewal, T., Beisiegel, U. and Heeren, J., 2009. Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. Atherosclerosis. 204, 105-111.

Laatsch, A., Ragozin, S., Grewal, T., Beisiegel, U. and Joerg, H., 2004. Differential RNA interference: replacement of endogenous with recombinant low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Eur J Cell Biol. 83, 113-120.

LaRosa, J. C., Levy, R. I., Herbert, P., Lux, S. E. and Fredrickson, D. S., 1970. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. Biochem Biophys Res Commun. 41, 57-62.

Lillis, A. P., Mikhailenko, I. and Strickland, D. K., 2005. Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. J Thromb Haemost. 3, 1884-1893.

Lin, C. Y., Duan, H. and Mazzone, T., 1999. Apolipoprotein E-dependent cholesterol efflux from macrophages: kinetic study and divergent mechanisms for endogenous versus exogenous apolipoprotein E. J Lipid Res. 40, 1618-1627.

Linton, M. F., Atkinson, J. B. and Fazio, S., 1995. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. Science. 267, 1034-1037.

Linton, M. F., Hasty, A. H., Babaev, V. R. and Fazio, S., 1998. Hepatic apo E expression is required for remnant lipoprotein clearance in the absence of the low density lipoprotein receptor. J Clin Invest. 101, 1726-1736.

Llorente-Cortes, V., Martinez-Gonzalez, J. and Badimon, L., 2000. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20, 1572-1579.

Loukinova, E., Ranganathan, S., Kuznetsov, S., Gorlatova, N., Migliorini, M. M., Loukinov, D., Ulery, P. G., Mikhailenko, I., Lawrence, D. A. and Strickland, D. K., 2002. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function betwenn LRP and the PDGF. J Biol Chem. 277, 15499-15506.

Luc, G., Bard, J. M., Arveiler, D., Evans, A., Cambou, J. P., Bingham, A., Amouyel, P., Schaffer, P., Ruidavets, J. B., Cambien, F. and et al., 1994. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. Arterioscler Thromb. 14, 1412-1419.

Lucas, M. and Mazzone, T., 1996. Cell surface proteoglycans modulate net synthesis and secretion of macrophage apolipoprotein E. J Biol Chem. 271, 13454-13460.

Lund, H., Takahashi, K., Hamilton, R. L. and Havel, R. J., 1989. Lipoprotein binding and endosomal itinerary of the low density lipoprotein receptor-related protein in rat liver. Proc Natl Acad Sci U S A. 86, 9318-9322.

Mahley, R. W., 1996. Heparan sulfate proteoglycan/low density lipoprotein receptor-related protein pathway involved in type III hyperlipoproteinemia and Alzheimer's disease. Isr J Med Sci. 32, 414-429.

Mahley, R. W. and Ji, Z. S., 1999. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. J Lipid Res. 40, 1-16.

Mahley, R. W., Palaoglu, K. E., Atak, Z., Dawson-Pepin, J., Langlois, A. M., Cheung, V., Onat, H., Fulks, P., Mahley, L. L., Vakar, F. and et al., 1995. Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. J Lipid Res. 36, 839-859.

Mahley, R. W. and Rall, S. C., Jr., 2000. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. Annu Rev Genomics Hum Genet. 1, 507-537.

Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., Hussain, M. M., Greenman, B., Fisher, M., Vogel, T. and Gorecki, M., 1989. Intravenous infusion of apolipoprotein E accelerates clearance of plasma lipoproteins in rabbits. J Clin Invest. 83, 2125-2130.

Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L. and Rall, S. C., Jr., 1991. Genetic defects in lipoprotein metabolism. Elevation of atherogenic lipoproteins caused by impaired catabolism. Jama. 265, 78-83.

May, P., 2006. [Novel lipoprotein receptor functions]. Dtsch Med Wochenschr. 131, 1328-1331.

May, P., Herz, J. and Bock, H. H., 2005. Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. Cell Mol Life Sci. 62, 2325-2338.

May, P., Rohlmann, A., Bock, H. H., Zurhove, K., Marth, J. D., Schomburg, E. D., Noebels, J. L., Beffert, U., Sweatt, J. D., Weeber, E. J. and Herz, J., 2004. Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. Mol Cell Biol. 24, 8872-8883.

Mellman, I., 1996. Endocytosis and molecular sorting. Annu Rev Cell Dev Biol. 12, 575-625.

Merkel, M. and Heeren, J., 2005. Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! J Clin Invest. 115, 2694-2696.

Moestrup, S. K. and Gliemann, J., 1991. Analysis of ligand recognition by the purified alpha 2-macroglobulin receptor (low density lipoprotein receptor-related protein). Evidence that high affinity of alpha 2-macroglobulin-proteinase complex is achieved by binding to adjacent receptors. J Biol Chem. 266, 14011-14017.

Moestrup, S. K., Gliemann, J. and Pallesen, G., 1992. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. Cell Tissue Res. 269, 375-382.

Morrow, J. A., Segall, M. L., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Knapp, M., Rupp, B. and Weisgraber, K. H., 2000. Differences in stability among the human apolipoprotein E isoforms determined by the amino-terminal domain. Biochemistry. 39, 11657-11666.

Mulder, M., Lombardi, P., Jansen, H., van Berkel, T. J., Frants, R. R. and Havekes, L. M., 1993. Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoproteins that are bound to heparan sulfate proteoglycans via lipoprotein lipase. J Biol Chem. 268, 9369-9375.

Myers, J. N., Tabas, I., Jones, N. L. and Maxfield, F. R., 1993. Beta-very low density lipoprotein is sequestered in surface-connected tubules in mouse peritoneal macrophages. J Cell Biol. 123, 1389-1402.

Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. and Sato, J., 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. Cancer Res. 42, 3858-3863.

Nathan, B. P., Bellosta, S., Sanan, D. A., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W. and Pitas, R. E., 1994. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. Science. 264, 850-852.

Nelson, N., 1992. Structure and function of V-ATPases in endocytic and secretory organelles. J Exp Biol. 172, 149-153.

Newton, C. S., Loukinova, E., Mikhailenko, I., Ranganathan, S., Gao, Y., Haudenschild, C. and Strickland, D. K., 2005. Platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFR-beta) activation promotes its association with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for co-receptor function. J Biol Chem. 280, 27872-27878.

Oram, J. F., 2002. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. Curr Opin Lipidol. 13, 373-381.

Pearse, B. M., 1988. Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits. Embo J. 7, 3331-3336.

Pelletier, L., Jokitalo, E. and Warren, G., 2000. The effect of Golgi depletion on exocytic transport. Nat Cell Biol. 2, 840-846.

Pietrzik, C. U., Busse, T., Merriam, D. E., Weggen, S. and Koo, E. H., 2002. The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. Embo J. 21, 5691-5700.

Pietrzik, C. U., Yoon, I. S., Jaeger, S., Busse, T., Weggen, S. and Koo, E. H., 2004. FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. J Neurosci. 24, 4259-4265.

Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setala, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M. and Breslow, J. L., 1992. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. Cell. 71, 343-353.

Qiu, Z., Strickland, D. K., Hyman, B. T. and Rebeck, G. W., 2002. alpha 2-Macroglobulin exposure reduces calcium responses to N-methyl-D-aspartate via low density lipoprotein receptor-related protein in cultured hippocampal neurons. J Biol Chem. 277, 14458-14466.

Raychowdhury, R., Niles, J. L., McCluskey, R. T. and Smith, J. A., 1989. Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor. Science. 244, 1163-1165.

Rellin, L., Heeren, J. and Beisiegel, U., 2008. Recycling of apolipoprotein E is not associated with cholesterol efflux in neuronal cells. Biochim Biophys Acta. 1781, 232-238.

Rensen, P. C., Jong, M. C., van Vark, L. C., van der Boom, H., Hendriks, W. L., van Berkel, T. J., Biessen, E. A. and Havekes, L. M., 2000. Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis. J Biol Chem. 275, 8564-8571.

Rigotti, A., Trigatti, B., Babitt, J., Penman, M., Xu, S. and Krieger, M., 1997. Scavenger receptor BI--a cell surface receptor for high density lipoprotein. Curr Opin Lipidol. 8, 181-188.

Robinson, M. S., 1994. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. Curr Opin Cell Biol. 6, 538-544.

Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R. E. and Herz, J., 1998. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. J Clin Invest. 101, 689-695.

Roses, A. D., 1996. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. Annu Rev Med. 47, 387-400.

Rothman, J. E. and Schmid, S. L., 1986. Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. Cell. 46, 5-9.

Ruiz, J., Kouiavskaia, D., Migliorini, M., Robinson, S., Saenko, E. L., Gorlatova, N., Li, D., Lawrence, D., Hyman, B. T., Weisgraber, K. H. and Strickland, D. K., 2005. The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. J Lipid Res. 46, 1721-1731.

Russell, D. W., 2009. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. J Lipid Res. 50 Suppl, S120-125.

Schneider, W. J., Kovanen, P. T., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Utermann, G., Weber, W., Havel, R. J., Kotite, L., Kane, J. P., Innerarity, T. L. and Mahley, R. W., 1981. Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. J Clin Invest. 68, 1075-1085.

Schwiegelshohn, B., Presley, J. F., Gorecki, M., Vogel, T., Carpentier, Y. A., Maxfield, F. R. and Deckelbaum, R. J., 1995. Effects of apoprotein E on intracellular metabolism of model triglyceride-rich particles are distinct from effects on cell particle uptake. J Biol Chem. 270, 1761-1769.

Shafi, S., Brady, S. E., Bensadoun, A. and Havel, R. J., 1994. Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in rat liver. J Lipid Res. 35, 709-720.

Sheff, D., Pelletier, L., O'Connell, C. B., Warren, G. and Mellman, I., 2002. Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. J Cell Biol. 156, 797-804.

Silver, D. L., Wang, N., Xiao, X. and Tall, A. R., 2001. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. J Biol Chem. 276, 25287-25293.

Smith, J. D., Waelde, C., Horwitz, A. and Zheng, P., 2002. Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux. J Biol Chem. 277, 17797-17803.

Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. and Zerial, M., 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. J Cell Biol. 149, 901-914.

Srivastava, R. A., 2003. Scavenger receptor class B type I expression in murine brain and regulation by estrogen and dietary cholesterol. J Neurol Sci. 210, 11-18.

Stahl, A., Hirsch, D. J., Gimeno, R. E., Punreddy, S., Ge, P., Watson, N., Patel, S., Kotler, M., Raimondi, A., Tartaglia, L. A. and Lodish, H. F., 1999. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. Mol Cell. 4, 299-308.

Steinberg, D., 1996. A docking receptor for HDL cholesterol esters. Science. 271, 460-461.

Stockinger, W., Sailler, B., Strasser, V., Recheis, B., Fasching, D., Kahr, L., Schneider, W. J. and Nimpf, J., 2002. The PX-domain protein SNX17 interacts with members of the LDL receptor family and modulates endocytosis of the LDL receptor. Embo J. 21, 4259-4267.

Strickland, D. K., Ashcom, J. D., Williams, S., Burgess, W. H., Migliorini, M. and Argraves, W. S., 1990. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. J Biol Chem. 265, 17401-17404.

Swift, L. L., Farkas, M. H., Major, A. S., Valyi-Nagy, K., Linton, M. F. and Fazio, S., 2001. A recycling pathway for resecretion of internalized apolipoprotein E in liver cells. J Biol Chem. 276, 22965-22970.

Tabas, I., Lim, S., Xu, X. X. and Maxfield, F. R., 1990. Endocytosed beta-VLDL and LDL are delivered to different intracellular vesicles in mouse peritoneal macrophages. J Cell Biol. 111, 929-940.

Tabas, I., Myers, J. N., Innerarity, T. L., Xu, X. X., Arnold, K., Boyles, J. and Maxfield, F. R., 1991. The influence of particle size and multiple apoprotein E-receptor interactions on the endocytic targeting of beta-VLDL in mouse peritoneal macrophages. J Cell Biol. 115, 1547-1560.

Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Nakai, T., Sakai, J. and Yamamoto, T., 1992. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. Proc Natl Acad Sci U S A. 89, 9252-9256.

Takayama, Y., May, P., Anderson, R. G. and Herz, J., 2005. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) controls endocytosis and c-CBL-mediated ubiquitination of the platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR beta). J Biol Chem. 280, 18504-18510.

Trigatti, B., Covey, S. and Rizvi, A., 2004. Scavenger receptor class B type I in high-density lipoprotein metabolism, atherosclerosis and heart disease: lessons from gene-targeted mice. Biochem Soc Trans. 32, 116-120.

Trigatti, B. L., Krieger, M. and Rigotti, A., 2003. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 23, 1732-1738.

van't Hooft, F. and Havel, R. J., 1981. Metabolism of chromatographically separated rat serum lipoproteins specifically labeled with 125I-apolipoprotein E. J Biol Chem. 256, 3963-3968.

van Dijk, K. W., Hofker, M. H. and Havekes, L. M., 1999. Dissection of the complex role of apolipoprotein E in lipoprotein metabolism and atherosclerosis using mouse models. Curr Atheroscler Rep. 1, 101-107.

van Kerkhof, P., Lee, J., McCormick, L., Tetrault, E., Lu, W., Schoenfish, M., Oorschot, V., Strous, G. J., Klumperman, J. and Bu, G., 2005. Sorting nexin 17 facilitates LRP recycling in the early endosome. Embo J. 24, 2851-2861.

Verges, M., Bensadoun, A., Herz, J., Belcher, J. D. and Havel, R. J., 2004. Endocytosis of hepatic lipase and lipoprotein lipase into rat liver hepatocytes in vivo is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein. J Biol Chem. 279, 9030-9036.

von Eckardstein, A., Nofer, J. R. and Assmann, G., 2001. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 21, 13-27.

Waldron, E., Jaeger, S. and Pietrzik, C. U., 2006. Functional role of the low-density lipoprotein receptor-related protein in Alzheimer's disease. Neurodegener Dis. 3, 233-238.

Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L. and Mahley, R. W., 1982. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. J Biol Chem. 257, 2518-2521.

Weisgraber, K. H., Rall, S. C., Jr. and Mahley, R. W., 1981. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. J Biol Chem. 256, 9077-9083.

Wetterau, J. R., Aggerbeck, L. P., Rall, S. C., Jr. and Weisgraber, K. H., 1988. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. J Biol Chem. 263, 6240-6248.

Williams, S. E., Ashcom, J. D., Argraves, W. S. and Strickland, D. K., 1992. A novel mechanism for controlling the activity of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein. J Biol Chem. 267, 9035-9040.

Willnow, T. E., Moehring, J. M., Inocencio, N. M., Moehring, T. J. and Herz, J., 1996. The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro. Biochem J. 313 (Pt 1), 71-76.

Willnow, T. E., Sheng, Z., Ishibashi, S. and Herz, J., 1994. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. Science. 264, 1471-1474.

Wong, L., 1989. Contribution of endosomes to intrahepatic distribution of apolipoprotein B and apolipoprotein E. J Cell Physiol. 141, 441-452.

Xiang, W. and Rensing, L., 1999. Changes in cell morphology and actin organization during heat shock in Dictyostelium discoideum: does HSP70 play a role in acquired thermotolerance? FEMS Microbiol Lett. 178, 95-107.

Yu, G., Rux, A. H., Ma, P., Bdeir, K. and Sachais, B. S., 2005. Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappaB-dependent manner. Blood. 105, 3545-3551.

Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A. and Maeda, N., 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. Science. 258, 468-471.

Zhao, Y. and Mazzone, T., 2000. Transport and processing of endogenously synthesized ApoE on the macrophage cell surface. J Biol Chem. 275, 4759-4765.

Zheng, C., Murdoch, S. J., Brunzell, J. D. and Sacks, F. M., 2006. Lipoprotein lipase bound to apolipoprotein B lipoproteins accelerates clearance of postprandial lipoproteins in humans. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26, 891-896.

Zurhove, K., Nakajima, C., Herz, J., Bock, H. H. and May, P., 2008. Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1. Sci Signal. 1, ra15.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	*ATP Binding Cassette Transporter*
adEGFP	Adenovirus, der das *Enhanced Green Fluorescent Protein* kodiert
AdCre	Adenovirus, der *Cre-Recombinase* kodiert
Anti	Antikörper
AP1	*Adapter Protein 1*
Apo	Apolipoprotein
ApoER2	Apolipoprotein E-Rezeptor 2
APP	*Amyloid Precursor Protein*
BSA	Bovines Serum-Albumin
CETP	*Cholesterinester Transfer Protein*
CM	Chylomikronen
CR	Chylomikronen Remnants
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
EEA1	*Early Endosome Antigen 1*
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EGFP	*Enhanced Green Fluorescent Protein*
FATP4	*Fatty Acid Transport Protein 4*
FBS	Fetales Bovines Serum
G58K	Golgi 58K Protein
HDL	*High Density Lipoprotein*
HL	hepatische Lipase
HSPG	*Heparan Sulfat* Proteoglykane
IDL	*Intermediate Density Lipoprotein*
LAMP1	*Lysosome-associated Membrane Protein 1*
LCAT	*Lezithin Cholesterin Acyl Transferase*
LDL	*Low Density Lipoprotein*
LPL	Lipoprotein Lipase
LRP1	*LDL-Receptor Related Protein 1*
LSM	*Laser Scanning Microscop*

PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	*Platelet Derived Growth Factor*
PLTP	*Phospholipid Transfer Protein*
PFA	Paraformaldehyd
PPD	0,1% 1,2 Phenylendiamin
RAP	*Receptor Associated Protein*
rApoE	Rekombinantes ApoE
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SR-B1	*Scavenger Receptor Class B1*
Snx17	*Sorting Nexin 17*
TBS	Trispuffer (Tris Buffered Saline)
tPA	Tissue-Type Plasminogen-Factor
TRL	Triglyceridreiche Lipoproteine
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
uPA	*Urokinase Type Plasminogen Factor*
VLDL	*Very Low Density Lipoprotein*

9 Danksagung

Für die Ermöglichung dieser Arbeit danke ich herzlich Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel.

Mein aufrichtigster Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Jörg Heeren für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die geduldige Unterstützung und die Gabe, dies alles mit einem Lächeln zu tun.

Für das Erlernen der molekularbiologischen Methoden und die stets sehr nette, kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre bedanke ich mich bei Frau Sandra Ehret, Frau Dorte Wendt , Frau Dorothee Lasrich sowie bei allen Mitarbeitern des Instituts.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie, meinem Freund Sven Schippling und meinen Freunden dafür danken, dass sie an mich geglaubt und mich seelisch unterstützt haben.

10 Lebenslauf

Entfällt aus datenrechtlichen Gründen

11 Eidesstattliche Erklärung

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

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

Unterschrift:

Malamatenia Panteli