

**LIPOPROTEIN- UND APOLIPOPROTEIN E-STOFFWECHSEL IN
HUMANEN ADIPOZYTEN**

DISSERTATION

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Departments Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

DOROTHEE LASRICH

aus Rheda-Wiedenbrück

HAMBURG

2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. U. BEISIEGEL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH
Tag der Disputation: 22. Januar 2010

Hamburg, den 08. Januar 2010



A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Jörg Ganzhorn".

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

FÜR MEINE ELTERN

INHALT

Abkürzungen..... 1

Zusammenfassung 3

1 Einleitung..... 4

 1.1 Lipoproteinstoffwechsel 4

 1.1.1 Zusammensetzung und Funktion von Lipoproteinen..... 6

 1.1.2 exogener Lipoproteinstoffwechsel..... 8

 1.1.3 endogener Lipoproteinstoffwechsel 9

 1.2 Sekretion und Aufnahme von Lipoproteinen..... 10

 1.2.1 Synthese und Sekretion von Lipoproteinen 10

 1.2.2 Lipoproteinrezeptor vermittelte Aufnahme 14

 1.3 Lipidstoffwechsel des Fettgewebes..... 15

 1.3.1 Differenzierung und Funktion von Adipozyten 15

 1.3.2 Bedeutung von Lipiden und Lipoproteinen für den Stoffwechsel des 18

 Adipozyten..... 18

 1.3.3 ApoE-Funktion im Adipozytenstoffwechsel 21

 1.4 Fragestellung 22

2 Material und Methoden 23

 2.1 Zelllinien 23

 2.2 Adipozytäre Differenzierung 23

 2.2.1 Adipozytäre Differenzierung von hMSC-Tert Zellen..... 23

 2.2.2 Präparation und adipozytäre Differenzierung von primären humanen
Prädipozyten..... 24

 2.3 Molekularbiologie..... 26

 2.3.1 Präparation von RNA 26

 2.3.2 Schreiben von cDNA 26

 2.3.3 Quantitative Real-time PCR (TaqMan®)..... 27

 2.4 Proteinchemie 29

 2.4.1 Herstellung von Gesamtzelllysat 29

 2.4.2 Herstellung von Membranproteinfraktionen..... 30

 2.4.4 Proteinbestimmung mittels SDS-Lowry 30

 2.4.5 SDS-PAGE..... 31

 2.4.6 Western Blot..... 31

 2.4.7 Fluoreszenzmarkierung von Chylomikronen-Remnants 32

 2.4.8 Immunfluoreszenz..... 33

 2.5 Funktionale Methoden 33

 2.5.1 Fettrot-Färbung 34

 2.5.2 Nilrotfärbung 34

 2.5.3 Triglyzeridbestimmung..... 34

 2.5.4 Cholesterolbestimmung 35

2.5.5 Phospholipidbestimmung.....	35
2.5.6 Präparation von Chylomikronen aus humanem Plasma	36
2.5.7 Präparation von Chylomikronen-Remnants.....	36
2.5.8 Lipidextraktion.....	37
2.5.9 Liposomenpräparation	37
2.5.10 ³ H, ¹⁴ C Liposomenaufnahme	38
2.5.11 ¹²⁵ I-Lipoproteinaufnahme.....	39
2.5.12 ApoE-ELISA	39
2.5.13 Gelfiltrationschromatographie (FPLC).....	40
3 Ergebnisse.....	42
3.1 Charakterisierung des verwendeten Zellsystems	42
3.1.1 hMSC-Tert Adipozyten	43
3.1.2 humane Präadipozyten	47
3.2 Synthese und Sekretion von Lipoproteinen	49
3.2.1 ApoE-Sekretion.....	50
3.2.2 Regulation der ApoE-Sekretion	50
3.2.3 Charakterisierung der sekretierten Lipoproteine	58
3.3 Aufnahme von ApoE-haltigen Lipoproteinen	61
3.3.1 Aufnahme von ³ H/ ¹⁴ C-markierten Liposomen in hMSC-Tert Adipozyten.....	61
3.3.2 Aufnahme von ¹²⁵ I-Chylomikronen-Remnants in hMSC-Tert Adipozyten.....	66
3.3.3 Aufnahme von Cy5-markierten Chylomikronen-Remnants	70
3.4 Bedeutung des ApoE für die Adipozytenfunktion	74
3.4.1 Charakterisierung der ApoE-knockdown Zelllinie	74
3.4.2 Charakterisierung der adipogenen Differenzierung in den ApoE knockdown Zellen.....	75
3.4.3 ApoE Rekonstitution.....	78
4 Diskussion.....	85
4.1 Charakterisierung des adipozytären Zellsystems.....	85
4.2 Synthese und Sekretion von ApoE in hMSC-Tert Adipozyten.....	87
4.3 Aufnahme von ApoE-haltigen Lipoproteinen in Adipozyten	90
4.4 Bedeutung des ApoE für die Adipozyten-Funktion	96
Abbildungsverzeichnis.....	99
Literatur.....	101
Anhang	115
Danksagung	119

ABKÜRZUNGEN

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborate
ABCA1	ATP Binding Cassette Transporter 1
ACAT	Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase
ACC	Acyl-CoA Carboxylase
ADD	Adipocyte Determination and Differentiation Factor
AK	Antikörper
AMPK	5'-AMP aktivierte Proteinkinase
aP2	Adipocyte Lipid Binding Protein
Apo	Apolipoprotein
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase
BAPTA-AM	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetate acetoxymethyl ester
bp	Basenpaare
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CE	Cholesterolester
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CETP	Cholesterolester Transfer Protein
cDNA	revers transkribierte DNA
cGMP	cyclo-Guanosinmonophosphat
CM	Chylomikron
CR	Chylomikron-Remnant
Ct-Wert	Threshold Cycle
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid-5'triphosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAS	Fettsäuresynthetase
FFA	Freie Fettsäuren
FATP	Fatty Acid Transport Protein
FCS	Fötales Kälberserum
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
G6P	Glukose-6-phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
GSK	Glykogensynthase Kinase
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoA
hMSC	humane mesenchymale Stammzelle
HL	Hepatische Lipase
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
HSL	Hormonsensitive Lipase
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HuH7	humane Hepatomazelllinie
H89	N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5--2HCl

IBMX	Isobutylmethylxanthin
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IGF-I	Insulin-like Growth Factor-I
IL	Interleukin
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptor Substrat
kDa	kilo Dalton
LCAT	Lecithin: Cholesterol Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptor
LpL	Lipoprotein Lipase
LRP	LDLR-related Protein
LXR	Liver X Receptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK Kinase
MES	Morpholino Ethansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NADPH	Nicotinamid Adenindinukleotidphosphat
PAT	Perilipin, Adipophilin, TIP47
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDK	Phosphatidylinositol-abhängige Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-phosphat Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated Receptor
qPCR	quantitative PCR
RAP	Receptor-associated Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylaid Gelelektrophorese
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SRB1	Scavenger Receptor Class B Type 1
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBP	Tata Box Binding Protein
TBS	Tris Buffered Saline
Tert	Telomerase Reverse Transkriptase
TG	Triglyzerid
TIP47	Tail Interacting Protein of 47 kDa
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
TRL	Triglyzeridreiche Lipoproteine
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VLDL-R	VLDL-Rezeptor

ZUSAMMENFASSUNG

Das Fettgewebe nimmt eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel ein, da aufgenommene Fettsäuren zum Einen in Form von Triglyzeriden gespeichert, zum Anderen in katabolen Stoffwechsellagen zur Energiegewinnung freigesetzt werden. Im Plasma werden Fettsäuren in Form von komplexen Triglyzerid-reichen Lipoproteinen transportiert. Das in mit diesen Lipoproteinen assoziierte Apolipoprotein E (ApoE) wird in hohen Konzentrationen auch von Adipozyten synthetisiert. Die Bedeutung dieses regulatorisch wichtigen Apolipoproteins für das Fettgewebe war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit was es daher, die ApoE-abhängige Aufnahme und Sekretion von Lipoproteinen in humanen Adipozyten, und somit die Bedeutung des ApoE für den Lipoprotein- und Energiestoffwechsel des Adipozyten zu untersuchen.

Dafür wurde ein humanes Adipozytenmodell verwendet, welches durch Differenzierung aus immortalisierten mesenchymalen Stammzellen generiert werden kann. Nach erfolgreicher Charakterisierung des verwendeten Zellsystems hinsichtlich der induzierten Expression adipozytärer Markergene auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real time PCR und auf Proteinebene mittels Westernblot-Analytik und ELISA, konnte eine deutlich erhöhte Expression ebenfalls für ApoE, die Lipoprotein Lipase sowie für die Lipoproteinrezeptoren VLDL-R, LDL-R und LRP1 in den differenzierten Adipozyten nachgewiesen werden. Trotz der hohen Expression dieser regulatorisch wichtigen Proteine wurde mit Hilfe von radioaktiv- und fluoreszenzmarkierten Lipoproteinen gezeigt, dass die ApoE-abhängige Aufnahme von Lipoproteinen in Adipozyten nur zu einem sehr geringen Anteil erfolgt.

Die ApoE-Sekretion der humanen Adipozyten erfolgt in einer nicht-lipidierten Form, was durch Gelfiltrations-Analysen der Zellkulturüberstände der differenzierten Zellen gezeigt werden konnte. Dabei wird das ApoE über einen konstitutiven Mechanismus sezerniert, der abhängig von der intrazellulären Proteinkinase A-Aktivität und Calcium-Signalkaskaden verläuft. ApoE wird demzufolge in hoher Konzentration von Adipozyten synthetisiert und sezerniert, wobei diese Prozesse weder die Lipoproteinaufnahme noch die Lipidfreisetzung maßgeblich beeinflussen. Mittels einer stabilen, lentiviral-vermittelten siRNA-Expression gegen ApoE sowie durch die Überexpression der humanen ApoE3-Isoform in den hMSC-Tert Adipozyten, konnte jedoch eine zentrale Bedeutung des endogenen ApoE für die Differenzierung der Adipozyten gezeigt werden. Die ApoE-depletierten Zellen zeigen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen eine stark verringerte Triglyzerid-Akkumulation, was auf einer beeinträchtigten Differenzierung der Zellen beruht. Die Supplementation von exogen zugeführtem humanem ApoE3 während der Differenzierung führte zwar zu einer gesteigerten Akkumulation von Triglyzeriden, aber nicht zu einer Rekonstitution der Differenzierung hinsichtlich der Expression adipozytärer Markergene.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen folglich, dass der Lipidstoffwechsel humaner Adipozyten nur zu einem geringen Anteil durch die Aufnahme und Sekretion von Lipoproteinen beeinflusst wird. Dessen ungeachtet ist das in Adipozyten synthetisierte ApoE an der Regulation der adipozytären Differenzierung maßgeblich beteiligt, wobei die genaue Funktion von ApoE in diesem physiologisch und pathophysiologisch wichtigen Prozess noch nicht abschließend geklärt werden konnte.

1 EINLEITUNG

1.1 LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL

Nahrungslipide spielen für den Körper als Energielieferanten eine wichtige Rolle. Da Lipide wasserunlöslich sind, müssen ihrem Transport im Blut spezifische Mechanismen zugrunde liegen. Freie Fettsäuren werden an Albumin als spezifisches Transportprotein gebunden transportiert, während Lipide Mizelläre Komplexe mit Proteinen bilden, sogenannte Lipoproteine.

Der Lipoproteinstoffwechsel lässt sich in drei Bereiche unterteilen: den exogenen/postprandialen Weg, den endogenen Weg und den Stoffwechselweg der *High-density* Lipoproteine (HDL), den sogenannten reversen Cholesteroltransport. Der exogene Weg transportiert Nahrungslipide vom Darm zur Leber, sowie in periphere Gewebe wie Muskel und Fettgewebe, der endogene Weg verteilt Lipide aus der Leber in extrahepatische Organe. Der Stoffwechselweg der HDL ist vor allem für den Rücktransport von überschüssigem Cholesterol zur Leber verantwortlich, wo es zu Gallensäuren abgebaut und ausgeschieden werden kann. Der exogene/postprandiale Weg und der endogene Stoffwechselweg verlaufen nach dem gleichen Prinzip, unterscheiden sich aber in den agierenden Lipoproteinen. Während im Darm die Nahrungslipide in Triglyzerid-reiche Chylomikronen (CM) verpackt werden, synthetisiert die Leber ebenfalls Triglyzerid-reiche VLDL für den endogenen Weg (Havel RJ and Kane J.P., 2001). Chylomikronen und VLDL werden in Muskel und Fettgewebe durch die endothelständige Lipoprotein Lipase (LpL) hydrolysiert. Die dadurch aus den Triglyzeriden des Lipidkerns freigesetzten Fettsäuren werden durch spezifische Fettsäuretransporter in Muskel- und Fettgewebe zur Energiegewinnung bzw. Speicherung aufgenommen (Febbraio et al., 1999; Goldberg et al., 2009). Die Chylomikronen werden zu kleineren, cholesterolreichen Chylomikronen-Remnants (CR), aus VLDL werden analog *Intermediate-density* Lipoproteine (IDL), die durch weitere Hydrolyse und Transferreaktionen zu LDL werden. Diese werden schließlich über den LDL-Rezeptor (LDL-R) in die Zellen aufgenommen (Brown and Goldstein, 1986). Dieser Schritt stellt einen Unterschied zum exogenen/postprandialen Weg dar, und beruht auf den strukturellen Unterschieden der Apoproteine. Chylomikronen-Remnants tragen ApoB48 als Strukturprotein, LDL ApoB100. Durch *RNA-editing* wird das ApoB-Gen beim Menschen im Darm nur zur Hälfte translatiert (Powell et al., 1987), wodurch dem ApoB48 der CR die C-terminale LDL-Rezeptor-Bindungsdomäne fehlt (Innerarity et al., 1996; Davidson and Shelness, 2000). Die Chylomikronen können so nicht ApoB-abhängig in die extrahepatischen Gewebe aufgenommen werden, sondern werden über das *LDL-Receptor related protein 1* (LRP1) vorrangig von der Leber internalisiert (Beisiegel et al., 1995; Rohlmann et al., 1998; Veniant et al., 1998).

Der HDL-Stoffwechsel ist wesentlich für den reversen Cholesteroltransport verantwortlich. Dabei wird überschüssiges Cholesterol aus extrahepatischen Geweben zurück zur Leber transportiert. Die Leber ist das einzige Organ, welches Cholesterol durch

den Abbau zu Gallensäuren ausscheiden kann (Russell and Setchell, 1992). HDL wird als lipidarme Vorstufe von der Leber sezerniert, zentraler Bestandteil ist ApoAI, und anschließend im Plasma zu reifer HDL lipidiert. Der Transfer von Cholesterol aus den Zellen zur HDL wird dabei von dem *ATP Binding Cassette Transporter A1* (ABCA1) vermittelt (Rust et al., 1999; Lawn et al., 1999; Young and Fielding, 1999; Oram and Vaughan, 2000; Ragozin et al., 2005). Das auf die HDL übertragene Cholesterol wird nun durch die *Lecithin: Cholesterol-Acyltransferase* (LCAT), die mit der HDL assoziiert ist, mit einem Fettsäurerest aus Lecithin verestert (Zannis et al., 2006). Die so entstandenen Cholesterolester werden über den *Scavenger-Rezeptor Class B Type I* (SR-BI) selektiv wieder in Hepatozyten aufgenommen (Acton et al., 1996). Das *Cholesterol Ester Transfer Protein* (CETP) überträgt Cholesterol auf LDL, welches so für eine Aufnahme in periphere Gewebe zur Verfügung steht (Bruce et al., 1998). Da kein murines Analog zum humanen CETP existiert, stellt dies einen entscheidenden Unterschied zwischen dem Menschen und dem Modellorganismus Maus dar. Demnach liegt bei Mäusen nahezu das gesamte Plasmacholesterol in der HDL-Fraktion vor, beim Menschen hingegen findet man einen Großteil des Cholesterols in der LDL-Fraktion. In der folgenden Abbildung 1.1 sind die 3 beschriebenen Stoffwechselwege kurz zusammengefasst.

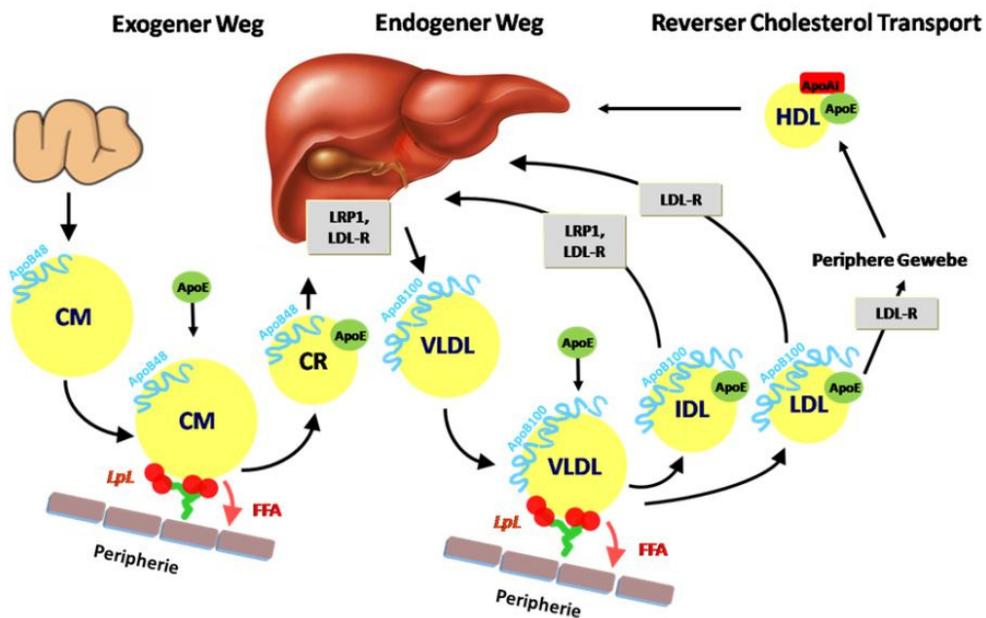


Abb.1.1 Übersicht über den Lipoprotein-Stoffwechsel. CM = Chylomikronen CR = Chylomikronen-Remnants, VLDL = Very Low Density Lipoprotein, IDL = Intermediate Density Lipoprotein, HDL = High Density Lipoprotein, LpL = Lipoprotein Lipase, FFA = Free Fatty Acid, LRP1 = LDL-Rezeptor Related Protein 1, LDL-R = Low Density Lipoprotein Rezeptor. Erläuterungen im Text.

1.1.1 ZUSAMMENSETZUNG UND FUNKTION VON LIPOPROTEINEN

Lipoproteine enthalten Fettsäuren in Form von Triglyceriden (TG) und Cholesterolestern (CE), der Transportform des Cholesterols, sowie Phospholipide (PL) und lipophile Vitamine. Die Lipoproteine bestehen aus einem hydrophoben Lipidkern aus Triacylglyceriden und Cholesterolestern, sowie einer amphiphatischen Oberfläche aus Phospholipiden, durch deren polare Kopfgruppen die Löslichkeit in wässrigem Milieu vermittelt wird. In die Oberfläche eingelagert befinden sich verschiedene Apolipoproteine, die zum Einen eine stabilisierende Funktion ausüben, und zum Anderen durch Interaktion mit Enzymen und Membranrezeptoren für die Verstoffwechslung des Lipoproteins sorgen. In Abbildung 1.2 ist die Zusammensetzung eines Lipoproteins schematisch dargestellt.

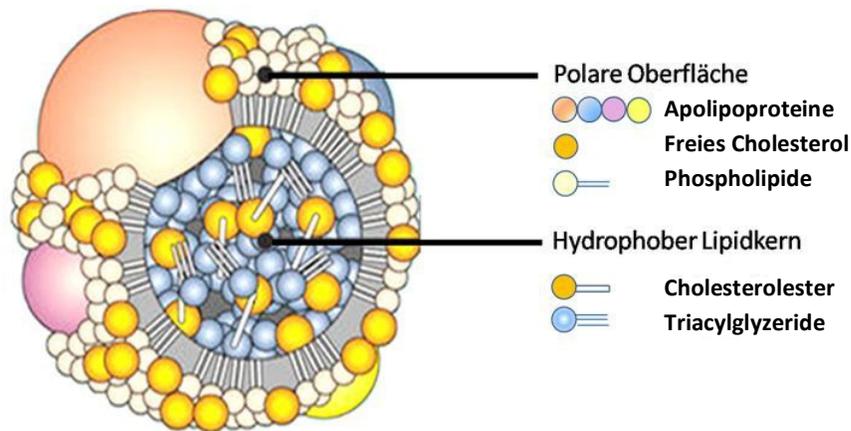


Abb.1.2 Schematische Darstellung eines Lipoproteins. Bestehend aus einem hydrophoben Kern mit Cholesterolestern und Triacylglyceriden sowie einer amphiphatischen Oberfläche, die von Phospholipiden gebildet wird, und in die die strukturgebenden Apolipoproteine eingelagert sind. Abbildung adaptiert aus dem World Wide Web, Homepage der Universität Laval.

Lipoproteine werden in verschiedene Klassen eingeteilt, die sich durch ihre Größe, Lipid- und Apolipoprotein-Zusammensetzung unterscheiden. Die Größe, d.h. der Lipidgehalt der Lipoproteine korreliert dabei invers mit ihrer Dichte (siehe Tabelle 1.1).

	Dichte [g/mL]	Größe [nm]	Apolipoprotein	TG [%]	CE [%]	PL [%]	Chol [%]	Apoprotein [%]
Cyhlomikronen	0,93	75-1200	B48, E	86	3	7	2	2
VLDL	0,93-1,006	30-80	B100, C, E	55	12	18	7	8
IDL	1,006-1,019	25-35	B100, C, E	23	29	19	9	19
LDL	1,019-1,063	18-25	B100	6	42	22	8	22
HDL	1,063-1,3	5-12	A,C,E	0-5	0-17	5-33	5	40-90

Tabelle 1.1 Wichtige Lipoproteinklassen und ihre Eigenschaften. Nach Havel und Kane 2001.

Ein Großteil der Apolipoproteine, vor allem A, C und E, weisen als charakteristisches Strukturelement eine sogenannte amphiphatische α -Helixstruktur auf. Dabei sind die

hydrophilen Bereiche der wässrigen Umgebung, die hydrophoben dem Lipidkern der Lipoproteinpartikel zugewandt. Diese Apolipoproteine sind in der Lage, intravaskulär zwischen einzelnen Lipoproteinpartikeln auszutauschen (Gursky, 2005).

ApoAI fungiert als Strukturprotein der HDL, aktiviert die LCAT und vermittelt die Bindung der HDL an die HDL-Rezeptoren (Matsunaga et al., 1991; Williamson et al., 1992). ApoAII wirkt als Kofaktor bei der zellulären Aufnahme von Cholesterin und aktiviert die Hepatische Lipase (HL) (Kostner et al., 2007). ApoAIV vermittelt die Absorption von Nahrungslipiden und die Synthese der Chylomikronen. Es moduliert außerdem die Aktivierung der LpL über ApoCII und aktiviert die LCAT (Lopez-Miranda et al., 2006). ApoAV reguliert die Triglyzeridkonzentration im Plasma durch Aktivierung der LpL (Pennacchio et al., 2001; Merkel et al., 2005).

Die Apolipoproteine C modulieren die Aktivität der Lipoprotein Lipase. Die LpL ist in Abwesenheit ihres Kofaktors ApoCII inaktiv, was bei einem Mangel zu einer Typ-I-Hyperlipidämie führt (Breckenridge et al., 1978). ApoCIII hingegen hemmt die Aktivität der LpL (Wang et al., 1985) und inhibiert gleichzeitig die Bindung triglyzeridreicher Lipoproteine an den LDL-R der Leber (Windler et al., 1980; Quarfordt et al., 1982; Windler and Havel, 1985). Dadurch wird gewährleistet, dass nur Lipoproteine nach entsprechender Prozessierung durch die LpL wieder in die Leber aufgenommen werden (Shelburne et al., 1980; Windler et al., 1980). Das ApoCI erfüllt eine ähnliche Funktion, hinzu kommt aber noch eine aktivierende Wirkung auf die LCAT (Windler et al., 1980; Sehayek and Eisenberg, 1991).

Das Apolipoprotein E kommt in drei Hauptisoformen vor: E2, E3 und E4 (Weisgraber et al., 1981). Es ist vor allem in Chylomikronen-Remnants, VLDL, IDL und HDL zu finden und vermittelt die Bindung der Lipoproteine an die Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Familie. Es vermittelt vor allem die Insulin-abhängige Aufnahme von Chylomikronen-Remnants über LRP1 in die Leber (Beisiegel et al., 1989). Neben seiner Funktion als bedeutender Regulator des Lipoproteinstoffwechsels im Plasma (Mahley and Ji, 1999) kommt dem ApoE im zellulären Lipidstoffwechsel des Fettgewebes eine besondere Bedeutung zu, auf die in 1.3.3 ausführlicher eingegangen wird.

Im Gegensatz zu den gerade beschriebenen Apolipoproteinen stehen ApoB48 und ApoB100. Sie bestehen überwiegend aus großflächigen, amphipatischen β -Faltblattstrukturen, die für eine feste Assoziation mit dem Lipidkern verantwortlich sind, so dass ApoB48 und ApoB100 nicht in der Lage sind, zwischen einzelnen Lipoproteinen auszutauschen (Gursky, 2005). Beide Proteine werden, wie bereits erwähnt, von demselben Gen transkribiert, wobei das ApoB48 beim Menschen ausschließlich im Dünndarm synthetisiert wird. Mittels *RNA-Editing* wird durch die Desaminierung eines spezifischen Cytosylrestes zu einem Uracylrest ein Stopcodon in die ApoB100-mRNA eingefügt (Anant and Davidson, 2001), wodurch beim ApoB48 nur die N-terminalen 48% des Gens translatiert werden und diesem so die C-terminale LDL-Rezeptor-Bindungsdomäne fehlt.

1.1.2 EXOGENER LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL

Nach der Resorption werden die Nahrungslipide in den Mucosazellen des Dünndarms mit amphiphatischen Phospholipiden und Apolipoproteinen zu Chylomikronen komplexiert. Aufgrund ihrer Größe von 100 nm - 1 µm können diese nicht direkt in die Blutbahn gelangen, sondern werden über das Lymphsystem transportiert. Anschließend gelangen sie über den *Ductus thoracicus* zum *Angulus venosus*, wo der Übergang in den Blutkreislauf stattfindet. Dort werden primär die Triglyzeride der Chylomikronen durch die endothelständige Lipoprotein Lipase hydrolysiert, welche durch Insulin in ihrer Expression und Sekretion stimuliert wird (Spooner et al., 1979). Die LpL liegt in den exprimierenden Geweben Herz, Muskel, braunes und weißes Fettgewebe an die Heparansulfatproteoglykane (HSPG) der extrazellulären Matrix der Endothelzellen und das *Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1* (GPIHBP1) gebunden vor (Spooner et al., 1979; Merkel et al., 2002a; Beigneux et al., 2007; Gin et al., 2008). Im Rahmen dieser LpL-katalysierten Lipolyse, die ApoCII und ApoAV als Kofaktoren benötigt (Olivecrona and Beisiegel, 1997; Merkel et al., 2005), werden die Triglyacylglyceride der Chylomikronen gespalten und die entstehenden freien Fettsäuren (FFA) in die umliegenden Gewebe aufgenommen. Das CETP vermittelt den Austausch von Triacylglyceriden gegen Cholesterolester mit der HDL (Bruce et al., 1998). Weitere Veränderungen der Lipidzusammensetzung werden durch das *Phospholipid Transfer Protein* (PLTP) vorgenommen, welches den Anteil der Phospholipide in den Chylomikronen reduziert (Tzotzas et al., 2009). Am Ende dieses Modifizierungsprozesses stehen CR, die ApoE aus der HDL aufgenommen haben (Imaizumi et al., 1978; van't Hooft and Havel, 1981). Als weitere Proteine enthalten die CR ApoCII, ApoCIII, ApoAV sowie LpL, die nach der Hydrolyse in inaktiver Form an die CR assoziiert verbleibt (Zambon et al., 1996; Heeren et al., 2002). ApoE und LpL vermitteln als Liganden unmittelbar die Bindung an die HSPGs im Disse-Raum, wodurch die sehr kurze Halbwertszeit der CR im Plasma begründet wird (Ishibashi et al., 1996).

MacArthur et al. konnten eine wichtige Rolle für die HSPGs bei der Bindung der TRL durch einen leberspezifischen Knockout der N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAC)-N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 1 (Ndst1) zeigen. Während der Polymerisation der HSPGs im Golgi-Apparat unterliegen diese einer Reihe von Modifikationen. Dabei entfernen die Ndsts die Acetylgruppen der GlcNAC-Reste und Sulfatreste werden an die freien Aminogruppen angefügt. Die so modifizierten Zuckerketten sind hochspezifische Bindestellen für verschiedene Proteine (Lindahl and Li, 2009). Ein leberspezifischer Ndst1-Knockout führt so zu einer beeinträchtigten CR-Bindung und folglich zu einem erhöhten Plasmatriglyzeridspiegel sowohl unter pre- als auch postprandialen Bedingungen. Desweiteren wurde auch eine aktive Beteiligung der HSPGs am Endozytoseprozess postuliert (MacArthur et al., 2007).

Die CR werden im Disse-Raum durch die Hepatische Lipase (HL) weiter hydrolysiert, die bei anschließender Aufnahme der CR zusammen mit ApoE und LpL als Liganden für die Membranrezeptoren LRP1 und LDL-R fungiert (Beisiegel et al., 1989; Ishibashi et al., 1994;

de Faria et al., 1996; Rohlmann et al., 1998). Störungen der Aufnahme postprandialer Lipoproteine können zu einer Akkumulation von Remnant-Lipoproteinen im Plasma führen, welche mit der Entwicklung frühzeitiger Atherosklerose und Herzinfarkt assoziiert ist. Die am Besten untersuchte Störung der Remnant-Aufnahme ist die sogenannte Typ III-Hyperlipoproteinämie. Betroffene Patienten sind homozygot für die ApoE2-Isoform, welche nicht in der Lage ist die Bindung der CR an den LDL-R zu vermitteln. Laatsch et al. konnten, wie bereits für Adipozyten von (Corvera et al., 1989; Descamps et al., 1993) beschrieben, auch für Leberzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, dass in der postprandialen Phase LRP1 durch den Insulinstimulus zur Plasmamembran transloziert wird, und so für die Aufnahme der CR zur Verfügung steht (Laatsch et al., 2009). Es wird daher vermutet, dass eine z.B. durch Übergewicht verursachte Insulin-Resistenz bei ApoE 2/2-Trägern zu einer Typ III-Hyperlipoproteinämie führt. Die Aufnahme über LRP1 wird dabei über dessen intrazelluläre NPxYxxL-Domäne vermittelt (Li et al., 2000). LDL-R defiziente Mäuse mit einer Knock-In Mutation in der endogenen NPxYxxL-Domäne zeigen, dass ein Funktionsverlust dieser Domäne zu einer beeinträchtigten Internalisation von Remnant-Partikeln und somit unter anderem zu einer Anreicherung ApoE-haltiger Lipoproteine und dem proinflammatorischen Cytokin Tumornekrose Faktor α (TNF α) führen, was in einer erhöhten Atherosklerose-Entwicklung resultiert (Gordts et al., 2009).

Die intrazelluläre Prozessierung der Chylomikronen-Remnants unterscheidet sich vom klassischen lysosomalen Abbau der LDL (Brown and Goldstein, 1986). Nur der Lipidkern und das ApoB48 werden dabei lysosomal degradiert, ApoE ApoCII, ApoCIII und LpL werden in den peripheren Endosomen vom Lipidkern getrennt und in sogenannte *Surface Remnants* zurück zur Plasmamembran transportiert und recycelt (Heeren et al., 1999; Fazio et al., 1999; Rensen et al., 2000).

1.1.3 ENDOGENER LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL

Der endogene Stoffwechselweg beginnt mit der Synthese der VLDL in der Leber (1.2.1). Naszierende VLDL enthalten ApoB100, ApoE und geringe Mengen ApoC. Während der Hydrolyse werden ein großer Teil der ApoCs und das freie Cholesterin auf die HDL zurücktransferiert (Havel RJ and Kane J.P., 2001). Das Cholesterin wird anschließend durch die LCAT verestert und kann durch das CETP wieder auf ApoB-enthaltende Lipoproteine übertragen werden (Barter et al., 2003). Während der sukzessiven Hydrolyse werden aus relativ großen Triglyzerid-reichen VLDL₁ kleinere, dichtere VLDL₂ die über ApoE entweder direkt über den LDL-R in die Zellen aufgenommen werden, oder über IDL in LDL überführt werden. Bei der Umwandlung in LDL verlieren die VLDL-Remnants ihren ApoE-Anteil und nehmen über CETP Cholesterolester aus den HDL auf (Bruce et al., 1998). Sie enthalten ein einziges Molekül ApoB100. LDL macht bei gesunden Menschen etwa zweidrittel des Plasma-Cholesterols aus. Der größte Teil davon wird über den LDL-Rezeptor in die Leber, ein geringerer Teil in periphere Gewebe aufgenommen, wo das Cholesterin als Membranbaustein und als Präkursor für die Synthese von Steroidhormonen und Vitamin D dient (Daniels et al., 2009).

Ab einer LDL-Konzentration von etwa 200 mg/dL, ist die Kapazität der LDL-Rezeptoren erschöpft, was dazu führt, dass die LDL nicht mehr über die LDL-Rezeptoren, sondern über die sogenannten *Scavenger*-Rezeptoren verstoffwechselt werden (Kostner et al., 2007). Die *Scavenger*-Rezeptoren wurden zum ersten Mal 1979 von Goldstein und Brown als hochaffine Bindungsstellen für acetylierte LDL beschrieben (Brown et al., 1979; Goldstein et al., 1979). Sie kommen vor allem in Makrophagen und Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES) vor und nehmen chemisch modifizierte LDL auf. Speziell Oxidation im subendothelialen Raum durch z.B. proinflammatorische Cytokine oder oxidativen Stress führt *in vivo* zu modifizierter LDL die als Ligand über die *Scavenger*-Rezeptoren aufgenommen werden (Henriksen et al., 1981; Quinn et al., 1987; Khan et al., 2003). Eine besondere Bedeutung für den Lipoproteinstoffwechsel hat der SR-BI, für den erstmals die Aufnahme von Lipiden aus Lipoproteinpartikeln gezeigt werden konnte (Acton et al., 1996). Er bindet als Liganden u.a. modifizierte und native LDL, VLDL sowie HDL. Aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität zu HDL wird er auch als HDL-Rezeptor bezeichnet (Krieger, 2001). Der SR-BI vermittelt die selektive Aufnahme von Cholesterol und Cholesterolestern aus gebundenen HDL in die Zellen, die HDL-assoziierten Apolipoproteine werden dabei nicht internalisiert (Swarnakar et al., 1999; Ji et al., 1999). Weiterhin scheint der SR-BI aber auch den Efflux von Cholesterol zu ermöglichen (Llera-Moya et al., 1999).

Im Gegensatz zum LDL-R wird die Expression der *Scavenger*-Rezeptoren nicht vom Cholesterolgehalt der Zelle reguliert, wodurch Makrophagen uneingeschränkt LDL aufnehmen können. Bei exzessiver LDL-Aufnahme ist die Aufnahmekapazität der HDL für den reversen Transport nicht ausreichend, die Makrophagen werden dadurch in Schaumzellen umgewandelt und es entsteht ein atherosklerotischer Plaque (Li and Glass, 2002).

1.2 SEKRETION UND AUFNAHME VON LIPOPROTEINEN

Dieser Abschnitt beschreibt zunächst die Synthese und Sekretion von Lipoproteinen, wobei im Einzelnen auf die VLDL (1.2.1.1) und ApoE (1.2.1.2) eingegangen wird. In Abschnitt 1.2.2 wird die Bedeutung des Apolipoprotein E für die Aufnahme von Lipoproteinen beschrieben.

1.2.1 SYNTHESE UND SEKRETION VON LIPOPROTEINEN

1.2.1.1 VLDL

Wie bereits in 1.1.3 erwähnt beginnt der endogene Stoffwechselweg in der Leber mit der Synthese der VLDL. Die Synthese der VLDL erfolgt in zwei Schritten. Der erste Schritt beinhaltet die Synthese des ApoB an den Ribosomen und die anschließende Translokation in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Boren et al., 1992; Olofsson et al., 1999). Durch seine hydrophilen Eigenschaften bleibt es dort zunächst mit der Membran assoziiert (Chuck et al., 1990). Der initiale Schritt zur Lipidierung des ApoB erfolgt durch das *Microsomal Triglyceride Transfer Protein* (MTP) am rauen Endoplasmatischen Retikulum (Boren et al., 1992; Rustaeus et al., 1998). MTP ist essentiell für die Bildung der

VLDL-Partikel. Der Verlust des Proteins führt zu einer Abeta-Lipoproteinämie, einem kompletten Verlust von ApoB-haltigen Lipoproteinen (Sharp et al., 1993). MTP bindet an die Membran des ER und bildet ein Heterodimer mit Proteindisulfid-Isomerasen (PDI), die an der Ausbildung von Disulfidbrücken im ApoB beteiligt sind (Shoulders et al., 1994; Wu et al., 1996a; Bradbury et al., 1999), wodurch Triglyzeride auf das ApoB übertragen werden können. Es entsteht ein prä-VLDL-Partikel der durch weitere Lipidierung zu einem triglyzerid-armen VLDL-Partikel konvertiert wird. Diese Lipidierung ist abhängig von dem *GTP-binding protein ADP-ribosylation factor 1* (ARF-1), welches außerdem für die Translokation der VLDL in den Golgi-Apparat verantwortlich ist (Stillemark et al., 2000; Tran et al., 2002). Im Golgi-Apparat wird der Proteinanteil der VLDL weiter modifiziert (Gusarova et al., 2007) und weiterhin Phospholipide in die VLDL eingebaut. Die reifen VLDL werden schließlich in COPI-sekretorische Vesikel verpackt (siehe auch 1.1.2.2) und in den Disse-Raum entlassen.

Die VLDL-Synthese und Sekretion unterliegt einer strengen Regulation durch Insulin, wobei in der postprandialen Phase die VLDL-Synthese als Antwort auf den Insulin-Stimulus reduziert ist (Sparks and Sparks, 1994; Lewis et al., 1995). Eine schnelle Adaption der Leber an metabolische Änderungen zwischen prä- und postprandialer Phase ist notwendig, um eine physiologische Konzentration der Lipide im Plasma aufrechtzuerhalten. Diese Regulation wird durch den Transkriptionsfaktor *Fork-head Box O1* (FoxO1), der ein *Insulin responsive element* (IRE) in seinem Promotor trägt, vermittelt (Sparks and Sparks, 1994; Brunet et al., 1999; Nakae et al., 2001; Barthel et al., 2005). In Abwesenheit von Insulin verbleibt FoxO1 im Nukleus und bindet als Transaktivator an den Promotor. In Anwesenheit von Insulin wird FoxO1 durch den PI3K-abhängige Wege phosphoryliert, was zu einer Translokation aus dem Nukleus und so zur Inhibition der Target-Gene führt (Biggs, III et al., 1999; Nakae et al., 2001; Altomonte et al., 2003). Die hepatische MTP-Synthese wird ebenfalls negativ durch Insulin beeinflusst, was zusätzlich zu einer Reduktion der VLDL-Partikel führt (Hagan et al., 1994; Kuriyama et al., 1998; Phillips et al., 2002).

Auch für ApoE wird eine Rolle in der Regulation der VLDL-Sekretion beschrieben. Hamilton et al. konnten ApoE in naszierenden VLDL-Partikeln nachweisen und postulieren eine Rolle während der VLDL-Sekretion in der Bildung sekretorischer Vesikel im Golgi-Apparat (Hamilton et al., 1991). ApoE-defiziente Mäuse zeigen eine starke Triglyzerid-Akkumulation in der Leber, was ebenfalls auf eine beeinträchtigte VLDL-Sekretion der Leber hindeutet (Kuipers et al., 1996). *In vitro* ist die TG-Synthese in ApoE-defizienten Hepatozyten hingegen nicht beeinflusst (Gusarova et al., 2007).

1.1.2.2 ApoE

Das Apolipoprotein E wurde 1973 zum ersten Mal als argininreiches Protein mit einer Molmasse von 34 kDa in Lipoproteinen beschrieben (Shore and Shore, 1973). Es ist in Chylomikronen-Remnants, VLDL, IDL und HDL zu finden und liegt im humanen Plasma in einer mittleren Konzentration von 30-50 mg/L vor. Syntheseorte sind vor allem die Leber, Makrophagen, das Gehirn aber auch das Fettgewebe. Das ApoE-Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 19 lokalisiert (Olaisen et al., 1982), es weist vier extrinsische (44, 66, 193 und 860bp) sowie drei intrinsische Bereiche auf und hat eine Gesamtlänge von 3591 bp.

ApoE wird zunächst als 317-Aminosäuren umfassendes Prä-ApoE gebildet, wobei die ersten 18 Aminosäuren das Signalpeptid bilden. Nach dem Transport in das ER wird ApoE im Golgi-Apparat an Position 194 (Threonin) glykosyliert (Wernette-Hammond et al., 1989). Dabei werden anfangs Oligosaccharide (N-Acetyl-D-Glukosamin) angeknüpft, von denen im weiteren Verlauf der Glykosylierung Zuckerreste abgespalten und wieder angefügt werden. Abschließend werden bis zu sechs N-Acetylneuraminsäurereste angefügt. Nach der Sekretion ins Plasma und dem Einbau in Lipoproteine, werden die Acetylneuraminsäurereste durch eine Neuraminidase des Endothels abgebaut. Dem Sialysierungsgrad des ApoE kommt eine regulatorische Bedeutung für den VLDL Katabolismus zu, da Partikel mit zunehmender Sialysierung schneller aus dem Plasma aufgenommen werden (Ghiselli et al., 1986). Die LDL-R-Bindedomäne befindet sich zwischen Aminosäuren 126 bis 191, wobei die Bindung durch die positiv geladenen Aminosäurereste zwischen den Aminosäuren 140 bis 160 vermittelt wird, welche komplementär zu den negativ geladenen Bindungsstellen des LDL-R sind (Weisgraber et al., 1985). Die lipidbindende Domäne befindet sich am C-Terminus des Proteins, wobei die Bindung hier durch eine amphipatische α -Helix vermittelt wird (Hasty et al., 2005).

Für das ApoE-Gen sind zahlreiche Allel-Varianten beschrieben, die drei wichtigsten sind $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$. Das $\epsilon 3$ kommt mit einer Allelfrequenz ca. 70% am häufigsten vor und gilt daher als „Wildtyp“ (Utermann, 1987). Diese genetischen Polymorphismen äußern sich phänotypisch in den Isoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4. Ursache hierfür ist ein Austausch der Aminosäuren 122 und 158, die zu einer Substitution von Cystein-112 durch Arginin (ApoE4) bzw. Arginin-158 durch Cystein (ApoE2) führen (Weisgraber et al., 1981). Durch diesen Austausch trägt ApoE2 im Vergleich zu ApoE3 eine positive Ladung weniger, ApoE4 trägt eine mehr. Diese Ladungsunterschiede führen durch eine veränderte räumliche Struktur der Proteine zu einer veränderten Bindungsaffinität zu den Lipoprotein-Rezeptoren, wobei ApoE2 praktisch nicht an den LDL-R bindet, ApoE4 hingegen eine leicht erhöhte Affinität zum LDL-R aufweist (Weisgraber et al., 1985; Weisgraber, 1990). Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Darstellung der ApoE-Primärstruktur der verschiedenen Isoformen.

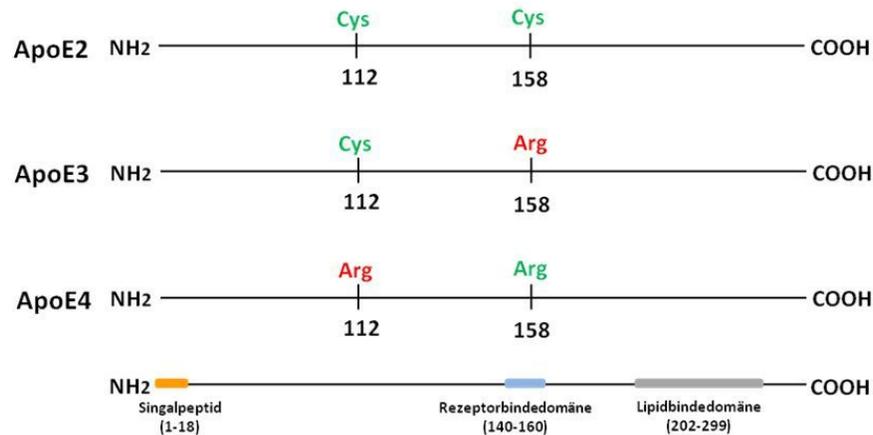


Abb.1.3 Schematische Darstellung der Primärstruktur der ApoE-Isoformen. Weitere Erläuterungen im Text.

Die ApoE-Expression wird durch die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und LXR reguliert (Laffitte et al., 2001; Yue et al., 2004; Yue and Mazzone, 2009). Weiterhin kann sie durch den Cholesterolgehalt der Zellen und Cytokine, z.B. TNF α beeinflusst werden (Mazzone et al., 1987; Ye et al., 1992; Laffitte et al., 2001; Espiritu and Mazzone, 2008; Yue and Mazzone, 2009). ApoE wird in den meisten Geweben konstitutiv sekretiert. Dabei verläuft der Weg vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und von dort in Transport-Vesikeln zur Plasmamembran. Für Cholesterol-Akzeptoren wie ApoAI, HDL und Phospholipidvesikel konnte ebenfalls eine direkte Stimulation der endogenen ApoE-Sekretion gezeigt werden (Dory, 1991; Mazzone et al., 1992; Kockx et al., 2004).

Aufgrund der Bedeutung von Makrophagen für den reversen Cholesteroltransport und der hohen ApoE-Expression in diesen Zellen, sind viele Studien zur Bedeutung des ApoE im Zusammenhang mit dem reversen Cholesteroltransport in Makrophagen durchgeführt worden. Die ApoE-Sekretion liegt dabei einer komplexen Regulation. Die basale ApoE-Sekretion ist abhängig von ABCA1, wie in Patienten mit der Tangier-Krankheit, die einen Defekt im ABCA1-Transporter aufweisen, und in Makrophagen mit inhibierter ABCA1-Aktivität gezeigt werden konnte (Von Eckardstein et al., 2001). Die Stimulation der ApoE-Sekretion durch ApoAI oder HDL ist ABCA1-unabhängig, was auf zwei unterschiedliche Wege für die ApoE-Sekretion hindeutet (Kockx et al., 2004). Die ApoE-Sekretion der Makrophagen wird durch die Proteinkinase A (PKA) und intrazelluläres Calcium-Signaling reguliert. Unter basalen Bedingungen führt die Inhibition der PKA zu einer Akkumulation von ApoE-haltigen Vesikeln in der Zelle, aber nicht zu ihrer Degradation (Muniz et al., 1996; Kockx et al., 2007). Die Komplexierung des intrazellulären Calciums und eine Inhibition der Phospholipase C und des IP $_3$ -Rezeptors führen ebenfalls zu einer verminderten ApoE-Sekretion in Makrophagen (Kockx et al., 2007).

Sowohl für Makrophagen als auch für Hepatozyten wurde beschrieben, dass das aufgenommene ApoE nicht vollständig degradiert sondern auch recycelt wird. Die ApoE-haltigen TRL-Partikel desintegrieren dabei in peripheren *Sorting*-Endosomen und das

freigesetzte ApoE gelangt in Recycling-Endosomen, von wo aus es wieder resekretiert werden kann (Heeren et al., 1999; Fazio et al., 1999; Rensen et al., 2000). Das ApoE kann dabei wiederholte Zyklen von Internalisation und Sekretion durchlaufen, wobei ca. 60% recycelt und wieder sekretiert werden (Heeren et al., 2001; Hasty et al., 2005). Bei der Stimulation der Sekretion wurde in dieser Studie allerdings nicht zwischen *de-novo* synthetisiertem oder reinternalisiertem ApoE unterschieden.

Das ApoE-Recycling kann *in vitro* und *in vivo* durch HDL induziert werden (Heeren et al., 2003). Das resekretierte ApoE liegt dabei anschließend an extrazelluläre HDL gebunden vor, wodurch die Anreicherung der CR mit ApoE sowie die hepatische *Clearance* der CR aus dem Plasma beschleunigt werden. Für ApoE4 wurde dagegen ein beeinträchtigter HDL-induzierter Recycling-Prozess beschrieben, der ebenfalls mit einem reduzierten Cholesterolefflux einhergeht (Heeren et al., 2004). Dies impliziert eine Beeinflussung des intrazellulären Cholesteroltransports durch ein beeinträchtigtes ApoE4-Recycling und stimmt überein mit dem pathophysiologischen Lipoproteinprofil homozygoter ApoE4-Träger (Davignon et al., 1988).

Die Funktion der ApoE-Sekretion für den Adipozyten ist bisher wenig untersucht, es wird eine Rolle des ApoE im Cholesterolefflux postuliert (Vassiliou and McPherson, 2004b).

1.2.2 LIPOPROTEINREZEPTOR VERMITTELTE AUFNAHME

Für die Regulation der Lipoproteinkonzentration im Plasma spielt die rezeptorvermittelte Aufnahme von Lipoproteinen eine entscheidende Rolle. Der LDL-Rezeptor ist ein im menschlichen Körper in vielen Geweben exprimiertes Glykoprotein. Er ist einer der ersten Zelloberflächenrezeptoren für den gezeigt werden konnte, dass nach Bindung eines Liganden, in diesem Fall LDL, die Endozytose des gesamten Rezeptor-Liganden-Komplexes erfolgt, wobei der Ligand in lysosomale Kompartimente dirigiert wird (Brown and Goldstein, 1986). Liganden des LDL-R sind außer LDL auch VLDL und IDL. Von der Leber sezernierte VLDL trägt eine einzige Kopie ApoB100 und eine Vielzahl von ApoE Molekülen, die zusammen die Bindung an den LDL-R vermitteln (Shelness and Sellers, 2001). Die Interaktion zwischen ApoE und dem LDL-R ist abhängig von der Lipidierung des ApoE, welche zu einer Konformationsänderung und somit zu einer vermehrten Darlegung alkalischer Aminosäurereste führt (Sehayek and Eisenberg, 1991). Weiterhin führt die LpL medierte Transformation von VLDL zu IDL zu einem erhöhten ApoE-Anteil in den IDL-Partikeln, was in einer höheren Bindungsaffinität der IDL, im Vergleich zur VLDL, zum LDL-R resultiert.

In der Leber werden die Triglyzerid-reichen Lipoproteine im Disse-Raum zunächst an der Zelloberfläche von den HSPG gebunden (Bishop et al., 2008). Im Anschluss daran werden die Remnants durch rezeptorvermittelte Endozytose, wie unter 1.1.2 beschrieben, über den LDL-R und LRP1 in die Leber aufgenommen.

Die Aufnahme wird auf der cytosolischen Membranseite durch die Anlagerung des *Adaptor-related protein complex* AP2 initiiert, der die Rezeptoren in die '*coated pits*'

dirigiert und die Anlagerung von Clathrin-Molekülen bewirkt, welche eine netzartige Struktur unterhalb der Plasmamembran bilden. Der Membranbereich stülpt sich ein, und es bildet sich ein mit Clathrin umhüllter Vesikel, der schließlich durch Dynamin von der Plasmamembran getrennt wird. Die Clathrin-Hülle zerfällt anschließend wieder in Clathrin-Monomere und löst sich von den Vesikeln ab, die mit frühen Endosomen verschmelzen (Kirchhausen, 2002). In den Endosomen sinkt der pH-Wert durch den Protonentransport der vesikulären ATPase, was im Falle der LDL zu einer Dissoziation des LDL-Rezeptors und der Bindung zu ApoB100 aus der aufgenommenen LDL führt, wobei der Rezeptor aus dem Vesikel zur Plasmamembran zurück recycelt wird. Das frühe Endosom reift über eine weitere Ansäuerung zu einem späten Endosom und fusioniert schließlich mit Prälysosomen zu einem Lysosom, in dem der Vesikelinhalt degradiert wird. LDL-R-Knockout Mäuse akkumulieren daher im Plasma LDL-Partikel (Ishibashi et al., 1993), wohingegen bei einem leberspezifischem LRP1-Knockout kein Effekt auf das Lipoproteinprofil zu beobachten ist. In Tieren mit aktivem LDL-Rezeptor kann der Effekt durch eine Aufnahme über LDL-R, welcher ebenfalls ApoE binden kann, teilweise kompensiert werden. Eine Erhöhung der TG und des Cholesterols in ApoB48-haltigen Lipoproteinen konnte aber bei LRP1-defizienten Mäusen beobachtet werden (Willnow et al., 1994; Rohlmann et al., 1998).

1.3 LIPIDSTOFFWECHSEL DES FETTGEWEBES

1.3.1 DIFFERENZIERUNG UND FUNKTION VON ADIPOZYTEN

Adipozyten entstehen durch Differenzierung aus multipotenten Stammzellen mesodermalen Ursprungs, welche die Fähigkeit besitzen sich außerdem in Muskel-, Knochen-, Knorpel- und Endothelzellen zu entwickeln (Lefterova and Lazar, 2009). Der erste Schritt der adipogenen Differenzierung verläuft über die Bildung einer frühen Vorläuferzelle, dem Adipoblast, hin zu einem determinierten Präadipozyten. Dieser exprimiert ein spezielles Muster an Transkriptionsfaktoren, die die weitere Expression adipozytenspezifischer Gene steuern. Die Zelle bildet nachfolgend einen charakteristischen adipozytären Stoffwechsel aus, der zu einer sukzessiven Akkumulation von Lipiden führt. Dabei bildet sich die typische monolokuläre Morphologie des Adipozyten, wobei das Cytoplasma fast vollständig von einer einzigen großen Lipidvakuole eingenommen und der Zellkern in die Peripherie gedrängt wird (Gesta et al., 2007).

Die adipozytäre Differenzierung wird auf molekularer Ebene durch spezifische Transkriptionsfaktoren streng reguliert und durch eine kaskadenartige Änderung der Aktivität und Expression dieser Transkriptionsfaktoren bestimmt (Rosen and Spiegelman, 2000; Rosen, 2002), was eine Verschiebung des Genexpressionsmusters zu Folge hat. Der *Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ* (PPAR γ) ist ein Mitglied der Nukleär Rezeptor Super-Familie und wird als Hauptregulator der Adipogenese angesehen. PPAR γ wird durch die *CCAAT/Enhancer Binding* Proteine C/EBP β und C/EBP δ induziert, wobei ein direkter transkriptioneller Effekt durch die C/EBP-Bindungsstellen an den PPAR γ

Promotor postuliert wird. C/EBP β und C/EBP δ werden im präadipozytären Stadium nur für einen begrenzten Zeitraum exprimiert. Die Expression von C/EBP β kann dabei durch einen hohen cAMP-Spiegel in der Zelle induziert werden, welcher ein *cAMP Response Element* in seinem Promotor trägt. PPAR γ liegt als Protein in zwei Isoformen vor, PPAR γ 1 und PPAR γ 2, die durch alternatives *Splicen* und durch unterschiedliche Promotoren entstehen (Elbrecht et al., 1996). Beide werden während der Adipogenese induziert, wobei PPAR γ 2 adipozytenspezifisch ist.

Während der Adipogenese aktiviert PPAR γ die Expression von C/EBP α . Dieser Transkriptionsfaktor trägt ein *C/EBP Response Element* und wird so, zusätzlich zu der Aktivierung durch PPAR γ , autokrin stimuliert. Er wirkt seinerseits ebenfalls aktivierend auf die PPAR γ -Expression zurück, so dass die beiden Transkriptionsfaktoren ihre Expression gegenseitig verstärken, wodurch der terminal differenzierte Zustand der Adipozyten gewährleistet bleibt.

Die Expression von PPAR γ wird durch einen weiteren Transkriptionsfaktor, den *Adipocyte Determination and Differentiation Factor 1* (ADD1), auch als *Sterol Element Binding Protein 1c* (SREBP1c) bezeichnet, stimuliert (Fajas et al., 1999). SREBP1c induziert vor allem lipogene Enzyme wie die *Fatty Acid Synthase* (FAS), Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) und Glycerophosphat Acetyltransferase 1 und 2, und sorgt so eventuell auch durch die Bereitstellung von Liganden für die Aktivierung von PPAR γ (Kim et al., 1998). Die Expression von SREBP1c wird im Fettgewebe und in der Leber durch Insulin reguliert (Shimano et al., 1999), weshalb für SREBP1c eine Schlüsselposition zwischen dem Ernährungszustand der Zellen und der Lipogenese angenommen wird. Ein weiterer Effektor der PPAR γ -Expression ist der nukleäre Hormonrezeptor *Liver X Receptor* (LXR), der sowohl die Expression von PPAR γ als auch von SREBP1c stimuliert (Seo et al., 2004).

Eine Aktivierung von SREBP1c ist für die Lipogenese notwendig, der Transkriptionsfaktor kann aber allein, im Gegensatz zu PPAR γ , dessen Aktivierung zur Induktion der Adipogenese ausreicht, keine starke adipogene Wirkung (Rosen et al., 2002). Die beiden entscheidenden Transkriptionsfaktoren sind PPAR γ und C/EBP α , da die meisten adipozytären Gene entweder ein PPAR oder *C/EBP Response Element* in ihrem Promotor tragen. PPAR γ gilt dabei als der Hauptregulator der Adipogenese, während C/EBP α hauptsächlich unterstützend auf die PPAR γ -Expression wirkt und für eine volle Ausprägung der Insulin-Sensitivität der Zellen notwendig ist (Hu et al., 1995; Rosen, 2002). C/EBP α defiziente Adipozyten zeigen keinen Insulin-abhängigen Glukosetransport, eine reduzierte Expression des Insulinrezeptors und des Insulinrezeptor Substrat 1 (IRS1) sowie deren verminderte Aktivierung (Hu et al., 1995; Wu et al., 1996b). Durch eine Koexpression von PPAR γ und C/EBP α kann *in vitro* dagegen eine Transdifferenzierung von Myoblasten zu Adipozyten erreicht werden (Hu et al., 1995).

Das Zusammenwirken der verschiedenen Transkriptionsfaktoren während der Differenzierung ist in Abb. 1.4 schematisch dargestellt.

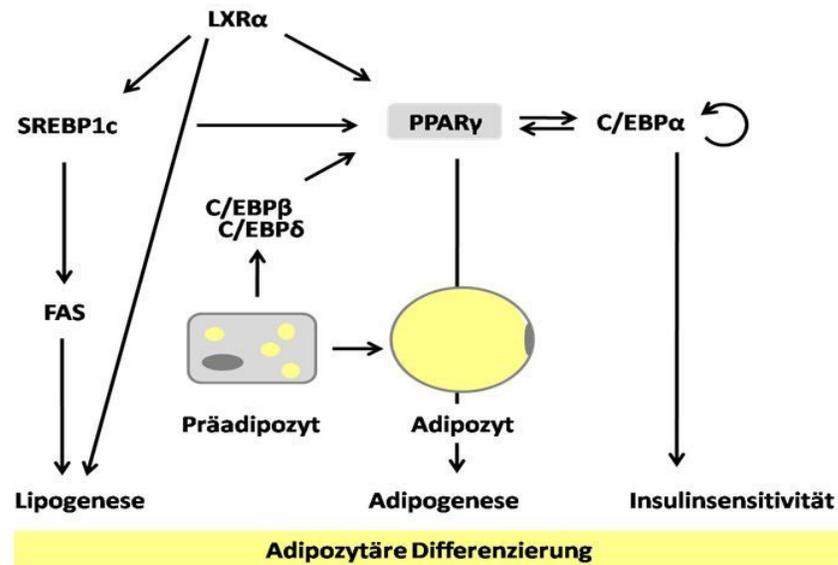


Abbildung 1.4: Regulation der adipozytären Differenzierung. Erläuterungen im Text. Die Abbildung wurde adaptiert nach Seo et al. 2004 und Rosen et al. 2006.

Die physiologischen Liganden von PPAR γ im Fettgewebe sind bislang unbekannt. Jedoch konnten viele Studien mehrfach ungesättigte Fettsäuren und verwandte Derivate als Liganden für PPAR γ bestätigen. Im Gegensatz zu anderen PPAR reagiert PPAR γ nur schwach auf native Fettsäuren, weshalb über oxidierte Fettsäuren als mögliche biologische Liganden spekuliert wird (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995; Nagy et al., 1998; Tontonoz and Spiegelman, 2008). Oxidierte Fettsäuren wie 9- und 13-Hydroxyoktadecadiensäure aktivieren PPAR γ mit höherer Effizienz als native Fettsäuren. Diese konnten in oxidiertem LDL nachgewiesen werden und sind in signifikanten Konzentrationen in atherosklerotischen Plaques zu finden (Nagy et al., 1998; Zhang et al., 2004b). Thiazolidinedione, z. B. das Rosiglitazon, sind pharmakologische PPAR γ -Agonisten und werden als Insulin-sensitivierende Substanzen in der Therapie von Diabetes mellitus Typ II eingesetzt (Lehmann et al., 1995).

Die Adipogenese unterliegt vielen weiteren exogenen Einflüssen, auf die nicht alle im Detail eingegangen werden kann. Einen wichtigen Inhibitor der Adipogenese stellen die Moleküle der *Wingless-type MMTV Intergration Site (Wnt)*-Familie dar. Diese Familie von Glykoproteinen sind bedeutende Regulatoren in der Differenzierung mesenchymaler Zellen (Logan and Nusse, 2004). Die Wnt-Signalkaskade verläuft hierbei über den transkriptionellen Regulator β -Catenin. In Abwesenheit von Wnt wird β -Catenin durch Axin und die Glykogen Synthase Kinase 3- β (Gsk3 β) phosphoryliert und infolgedessen ubiquitinyliert und proteasomal degradiert. Dies führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PPAR γ und der adipozytären Target-Gene. In Anwesenheit von Wnt bindet dies an einen Rezeptorkomplex aus *Frizzled* und den Korezeptoren LRP5 und LRP6, die als Singalrezeptoren zur Inaktivierung des Degradationskomplexes führen. Die Bindung des β -Catenins an den TCF/LEF-Komplex, führt einerseits zu der Aktivierung der osteblastären *Downstream*-Gene, gleichzeitig führt

dies zu einer Blockade von PPAR γ und C/EBP α was in einer Inhibition der Adipogenese resultiert (Ross et al., 2000). Im Gegensatz dazu führt eine Blockade des Wnt-Signalweges zu spontaner Adipogenese in mesenchymalen Präkursorzellen (Ross et al., 2000). Durch diese Beobachtungen wird dem kanonischen Wnt-Signalweg eine Schalterfunktion zugeschrieben, die falls aktiviert, die Adipogenese hemmt und somit die Osteogenese aktiviert (Zhou et al., 2008).

1.3.2 BEDEUTUNG VON LIPIDEN UND LIPOPROTEINEN FÜR DEN STOFFWECHSEL DES ADIPOZYTEN

Das Fettgewebe ist der größte Energiespeicher des Körpers. Adipozyten nehmen Nahrungslipide in Form von freien Fettsäuren und C₂-Monoacylglycerolen aus dem Blutstrom auf. Fettsäuren gelangen als Albumin-gebundene, nicht veresterte Fettsäuren (NEFAs) oder in triglyzeridreichen Lipoproteinen ins Fettgewebe (Large et al., 2004). Die endothelständige Lipoprotein Lipase spaltet die triglyzeridreichen Lipoproteine wie VLDL und Chylomikronen nach ihrer initialen Bindung an die HSPGs und GPIHBP1, vermittelt durch die Kofaktoren ApoCII und ApoAV (siehe auch 1.1.2). Im Adipozyten wird die Expression und Sekretion der LpL postprandial durch Insulin stimuliert. Im Muskel erfolgt die Regulation reziprok, die Expression wird postprandial unterdrückt. Eine Regulation der LpL erfolgt aber auch durch die Angiopoetine Angptl3 und Angptl4. Dabei wird die Expression der LpL im Hungerzustand durch Angptl3 inhibiert, postprandial durch Angptl4 erhöht (Shimizuogawa et al., 2004; Backhed et al., 2004). Die durch die LpL freigesetzten Fettsäuren werden schnell zum Teil durch spezifische Transportproteine, wie die *Fatty Acid Transporter* (FAT) oder die *Fatty Acid Translokase* (CD36) in das Fettgewebe aufgenommen. Da freie Fettsäuren ein hohes lipotoxisches Potential aufweisen, wird deren intrazellulärer Gehalt streng reguliert. Die Fettsäuren werden nach dem Eintritt in die Zellen durch das *Adipocyte lipid binding protein* (aP2) gebunden und zu ihrem Zielort transportiert (Hotamisligil et al., 1996; Abumrad et al., 1998; Fisher et al., 2002; Furuhashi et al., 2007). Die Fettsäuren werden in der Lipogenese zunächst durch die Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoA aktiviert und mit Glycerol-3-phosphat in der Lipogenese zu Triglyzeriden verestert. Da Glycerol im Adipozyten nicht wieder aktiviert werden kann, sondern über den Aquaporin-7-Transporter ausgeschleust (Kishida et al., 2000) und in die Leber transportiert wird, stellt die Synthese von Glycerol-3-Phosphat aus Glukosemetaboliten einen essentiellen Schritt für die Lipogenese der Adipozyten dar (Large et al., 2004).

Dabei wird in mehreren Schritten aus drei Fettsäuren und einem Glycerol-3-phosphat ein Triglyzerid synthetisiert. Die entstandenen TGs werden in den Lipidvesikeln (*Lipid Droplets*) der Zellen gespeichert, die zum Schutz vor intrazellulären Lipasen von einem funktionellen Proteinkomplex umgeben sind. Dieser besteht hauptsächlich aus Proteinen der PAT-Familie, zu der Perilipin, Adipophilin (ADRP) und TIP47 gehören (Bickel et al., 2009). Weitere Mitglieder sind das *Oxidativ-Tissue Enriched PAT-Protein* (OXPAT) das *Lipid Storage Droplet protein 5* (LSDP5) (Wolins et al., 2006; Dalen et al., 2007). Den größten Anteil stellt Perilipin A (Greenberg et al., 1993).

Neben der Speicherung von Triglyzeriden, die aus Lipoproteinen aufgenommen werden sind Adipozyten in der Lage *De-novo*-Lipogenese zu betreiben. Sie exprimieren alle für die Eigensynthese von Fettsäuren benötigten Enzyme. *In vitro* wird die *De-novo*-Lipogenese durch LXR α , Insulin und SREBP1c reguliert (Darimont et al., 2006). Die Lipogenese wird postprandial hauptsächlich durch Insulin vermittelt aktiviert. Dieser Effekt überschneidet sich in weiten Teilen mit der inhibierenden Wirkung des Hormons auf die Lipolyse. Die Wirkung des Insulins kann über cAMP-abhängige oder -unabhängige Mechanismen erfolgen. Insulin aktiviert über den PI3K/Akt-Signalweg die Phosphodiesterase 3B (PDE) und senkt so den cAMP-Spiegel der Zelle (Kitamura et al., 1999). Gleichzeitig werden cAMP-unabhängig Proteinphosphatasen aktiviert (Stralfors and Honnor, 1989). Dadurch wird eine Abnahme des Phosphorylierungsstatus bestimmter Proteine, entweder durch direkte Dephosphorylierung oder durch eine verminderte Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) bewirkt. Weiterhin führt dies zu einer Stabilisierung des Perilipins am *Lipid Droplet* und somit zu einer Hemmung der lipolytischen Enzyme. Enzyme der Fettsäuresynthese wie Acyl-CoA Carboxylase und FAS werden dabei aktiviert (Witters and Kemp, 1992). Abbildung 1.5 zeigt eine schematische Übersicht der Lipogenese und Lipolyse im Adipozyten.

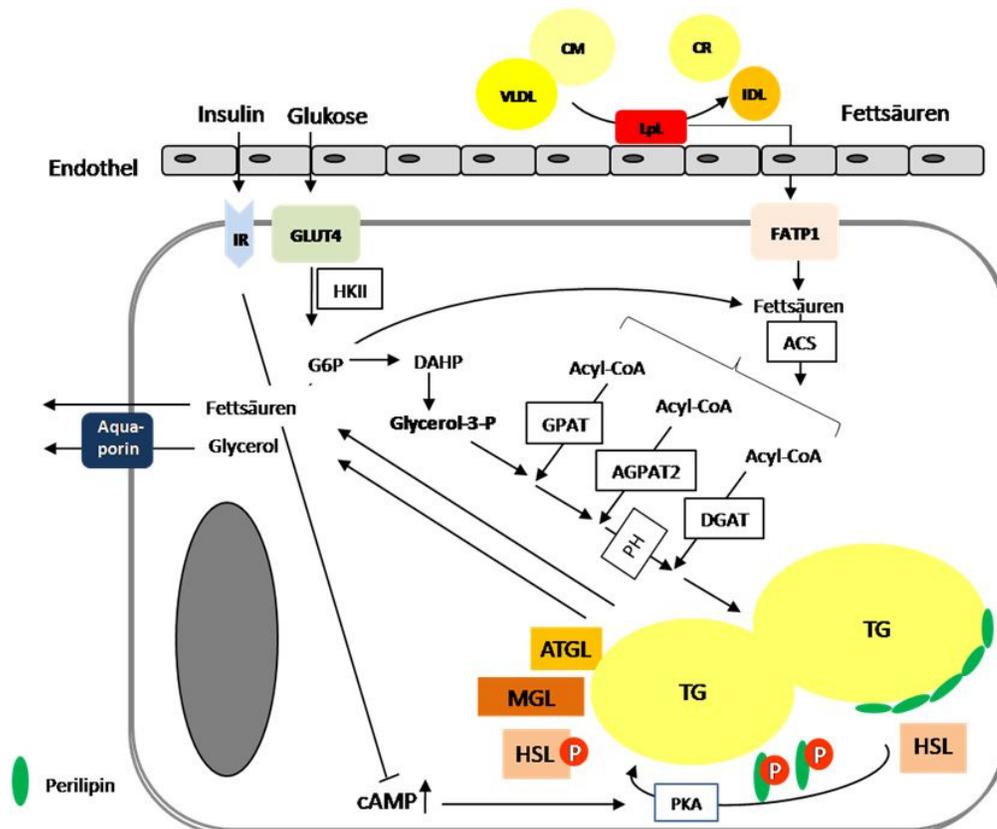


Abb.1.5: Schematische Darstellung von Lipogenese und Lipolyse im Adipozyten
Die Abbildung wurde adaptiert nach Large et al, 2004. Weitere Erläuterungen im Text.

Insulin führt weiterhin zu einer Reduktion der β -adrenergen Rezeptoren an der Zelloberfläche, wodurch die Zelle gegenüber lipolytischen Stimuli desensitiviert wird.

Unter katabolen Stoffwechselbedingungen führt die Bindung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin an die β -adrenergen Rezeptoren der Adipozyten zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und somit zu einer Erhöhung cAMP-Synthese (Nonogaki, 2000). Der intrazelluläre Anstieg des cAMP kann auch durch Abnahme der Insulinwirkung, durch Aufhebung der PDE-Aktivierung, sowie durch Glukagon beeinflusst werden. Glukagon wird in der präprandialen Phase von den α -Zellen des Pankreas ausgeschüttet und wirkt, hauptsächlich in der Leber, antagonistisch zu Insulin. Dort aktiviert durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Glukagonrezeptoren die Adenylatzyklase. Merida et al. konnten Glukagonrezeptoren auch für humane Adipozyten beschreiben (Merida et al., 1993), so dass eine Wirkung von Glukagon auf das Fettgewebe denkbar ist.

Der Anstieg des cAMP-Spiegels führt zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA, die Perilipin A als auch die hormonsensitive Lipase (HSL) phosphoryliert. Dies führt zu einer Dislokation des Perilipin A vom Lipid Droplet, die durch Phosphorylierung aktivierte HSL kann nun an die Oberfläche des *Lipid Droplets* translozieren und hat damit Zugang zu ihrem Substrat. Das sehr hydrophobe Perilipin wird dabei vermutlich nicht ins Cytosol verlagert, sondern an kleinere Lipidvesikel verschoben (Marcinkiewicz et al., 2006). Die HSL hydrolysiert sowohl Tri-, Di- und Monoacylglycerole als auch Cholesterolester (Kraemer and Shen, 2002). Die HSL spaltet Fettsäuren hauptsächlich an der C₁ und C₃-Position, die Monoacylglycerol Lipase (MGL) hydrolysiert anschließend die verbleibende C₂-Bindung. Im Adipozyten sind die Substrate der HSL hauptsächlich Triacylglyceride. Die lipolytische Aktivität der HSL kann durch die Bindung von Fettsäuren an den α 2-Proteinkomplex erhöht werden (Shen et al., 2001); (Jenkins-Kruchten et al., 2003). Das α 2 übernimmt so die freiwerdenden Fettsäuren aus der Lipolyse und führt sie ihrem Zielort zu. Für Adipozyten ist eine weitere Lipase, die Adipose Triglyceride Lipase (ATGL), beschrieben worden. Diese Lipase ist hochspezifisch und katalysiert den initialen Schritt der Lipolyse (Zimmermann et al., 2004). ATGL-Knockout-Mäuse zeigen ektopische Triglyceridspeicherung, welche die in einer Herzdyfunktion resultiert. Die weisen außerdem eine mangelhafte Kälteadaptation und eine erhöhte Insulin-Sensitivität (Haemmerle et al., 2006) auf, wodurch für die ATGL ebenfalls eine Rolle in der Energiehomöostase vermutet wird. Eine Unterdrückung der HSL in diesen Knockout-Mäusen resultiert einem nahezu vollständigen Verlust der Fettsäurefreisetzung der Adipozyten, was vermuten lässt, dass weitere für Adipozyten beschriebene Lipasen (z.B. GS2, PNPLA1, TGH-1, TGH-2) für die Lipolyse nur eine untergeordnete Rolle spielen (Lafontan and Langin, 2009).

Die durch die Lipolyse freigesetzten Fettsäuren werden entweder reverestert oder in die Blutbahn ausgeschüttet. Das Fettgewebe stellt nahezu die einzige Quelle für Plasmafettsäuren dar, wodurch die Fettsäurekonzentration im Cytosol des Adipozyten automatisch den Gehalt freier Fettsäuren im Blut bestimmt.

1.3.3 APOE-FUNKTION IM ADIPOZYTENSTOFFWECHSEL

Gleichwohl das ApoE schon lange als wichtiger Regulator im Lipoproteinstoffwechsel bekannt ist, ist über seine Funktion im Adipozytenstoffwechsel bislang wenig bekannt. 1991 wurde von Zechner et al. erstmals die Expression von ApoE in murinen 3T3-L1 Adipozyten und primären humanen Adipozyten beschrieben. Weiterhin konnte eine zunehmende ApoE-Expression in Abhängigkeit vom steigenden Lipidgehalt der Zelle beschrieben werden, die durch eine Cholesterobeladung der Zellen noch weiter erhöht werden kann (Zechner et al., 1991). Die lipidinduzierte, nicht aber die basale Expression von ApoE wird in Adipozyten durch die Transkriptionsfaktoren LXR α und LXR β reguliert (Laffitte et al., 2001). Die Expression kann *in vitro* und *in vivo* durch die Gabe von PPAR γ -Agonisten verstärkt werden (Yue et al., 2004; Yue and Mazzone, 2009). ApoE spielt eine wichtige Rolle für die Lipidaufnahme und die Regulation der Energiehomöostase im Fettgewebe und den Adipozyten. Pathophysiologisch ist somit zu erwarten, dass adipozytäres ApoE auch an der Entstehung des Metabolischen Syndroms, zu dem vor allem die Manifestation einer Insulin-Resistenz, aber auch das gemeinsame Auftreten von Bluthochdruck, koronarer Herzkrankheit, Adipositas und Diabetes mellitus Typ II zählen, beteiligt ist.

In adipösen Mäusen wurde gezeigt, dass die Expression von ApoE in Adipozyten in Zusammenhang mit Adipositas und unter Einfluss des proinflammatorischen Cytokins TNF α abnimmt, durch Fasten und Gewichtsverlust aber wieder gesteigert werden kann (Yue et al., 2004; Huang et al., 2007; Yue and Mazzone, 2009). ApoE-defiziente Mäuse zeigen gegenüber Wildtyptieren ein reduziertes Fettgewebe. Auch in Kombiantion mit adipösen Mausmodellen wie Leptin-defizienten (*ob/ob*) oder Insulin-resistenten (*ay/+*) Mäusen zeigen die zugleich ApoE-defizienten Tiere unter Einfluss einer Hochfettdiät eine geringere Fettakkumulation, eine verbesserte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität, was auf eine protektive Funktion des ApoE hinweist (Chiba et al., 2003; Huang et al., 2007; Gao et al., 2007; Karagiannides et al., 2008). Es wurde postuliert, dass möglicherweise eine beeinträchtigte VLDL-Sezernierung der Leber zu verringertem Körpergewicht und verringerter Fettgewebsentwicklung führt. In Adipozyten interagiert ApoE mit dem VLDL-Rezeptor, welcher die Hydrolyse der TG durch die LpL ermöglicht (Chiba et al., 2003; Takahashi et al., 2004). Huang et al. vermuten, dass von Adipozyten sezerniertes ApoE *in vitro* die TG-Aufnahme in die Adipozyten vermittelt. Das Fehlen von endogenem ApoE in den Adipozyten führt zu einer stark verringerten TG-Aufnahme aus VLDL. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit PPAR γ -Agonisten zu einer erhöhten ApoE-Expression und TG Synthese in Wildtyp-Adipozyten führt. Die gleiche Stimulation führt in ApoE-Knockout Adipozyten aber zu signifikant weniger TG-Synthese und TG-Akkumulation was für das adipozytäre ApoE eine Rolle in der intrazellulären Lipidspeicherung möglich erscheinen lässt (Chiba et al., 2003; Huang et al., 2009).

Epidemiologische Studien beim Menschen haben gezeigt, dass eine Verbindung zwischen den ApoE-Polymorphismen und erhöhtem Körpergewicht, vor allem im abdominalen Fettgewebe, und erhöhter Plasma-VLDL-Level besteht (Pouliot et al., 1990).

Mäuse, die das humane ApoE3 exprimieren nehmen unter Einfluss einer Hochfettdiät mehr Gewicht zu, verglichen mit Mäusen mit humanem ApoE4-Transgen. Allerdings zeigen die hApoE4-transgenen Mäuse früher eine beeinträchtigte Glukosetoleranz als die hApoE3-transgenen. Dies ist auf ein Versagen der ApoE4-exprimierenden Adipozyten zurückzuführen, die die Fähigkeit verloren haben postprandiale Lipide und Glukose aufzunehmen (Arbones-Mainar et al., 2008). Die Autoren konnten ebenfalls durch eine adenovirale Expression von humanem ApoE3 in ApoE-defizienten Adipozyten die mRNA Expression von Adiponektin induzieren, wohingegen kein Anstieg der Adiponektin-mRNA bei Expression von ApoE4 gezeigt werden konnte. Das humane ApoE4-Transgen führt allerdings zu einer Erhöhung der GLUT1- Expression, aber nicht von GLUT4, was einen Einfluss von ApoE4 auf Insulin-regulierte Signalwege wahrscheinlich macht. Allerdings konnte auch mit diesen Studien nicht abschließend geklärt werden, welche Bedeutung ApoE bei der Regulation des adipozytären Stoffwechsels einnimmt.

1.4 FRAGESTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die Lipoproteinsekretion sowie die Lipoproteinaufnahme in humane Adipozyten und somit die Bedeutung der Lipoproteine, besonders des Apolipoprotein E, für den humanen Adipozytenstoffwechsel zu untersuchen. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wird ein humanes Adipozytenmodell verwendet, welches kürzlich im Insitut für Biochemie und Molekularbiologie II etabliert wurde (Prawitt et al., 2008). Ausgehend von einer molekularen Charakterisierung dieser Zellen, die eine zunehmende Expression der Lipoproteinrezeptoren LDL-R und LRP1 und der Apolipoproteine C und E im Differenzierungsverlauf gezeigt hat, soll zunächst die Frage untersucht werden, in welcher Form ApoE von humanen Adipozyten sekretiert wird und welchen regulatorischen Mechanismen diese Sekretion unterliegt. Im zweiten Teil soll die ApoE-vermittelte Aufnahme von Lipoproteinen in humane Adipozyten untersucht werden. Weiterführend soll im letzten Teil der Arbeit mittels lentiviral vermittelter siRNA-Expression, die gegen ApoE-Sequenzen gerichtet sind, die Bedeutung des ApoE für die Adipozytenfunktion im Hinblick auf die adipozytäre Differenzierung untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

VORBEMERKUNGEN

Alle nicht näher spezifizierten Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Fluka Chemika (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva Electrophoresis (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim) in analytischer Qualität bezogen. Ebenso wurden alle Verbrauchsmaterialien (Reaktionsgefäße, Pipetten, Pipettenspitzen etc.) sofern nicht anders angegeben von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Kremsmünster, A) und BD Biosciences (Erembodegem, B) bezogen. Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden von Nunc (Roskilde, Dänemark), Sarstedt (USA) und Falcon (Becton Dickinson Labware, USA) bezogen.

Konzentrationsangaben erfolgen in Molalität oder aus Praktikabilitätsgründen in % (w/v) bei Feststoffen und % (v/v) bei Flüssigkeiten.

2.1 ZELLINIEN

- hMSC-Tert T20, humane mesenchymale Stammzelllinie (Simonsen et al. 2002)
- hMSC-Tert20-shControl
- hMSC-Tert20-shApoE
- hMSC-Tert20-Empty-Lenti
- hMSC-Tert20-hApoE3-Lenti
- primäre humane Präadipozyten aus visceralem Fettgewebe

Die shRNA-Knockdown und lentiviral-vermittelten Überexpressionskonstrukte wurden von Dr. Alexander Laatsch freundlich zur Verfügung gestellt.

2.2 ADIPOZYTÄRE DIFFERENZIERUNG

Material

- CO₂-Brutschrank CB210 (Binder, Tuttlingen)
- CASY[®] Cell Counter + Analyser System Model TT (Schärfe System, Reutlingen)
- Inverses Lichtmikroskop CKX31 (Olympus, Hamburg)
- sterile Werkbank Hera Safe (Heraeus, Hanau)
- Wasserbad

2.2.1 ADIPOZYTÄRE DIFFERENZIERUNG VON HMSC-TERT ZELLEN

Material

- BSA fettsäurefrei (31-002, PAA)
- PBS (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- Trypsin-EDTA 1x (GIBCO 25300-054, Invitrogen)
- Penicillin-Streptomycin 10.000 units/mL (GIBCO 15140-122, Invitrogen)
- DMEM +1 g/L Glucose +GlutamaxI +Pyruvate (GIBCO 21885-025, Invitrogen)
- DMEM +4,5 g/L Glucose +GlutamaxI +Pyruvate (GIBCO 31966-021, Invitrogen)
- Foetal Bovine Serum (DE 14-802F, Lonza)
- Dexamethason (D4902, Sigma)
- Isobutylmethylxanthin IBMX (I5879, Sigma)

- Insulin human 10 mg/mL (I9278, Sigma)
- Rosiglitazon (71740, Cayman)
- U0126 (662005, Calbiochem)

Medien

- Kulturmedium: DMEM 4,5 g/L Glukose, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin
- Standardmedium: DMEM 4,5 g/L Glukose, 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin
- Differenzierungsmedium: Standardmedium mit Differenzierungszusätzen 0,1 μ M Dexamethason, 450 μ M IBMX, 2 μ M Insulin, 1 μ M Rosiglitazon, 1 μ M U0126
- Hungermedium: DMEM 1 g/L Glukose, 0,1% BSA, 1% Penicillin/Streptomycin

Stocklösungen der Differenzierungszusätze in DMSO (IBMX, Rosiglitazon, U0126) oder DMSO/Wasser (Dexamethason) werden in 200 μ L Aliquots bei -20°C gelagert.

Methode

Die mesenchymalen Stammzellen hMSC-Tert werden in Kulturmedium passagiert. Für eine adipozytäre Differenzierung werden die Zellen in Kulturmedium mit einer Dichte von 25.000 Zellen/cm² und 1 mL Medium/Well in 24well-Platten ausgesät. Standardmäßig differenzieren die Zellen in den 24wells auf Cover Slips, um zu jedem Zeitpunkt Zellen für Versuche entnehmen zu können. Nach zwei Tagen (Zeitpunkt definiert als Tag 0), wenn die Zellen 80-100% konfluent sind, wird die Differenzierung induziert. Dafür werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 mL Differenzierungsmedium pro Well inkubiert. Dieses wird dreimal pro Woche erneuert, die Zusätze dabei jedes Mal frisch dem Medium zugesetzt. An Tag 12 der Differenzierung werden die Zellen mit PBS gewaschen und auf Standardmedium gesetzt. Dieser Vorgang dient dem Auswaschen der Differenzierungszusätze aus den Zellen. An Tag 14 wird die Differenzierung beendet. In 6- und 12well-Platten wird die Differenzierung nach demselben Protokoll durchgeführt mit einer Ausgangszellzahl von 150.000 Zellen/cm² bzw. 50.000 Zellen/cm² und 2mL bzw. 1 mL Medium pro Well.

2.2.2 PRÄPARATION UND ADIPOZYTÄRE DIFFERENZIERUNG VON PRIMÄREN

HUMANEN PRÄADIPOZYTEN

Material

- steriles Präparierbesteck (Scheren, Pinzetten, etc)
- DMEM/F-12 (GIBCO 21765-029, Invitrogen)
- HBSS (GIBCO 14175-053, Invitrogen)
- Erythrozyten-Lysepuffer (154 mM Ammoniumchlorid, 10 mM Kaliumhydrogencarbonat, 0.1 mM EDTA in H₂O dest., steril filtriert)
- Collagenase I (LS004196, Worthington Biochemical Corporation, USA)
- Fetal Calf Serum (DE14-802F, Lonza)
- Biotin (B4639, Sigma)
- Pantothenat (P5155, Sigma)
- Dexamethason (D4902, Sigma)
- IBMX (I5879, Sigma)
- Insulin (I9278, Sigma)
- Rosiglitazon (71740, Cayman)

- T3 (T6397, Sigma)
- Transferrin (T8158, Sigma)

Stocklösungen der Differenzierungszusätze in DMSO (IBMX, Rosiglitazon, U0126) DMSO/Wasser (Dexamethason) oder Wasser (Biotin, Pantothenat, T3, Transferrin) werden in 200 µL Aliquots bei -20°C gelagert.

Medien

- Kulturmedium: DMEM/F-12, 20% FCS, 2% Penicillin/Streptomycin
- Standardmedium: DMEM/F-12, 1% Penicillin/Streptomycin, 33 µM Biotin, 17 µM Pantothenat
- Differenzierungsmedium I: DMEM/F-12, 1% Penicillin/Streptomycin, 33 µM Biotin, 17 µM Pantothenat, 0,01 mg/mL Transferrin, 50 nM Insulin, 1nM T3, 100 nM Dexamethason, 450 µM IBMX, 1 µM Rosiglitazon
- Differenzierungsmedium II: DMEM/F-12, 1% Penicillin/Streptomycin, 33 µM Biotin, 17 µM Pantothenat, 0,01 mg/mL Transferrin, 50 nM Insulin, 1 nM T3

Methode

Viscerales Fettgewebe wird bei operativen Eingriffen aus dem Bauchraum der Patienten entnommen, in Kulturmedium schnell auf Eis ins Labor gebracht und dort sofort mittels Collagenase-Verdau aufgeschlossen. Dafür wird das präparierte Fettgewebe zunächst mit HBSS gewaschen und die sichtbaren Blutgefäße mit einer sterilen Schere entfernt. Anschließend wird das Gewebe grob mit einer Schere zerkleinert, in HBSS mit 2 mg/mL Collagenase I überführt und für 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad schüttelnd inkubiert. Das Lysat wird durch einen *Cellstrainer* (Porengröße 70 µM) gefiltert, um größere Gewebereste zu entfernen und 10 min bei 800 g zentrifugiert. Die stromal-vaskuläre Fraktion befindet sich dabei im Pellet, wobei Adipozyten und Triglyzeride, die aus geplatzten Adipozyten stammen, oben flotieren. Das Zellpellet wird in frischem Kulturmedium resuspendiert und ein weiteres Mal durch einen Cellstrainer (Porengröße 40 µM) gefiltert. Das Filtrat wird wiederum zentrifugiert und das Pellet in Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert, um in der Präparation befindliche Erythrozyten zu lysieren. Dieser Schritt wird so häufig wiederholt bis das Zellpellet weiß erscheint.

Die Zellen werden gezählt und mit einer Dichte von 150.000/cm² in eine 12well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag (definiert als Tag 0) werden die Zellen mit PBS gewaschen und die Differenzierung mit Differenzierungsmedium I induziert. Das Differenzierungsmedium wird alle zwei Tage gewechselt, wobei die Differenzierungszusätze jedes Mal frisch zugegeben werden. An Tag 5 der Differenzierung werden die Zellen mit PBS gewaschen und weiter mit Differenzierungsmedium II inkubiert. An Tag 12 werden hier ebenfalls, wie bei den hMSC-Tert-Zellen, die Differenzierungszusätze ausgewaschen und die Zellen bis zum Ende der Differenzierung an Tag 14 mit Standardmedium inkubiert.

2.3 MOLEKULARBIOLOGIE

2.3.1 PRÄPARATION VON RNA

Material

- TRIzol (15596018, Invitrogen)
- Ethanol 96% p.a.
- Isopropanol 100% p.a.
- NucleoSpin RNA II (740955.250, Macherey-Nagel, Düren)
- Tischzentrifuge (Sigma 1-15K)
- Nanodrop (ND-1000, Peqlab, Erlangen)

Methode

Um die Expression charakteristischer adipozytärer Marker und Gene des Lipoproteinstoffwechsels auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten Gesamt-RNA aus den Zellen präpariert. Die Zellen werden dafür direkt im Well mit TRIzol lysiert. Durch Zugabe von Chloroform zum Lysat erfolgt eine 3-Phasentrennung, wobei sich die Gesamt-RNA in der oberen wässrigen Phase befindet. Daraus wird die RNA durch Zusatz von Isopropanol gefällt und die Lösung anschließend auf eine RNA-Säule (NucleoSpin RNAII, Macherey-Nagel) gegeben. Das weitere Verfahren erfolgt nach Angaben des Herstellers. Die RNA wird in 40 µL RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration der Probe mit dem Nanodrop mittels einer photometrischen Messung abgeschätzt. Dafür wird die Absorption bei 260 nm bestimmt. Es gilt $A_{260} = 1,0$ entspricht 40 µg/mL RNA. Der Quotient A_{260}/A_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Probe, der optimale Wert für RNA liegt bei 2.

2.3.2 SCHREIBEN VON cDNA

Material

- RNA
- High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368813, Applied Biosystems Inc.)
- PCR-Softstrips 0,2mL (710988, Biozym, Hess.Oldendorf)
- T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen)

Methode

Für die Umschreibung in cDNA wird 1 µg RNA verwendet. Durch die Verwendung von Oligo(dT)-Primern, die an die Poly(A)Schwänze der mRNA binden, wird nur die messenger-RNA in cDNA umgeschrieben. Die Reaktionsansätze setzen sich wie folgt zusammen:

Reverse Transcription Buffer (10x)	5µL
Random Primer (10x)	5µL
dNTP Mix (25x)	2µL
MultiScribe Reverse Transkriptase (50U/µL)	2,5µL
RNAseInhibitor (20U/µL)	2,5µL
Nuklease-freies H ₂ O	8µL
	25µL
<u>1µg RNA (in 25µL nuklease-freiem H₂O)</u>	<u>25µL</u>
	50µL

Die Reaktion verläuft nach folgendem Protokoll: 10 min 25°C, 120 min 37°C, 5 sec 85°C.

2.3.3 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (TAQMAN[®])

Um die Expressionshöhe bestimmter Gene quantitativ zu untersuchen, wurde das TaqMan[®] Quantitative PCR System verwendet. Hierbei wird zusätzlich zu den Primern der PCR-Reaktion ein weiteres Oligonukleotid, die Taqman[®]-Sonde, zugefügt. Diese Sonde bindet sequenzspezifisch die Template-DNA im Bereich des zu amplifizierenden Fragments. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert. Reporter sind Fluoreszenzfarbstoffe, die jeweils durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Quencher sind Reaktionspartner, die in Form von Licht aufgenommene Energie als Schwingungsrelaxation abgeben. Das Anregungsspektrum des Quenchers entspricht dabei dem Emissionsspektrum des Reporters, so dass durch die räumliche Nähe das vom Reporter emittierte Licht vom Quencher absorbiert wird, der wiederum über Schwingungsrelaxation die aufgenommene Energie abbaut. Das TaqMan[®]-Prinzip nutzt hierbei die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase aus. Bei der Elongation trifft die Taq-DNA-Polymerase nach Anlagerung der Primer auf das 5'-Ende der Sonde und baut dieses während der Synthese des Gegenstranges ab. Dadurch wird die räumliche Nähe von Reporter und Quencher aufgehoben, wodurch das vom Reporter emittierte Fluoreszenzsignal sichtbar wird und gemessen werden kann. In Abb.2.1 ist dieser Vorgang schematisch dargestellt.

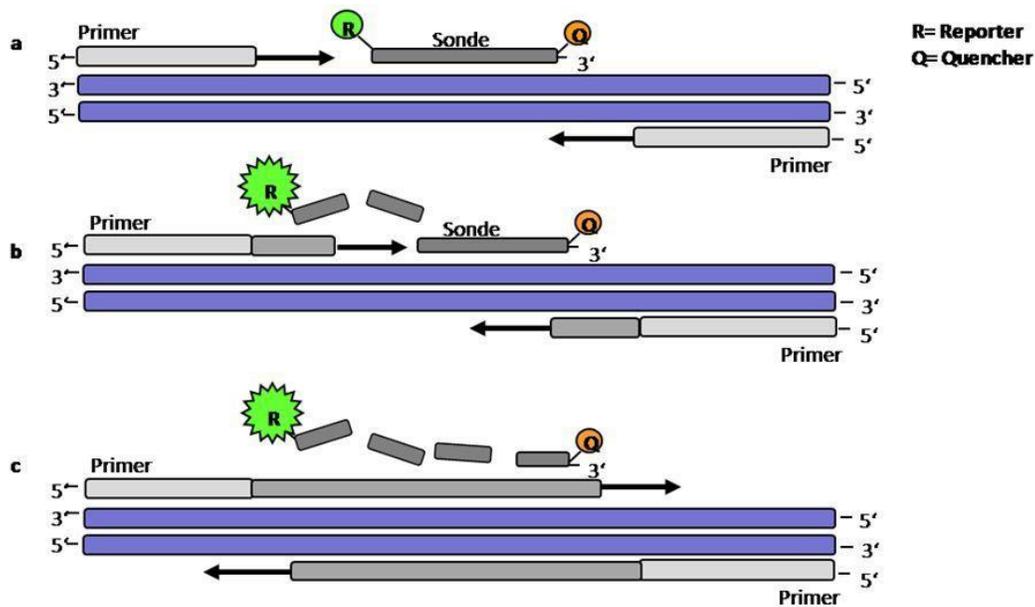


Abb.2.1 Schematische Darstellung des TaqMan®-Prinzips

Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgt während jedes PCR-Zyklus, wobei das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des PCR-Produktes in der Reaktion ansteigt. Im Bereich der exponentiellen Phase dieses Anstiegs wird für jede Messung signifikant über der Grundlinie ein Fluoreszenzschwellenwert festgelegt. Über diesen Weg wird der sogenannte Ct-Wert der Probe bestimmt, der definiert ist als die Zyklusanzahl, bei der das Fluoreszenzsignal den festgelegten Schwellenwert übersteigt. Der Ct-Wert wird in jeder Probe für das zu untersuchende Gen sowie für das Referenzgen, *Tata-box-binding protein* (TBP), dessen Expression im untersuchten System nicht reguliert wird, gemessen und der ermittelte Ct-Wert der Probe wird auf den des Referenzgens normalisiert.

Material

- cDNA
- Assays on Demand (TaqMan® Sonden)
- Universal PCR Master Mix, NoAMP®Erase UNG (4324020, Applied Biosystems Inc.)
- steriles nukleinsäurefreies H₂O, (Aqua ad iniectabilia SN881514, Braun)
- Mikrotiterplatten 96well-Format V-Form
- Mikrotiterplatten 384well-Format
- Tecan Genesis Freedom 200 Pipettierroboter mit Bedinsoftware (Tecan)
- Hettich RotiLab Zentrifuge mit Einsätzen für Mikrotiterplatten
- ABI Prism. 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems Inc., USA)

Verwendete Taqman® Sonden (Assays-on-Demand, AoD)

AoD	Gen	Kontextsequenz	Assay-ID
hAdipoq	Adiponektin	AGGAGATCCAGGTCTTATTGGTCCT	Hs00605917_m1
hApoE	ApoE	CAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACG	Hs00171168_m1
hCEBPα	CEBPα	AAATCGTGCCTTGTCATTTTATTG	Hs00269972_s1
hFABP4 (aP2)	Fatty-acid-binding-Protein 4	TATGAAAGAAGTAGGAGTGGGCTTT	Hs00609791_m1
hLDLR	Low density Lipoprotein Receptor	CTCACCAAGCTCTGGGCGACGTTGC	Hs00181192_m1
hLRP1	Low density Lipoprotein Receptor Related Protein 1	CAGTCTGCACCACGTGGAACAGATG	Hs00233899_m1
	hPPARγ Hs00234592_m1	Peroxisome Proliferator Agonist ATTCTCAGTGGAGACGCCAGGTT	
	Rezeptor γ		
hSLC2A4	Glukosetransporter 4, GLUT4	ACAGATAGGCTCCGAAGATGGGGAA	Hs00168966_m1
hTBP	TATA-box-binding-Protein	AAGCAGGTAACACAGGAAGGTGAAG	Hs00270322_m1
hVLDLR	Very Low Density Lipoprotein Rezeptor	AAACTGTGGCAATATAACATGTAGT	Hs00182461_m1

Tabelle 2.1 Verwendete Assays-on-Demand (TaqMan® Sonden)

Methode

Für die quantitative Real Time-PCR werden die Reaktionsansätze wie folgt zusammen gestellt:

Universal Master Mix	15µL
AoD	1,5µL
nukleinsäurefreies H ₂ O	8,5µL
	25µL
cDNA (1:5 verdünnt)	5µL
	Σ 30µL

Die Reaktionsansätze werden in eine 96well Mikrotiterplatte pipettiert, gemischt und 2 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Anschließend werden die Proben mit dem Tecan Genesis Freedom 200 Pipettierroboter von den 96well- in eine 384well Mikrotiterplatte umpipettiert, wobei aus jedem Ansatz ein 4fach Wert pipettiert wird. Die 384well-Platten werden noch einmal für 2 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und mit einer hitzebeständigen Folie verschlossen.

Die Reaktion verläuft nach folgendem Protokoll: 10 min 95°C, 40 Zyklen mit 15 sec 95° und 1 min 60°C.

2.4 PROTEINCHEMIE

2.4.1 HERSTELLUNG VON GESAMTZELLYSAT

Material

- Zellyispuffer (50 mM Tris pH 8, 2 mM CaCl₂, 80 mM NaCl und 1% Triton X-100)
- Complete Mini Proteinase Inhibitor Cocktail (11836153001, Roche), PIC

Methode

Zur Herstellung von unfraktionierten Proteinproben aus Zellen werden diese zweimal kaltem PBS gewaschen und in Zelllysispuffer, dem vorher frisch 1:1000 PIC zugesetzt wird, abgelöst. Das Lysat steht mindestens 5 min auf Eis und wird dann 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dabei sedimentieren vor allem die Zellkerne, cytosolische Proteine und nicht integrale Membranproteine befinden sich im Überstand. Der Überstand wird abgenommen und in ein neues Reagiergefäß überführt. Die Proben werden bei -20°C gelagert.

2.4.2 HERSTELLUNG VON MEMBRANPROTEINFRAKTIONEN**Material**

- Homogenisierungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM MgCl₂, 0,25 M Saccharose, PIC 1:1000)
- Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 2 mM CaCl₂, 80 mM NaCl, 1% Triton X-100, PIC 1:1000)
- Ultrazentrifuge (TL-100, Festwinkelrotor 100.2, Beckmann)
- Ultrazentrifugenröhrchen (347287, Beckmann)
- Einmal Kanülen Gr.20, 27" (4657705, Braun)
- Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG - IKA-Labortechnik, Staufen)

Methode

Die Zellen einer 24well-Platte werden für die Herstellung membranangereicherter Proteinfractionen in 1,2 mL Homogenisierungspuffer vereinigt. Den Proben wird ein Proteaseinhibitor im Verhältnis 1:1000 zugesetzt und anschließend im Ultra-Turrax homogenisiert, um die Zellen zu vereinzeln. Zur Abscheidung großer Aggregate wird 15 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert und die Zentrifugation mit dem abgenommenen Überstand wiederholt. Nachfolgend werden in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g und 4°C für eine Stunde die Membranen sedimentiert, während die zytosolischen Proteine in Lösung bleiben. Das Pellet wird vorsichtig mit einer 27"-Kanüle in 0,2 mL resuspendiert. Eine weitere Ultrazentrifugation bei 100.000 g und 4°C für 30 min lässt hauptsächlich Kernmembranen und Mitochondrien absinken, während sich im Überstand Membranen der Plasmamembran, des Golgi-Apparates, des Endoplasmatischen Retikulums, sowie Lysosomen und Mikrosomen anreichern.

2.4.4 PROTEINBESTIMMUNG MITTELS SDS-LOWRY**Material**

- 0,1N NaOH
- Lösung A (1% Na₂CO₃, 0,02% NaK-Tartrat, 0,01% CuSO₄ und 0,1% SDS in 0,1 N NaOH)
- Lösung B (0,5% CuSO₄, 5% SDS in H₂O dest.)
- Lösung C (A+B im Verhältnis 50:1)
- Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (1.09001.050, Merck)
- Biotrak II Plate Reader und Software Biochrom Data Capture (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)
- Albumin-Standard (23209 Thermo Scientific, USA)

Methode

Die Proteinkonzentration aller hergestellten Proben wurde im mittels SDS-Lowry bestimmt, einem modifizierten Protokoll der ursprünglich beschriebenen Methode von Lowry et al. Dabei werden 20 µL der Probe 1:5 in 0,1 N NaOH verdünnt. Von einer Lösung C wird 1 mL dazugegeben und für 10 min bei RT inkubiert, wobei je ein Kupferion mit mindestens zwei Peptidbindungen des Proteins einen rotvioletten Farbkomplex bildet. Anschließend werden 100 µL Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz, frisch 1:1 in Wasser verdünnt, hinzugefügt. Dieses wird durch bestimmte Aminosäuren im Protein (vor allem Tyrosin und Tryptophan) unterstützt vom Kupfer-Protein-Komplex reduziert, wobei eine tiefblaue Färbung entsteht. Die Proben werden für 30 min im Dunkeln inkubiert und dann das Absorptionsmaximum der Probe bei 760 nm im ELISA-Plattenreader gemessen. Mit Hilfe einer durch BSA-Standardlösungen ermittelten Eichgerade (0-2mg/mL) wird die Proteinkonzentration bestimmt.

2.4.5 SDS-PAGE

Material

- Fertiggel-Elektrophoreseapparatur Xcell Sure Lock™ (EI0001, Invitrogen)
- Gradientengele NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gele (NP0321, Invitrogen)
- Laufpuffer NuPAGE® MES SDS Running Buffer 20x (NP0002, Invitrogen)
- Probenpuffer: 1 Volumenteil Mercaptoethanol, 1 Volumenteil 87% Glycerin mit Bromphenolblau, 2 Volumenteile 10% SDS in 50 mM Tris-HCl pH 8
- Regenbogenmarker (RPN800E, Amersham GE Healthcare, USA)

Methode

Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte in 4-12%igen Gradientengelen in einem MES-SDS-Puffer System. Die Proben werden dafür im Verhältnis 6:4 mit Probenpuffer gemischt und vor dem Auftragen bei 60°C für 10 min denaturiert. Die Spuren des Gels werden standardisiert mit gleichen Proteinmengen beladen. Als Massenkontrolle dient ein gefärbter Proteinstandard. Die Proteine werden im Gel bei 100 V für ca. 45 min aufgetrennt.

2.4.6 WESTERN BLOT

Material

- Elektrobplot-Apparatur, Mini Trans Blot (Protean3) (170-3930, Bio Rad)
- Nitrocellulosemembran, Protran® 0,45 µm Porengröße (10401196, Schleicher&Schüll)
- Blottingpuffer: 150 mM Glycin, 20 mM Tris, 20% Methanol
- Ponceau S-Lösung: 0,2% in 3% Trichloressigsäure (Serva)
- Blocklösung: 5% Milchpulver in TBS-Tween (TBS+0,1%Tween20)
- Hyerfilm ECL (28-9068-37, Amersham, GE Healthcare, USA)
- ECL Western Blotting Detection Reagent (RPN2209, Amersham, GE Healthcare, USA)

Methode

Das SDS-Gel wird im Anschluss an die Elektrophorese nass in Blottingpuffer auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Dieser Vorgang erfolgt bei 4°C und 400 mA über 2 Stunden. Die geblottete Membran wird in Ponceau S-Lösung gefärbt, um die gleichmäßige Beladung der Spuren zu kontrollieren. Nach dem Blockieren der Membran für eine Stunde wird über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper in 5% BSA TBS-Tween inkubiert. Danach wird 1x10 min mit PBS, 3x10 min mit TBS-Tween gewaschen. Es folgt die Inkubation für 2 Stunden mit dem 2. Peroxidase-gekoppelten Antikörper in Blocklösung. Danach wird wie oben beschrieben gewaschen und die Proteine durch Enzym-vermittelte Chemilumineszenz (ECL) detektiert.

Verwendete Antikörper

α aP2:	Kaninchen polyklonal anti aP2, Niederfellner 1:1000 im Westernblot
α ApoE:	Ziege polyklonal anti ApoE, Chemicon Millipore, USA, AB947 1:2500 im Westernblot, 1:250 in Immunfluoreszenz
α GAPDH:	Ziege polyklonal anti GAPDH, 1:1000 im Westernblot 1:250 im Westernblot
α PPAR γ :	Kaninchen monoklonal anti PPAR γ (81B8), Cell Signaling, Beverly, MA, USA, 2443 1:1000 im Westernblot
Γ aRPO:	Peroxidase gekoppeltes Ziege anti Kaninchen IgG, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, 111-035-144 1:5000 im Westernblot
Δ aGPO:	Peroxidase gekoppeltes Esel anti Ziege IgG, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, 705-035-003 1:5000 im Westernblot
α M-C γ 3:	C γ 3-gekoppeltes Esel anti Maus IgG, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, 715-166-151 1:500 in Immunfluoreszenz
α R-C γ 2:	C γ 2-gekoppeltes Ziege anti Kaninchen IgG, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, 111-225-003 1:500 in Immunfluoreszenz

Tabelle 2.2 Verwendete Antikörper. Der Übersichtlichkeit halber sind in dieser Tabelle ebenfalls die Konzentrationen der Verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenz angegeben.

2.4.7 FLUORESZENZMARKIERUNG VON CHYLOMIKRONEN-REMNANTS

Material

- Chylomikronen-Remnants
- CY5 - Mono reactive Dye (PA2001, Amersham GE Healthcare, USA)
- 1M Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)
- PD10 Säule (17-0851-01, Amersham GE Healthcare, USA)

Methode

Die Chylomikronenremnants (CR) werden mittels Ultrazentrifugation aus humanem postprandialem Plasma isoliert (2.5.7). Für die Markierung werden ca. 600 µg Proteinanteil CR in 1 mL PBS in das Röhrchen mit dem getrockneten Farbstoff (Cy3 oder Cy5) gegeben. Zur Aktivierung des Farbstoffs werden 50 µl NaHCO₃ zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Abtrennung des markierten Liganden von überschüssigem freiem Farbstoff erfolgt mittels Ausschlusschromatographie über eine PD10 Säule.

2.4.8 IMMUNFLUORESZENZ

Material

- Paraformaldehyd 4% in PBS
- PBS (Gibco 14190-094 Invitrogen)
- PGS (0,5% Glycin und 0,05% Saponin in PBS)
- Blocklösung (PGS + 1% BSA)
- DAPI (D8417, Sigma)
- Fluoromount G (0100-01, Southern Biotech, USA)

- Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 mit Objektiven Plan-NEOFLUAR 10x/0,30 440330; Plan-NEOFLUAR 20x/0,50 ∞/0,17; Ph3 Plan-NEOFLUAR 40x/1,30 Oil ∞/0,17; Ph3 Plan-APOCHROMAT 63x/1,4 Oil ∞/0,17; Ph3 Plan-APOCHROMAT 100x/1,4 Oil ∞/0,17; Kamera AxioCam color und Software Axio Vision Viewer (Carl Zeiss, Oberkochen)
- Konfokales Laser-Mikroskop LSM 510 META mit Bedienungssoftware (Carl Zeiss, Oberkochen)

Methode

Für immunhistochemische Untersuchungen werden die Zellen in 24-well-Platten auf Coverslips ausgesät und zu verschiedenen Zeitpunkten der adipozytären Differenzierung untersucht. Die Zellen werden grundsätzlich über Nacht in Hungermedium gehalten und vor dem Experiment ggf. mit verschiedenen Liganden inkubiert. Die Zellen werden zunächst einmal für 5 min mit PBS-Heparin (100U/mL) und anschließend zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Es folgt die Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 30 min. Nach der Fixierung werden die Zellen erneut zweimal 5min mit PBS gewaschen und für die Immundetektion vorbereitet, indem sie für 30 min mit PGS permeabilisiert und anschließend freie Bindungsstellen mit einer Blocklösung für 30 min abgesättigt werden. Im Anschluss werden die Zellen für 1 Stunde mit 80 µL Primär-Antikörper in Blocklösung pro Coverslip bei 37°C inkubiert. Danach werden die Coverslips dreimal mit PGS gewaschen und analog für 45 min mit dem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert. Gleichzeitig mit dem sekundären Antikörper wird eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt, indem die DAPI-Färbelösung 1:1000 direkt in die Antikörper-Lösung gegeben wird. Nach der Inkubation werden die Zellen dreimal für 5min mit PBS gewaschen und die Coverslips mit Einbettmedium auf Standard-Objekträgern fixiert.

2.5 FUNKTIONALE METHODEN

2.5.1 FETTROT-FÄRBUNG

Material

- Fettrot (O-0625, Sigma)
- 60% Isopropanol
- 100% Isopropanol
- Steriflip 0,2 μ M (SCGP00525, Millipore, USA)
- Biotrak II Plate Reader und Software Biochrom Data Capture (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)

Methode

Die Fettrotfärbung dient der Sichtbarmachung von Neutralfetten - Triglyzeriden und Cholesterolestern -, die im Zytoplasma der differenzierenden Zellen in Vesikeln akkumulieren. Die Zellen werden zunächst zweimal mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend werden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS für mindestens 30 min fixiert und danach einmal mit 60% Isopropanol gewaschen. Sechs Teile Fettrotstocklösung (0,7g Fettrot in 200 mL Isopropanol, über Nacht geschüttelt, filtriert) werden mit vier Teilen H₂O dest. gemischt, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, filtriert und auf die Zellen gegeben. Nach 10 min wird 4x 3 min mit H₂O dest. die überschüssige Fettrotlösung abgewaschen.

Zur Quantifizierung der Differenzierung kann die Fettrotlösung mit 100% Isopropanol (1mL/Well) wieder aus den Zellen ausgewaschen und die OD im Elisa-Reader bei 540nm gemessen werden, als Nullwert wird 100% Isopropanol eingesetzt.

2.5.2 NILROTFÄRBUNG

Material

- Nilrot (73189,Fluka)
- PFA (4% in PBS)
- DAPI (D8417, Sigma)

Methode

Eine weitere Möglichkeit Lipide anzufärben, ist der Fluoreszenzfarbstoff Nilrot. Dieses Lysochrom ist in wässriger Lösung nicht fluoreszent. Bei Kontakt mit der anzufärbenden Lipidphase löst es sich schnell in dieser und ist mit Wellenlängen zwischen 450 nm und 560 nm anregbar. Die Emmission wird um 590 nm detektiert. Für eine Nilrotfärbung werden die Zellen wie für die Fettrotfärbung beschrieben fixiert und mit PBS gewaschen. Die Nilrotstocklösung (20 μ g/mL in Aceton) wird in PBS auf eine Endkonzentration von 0,2 μ g/mL verdünnt, und die Cover Slips in jeweils 1mL für 5min inkubiert. Anschließend werden die Zellen DAPI-gefärbt und wie oben beschrieben auf Objektträgern eingedeckelt.

2.5.3 TRIGLYZERIDBESTIMMUNG

Material

- Triglyzerid-Reagenz (Triglyceride GPO-PAP 1488899, Roche)
- Tischinkubator Typ B15 (Hereaus, Hanau)

- Biotrak II Plate Reader und Software Biochrom Data Capture (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)
- Precipath L Triglyzeridstandard (1285874, Roche)

Methode

Die Bestimmung der Triglyzeridkonzentration im Gesamtzelllysat wurde unter Verwendung eines enzymatischen Kits durchgeführt. Die darin enthaltene Lipoprotein Lipase setzt aus den Triglyzeriden der Probe Glycerin frei. Dies wird in mehreren enzymatischen Reaktionen unter der Entstehung von Wasserstoffperoxid umgewandelt. Dessen äquimolare Umsetzung mit Aminophenazon und Chlorphenol bewirkt die Bildung eines roten Farbstoffes, der ein Absorptionsmaximum bei 546nm aufweist. Für die Bestimmung werden 100 µL der Probe mit 200 µL Reagenz gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 37°C wird der Ansatz bei 560 nm vermessen. Aus einer, mithilfe eines Standardserums, erstellten Eichgerade wird die genaue Konzentration der Triglyzeride in der Probe ermittelt.

2.5.4 CHOLESTEROLBESTIMMUNG

Material

- Amplex® Red Cholesterol Assay Kit (A12216, Molecular Probes)

Methode

Der Gesamtcholesterolgehalt der Proben wurde ebenfalls über einen enzymatischen Nachweis bestimmt. Als Ester gebunden vorliegendes Cholesterol wird mittels Cholesterolesterase freigesetzt. Bei der anschließenden Oxidation des freien Cholesterols entsteht Wasserstoffperoxid. Dieses wird mit dem Amplex Red Reagenz und der Horseradish Peroxidase (HRP) unter Entstehung des Farbstoffs Resorufin stöchiometrisch umgesetzt. Es werden 50 µL der Probe, ggf. vorverdünnt im Reaktionspuffer, mit 50 µL Reagenz vermischt. In der Endkonzentration enthält der Reaktionsansatz 150 µM Amplex® Red Reagenz, 1 U/mL HRP, 1 U/mL Cholesteroxidase und 0,1 U/mL Cholesterolesterase. Der Ansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert und danach im Fluorometer vermessen. Die Anregung erfolgt bei 530 nm, die Emission wird bei 590 nm detektiert. Mithilfe einer Standardreihe wird die Konzentration des Gesamtcholesterols in der Probe berechnet.

2.5.5 PHOSPHOLIPIDBESTIMMUNG

Material

- Phospholipid Kit (999-54006, Wako)
- Precipath L Phospholipidstandard (1285874, Roche)
- Tischinkubator Typ B15 (Heraus, Hanau)
- Biotrak II Plate Reader und Software Biochrom Data Capture (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)

Methode

Für die Bestimmung der Phospholipidkonzentration (Lecithin, Lysolecithin und Sphingomyelin) wurde ein enzymatisches Reagenz benutzt (999-54006, Wako). Dabei werden die Lipide durch die Phospholipase D hydrolysiert und das freigewordene Cholin weiter umgesetzt. Nach einer Farbreaktion unter Beteiligung von Phenol und 4-Aminoantipyrin wird die Absorption bei 505 nm gemessen. Der Gehalt von Phospholipiden in der Probe wird über die Vermessung eines Standards bestimmt.

2.5.6 PRÄPARATION VON CHYLOMIKRONEN AUS HUMANEM PLASMA**Material**

- humanes hyperlipämisches Plasma von ApoCII-defizientem Spender
- PBS (14190-094 Gibco, Invitrogen)
- 60% Sucrose (in H₂O)
- Ultrazentrifuge TL-100 (Beckmann Coulter, SW40 und SW32 Swing-out Rotoren)
- Ultrazentrifugenröhrchen (326823, Beckmann)

Methode

Nach der Blutentnahme wird das Blut (10x10 mL) zunächst für 5 min bei 2500 rpm und 4°C in der Sigmazentrifuge (Schwingrotor) abgesert. Die Überstände (Plasma) werden abgenommen und vereinigt. Das Plasma wird anschließend 1:6 mit 60% Sucrose versetzt und zur vollständigen Durchmischung mehrmals invertiert.

Es werden ca. 17 mL PBS in SW32 Zentrifugenröhrchen vorgelegt, mit 20 mL Plasma vorsichtig unterschichtet und die Röhrchen an der Waage austariert. Anschließend wird für 1 Stunde bei 28.000rpm bei 4°C in der Ultrazentrifuge (SW32 Rotor) zentrifugiert. Die Lipide flotieren dabei an die Oberfläche und der „Lipid-Kuchen“ kann in einem Stück mit einem Plastikspatel abgenommen und in ein Glasvial überführt werden. Die restlichen Lipide werden mit einer gebogenen Kanüle abgenommen, ebenfalls in das Glasvial überführt und alles in möglichst wenig PBS wieder resuspendiert, 1:6 mit 60% Sucrose versetzt und invertiert. 8,5 mL PBS werden in SW40-Zentrifugenröhrchen vorlegt, mit 4mL Lipiden vorsichtig unterschichtet und die Röhrchen an der Waage austariert. Anschließend wird für 1,5 Stunden bei 28.000 rpm in der Ultrazentrifuge (SW40 Rotor) bei 4°C zentrifugiert. Die Chylomikronen werden wie oben beschrieben abgenommen und in möglichst wenig PBS resuspendiert, in 2 mL Reagiergefäße überführt und bei 4°C gelagert oder direkt für die Chylomikronen-Remnant-Hydrolyse eingesetzt.

2.5.7 PRÄPARATION VON CHYLOMIKRONEN-REMNANTS**Material**

- FCS (Biowhitaker, Lonza)
- PBS (14190-094 Gibco, Invitrogen)
- Bovine LPL (Stammlösung 0,1mg/mL)

Methode

Die zuvor durch Ultrazentrifugation aus humanem Plasma gewonnenen Chylomikronen werden mittels Triglyzeridbestimmung (siehe 2.5.3) auf 6 mg/mL Triglyzeride in einem Gesamtvolumen von 10 mL mit PBS eingestellt. Anschließend wird die Lösung mit 10 mL FCS versetzt, bovine LpL in einer Endkonzentration von 1 µg/mL hinzugefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert, um die Hydrolyse der Chylomikronen zu Chylomikronen-Remnants zu gewährleisten. Nach der Reaktion wird der Ansatz mit 1:6 60%iger Sucrose versetzt, PBS in die Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt und mit dem Lipidgemisch vorsichtig unterschichtet. Anschließend wird, wie für die Chylomikronen in 2.5.6 beschrieben, drei Mal für 1,5 Stunden in der Ultrazentrifuge bei 28.000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Die Chylomikronen-Remnants werden bei 4°C gelagert und können anschließend für funktionelle Analysen verwendet werden.

2.5.8 LIPIDEXTRAKTION

Material

- humanes, hyperlipämisches Plasma
- KBr (1.04905.0500, Merck KGaA, Darmstadt)
- Zentrifugationsröhrchen (326823, Beckman)
- PBS (14190-094 Gibco, Invitrogen)
- Ultrazentrifuge mit Rotor SW32
- Zentrifuge Sigma 1-15K
- Chloroform-Methanol Gemisch (8:5 w/w)

Methode

Das hyperlipämische Plasma wurde mit Kalium-Bromid (KBr) auf eine Dichte von 1,21 g/cm³ eingestellt ($x \text{ g KBr} = y \text{ mL Ausgangslösung} \times 0,3277$). Es wurden 8 mL PBS in die Zentrifugenröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 30 mL unterschichtet, an der Waage austariert und anschließend für 1 Stunde bei 32.000 rpm und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Dabei bildet sich ein dünner Lipidfilm auf der PBS-Phase, der in einem Stück mit einem Plastikspatel abgenommen werden kann. Die Lipide werden in PBS resuspendiert und zu 100 µL dieser Suspension wurde 1 mL Chloroform-Methanol-Gemisches (8:5 w/w) hinzugefügt. Anschließend wird für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Dabei bilden die Proteine ein dünnes Häutchen über der wässrigen Phase. Die gelösten Lipide befinden sich in der oberen organischen Phase. Die Überstände werden vereinigt, die Cholesterin- und Triglyzeridkonzentration bestimmt und anschließend in Aliquots zu 4 oder 8 mL bei -20°C gelagert.

2.5.9 LIPOSOMENPRÄPARATION

Material

- Lipidextrakt
- ³H-Cholesterolethylether (TRK888-1MCi, GE Healthcare)
- ¹⁴C-Triolein (CFA258-250UCi, GE Healthcare)
- PBS (14190-094 Gibco, Invitrogen)
- Glasfläschchen (*screw cap vials, clear*; 5182-0714, Aligent Technologies)

- Inject Luer Lock 2 mL Solo (4606701V, Braun)
- BD Microlance 3, 20G, 1,5", 0.9 x 40 mm (301300, Becton Dickinson)
- Syringe Driven Filter Unit 0,45 µm, 4mm (SLHV R04NL, Millex-HV)
- Thermomixer Compact (Eppendorf AG)
- Ultraschallbecken Sonorex (Bandelin)

Methode

Zur Herstellung der radioaktiv markierten Liposomen werden 8 mL Lipidextrakt (15mg Lipid) in ein 1,5 mL Glasfläschchen gegeben und jeweils 100 µL (entspricht 50 Mbq) ^3H -Cholesteroleylether und ^{14}C Triolein hinzu pipettiert und anschließend gevortext. Das Chloroform-Methanol-Gemisch (8:5 w/w) wird unter Stickstoff über einem 37°C warmen Wasserbad evaporiert. Dabei werden die Lipide als undurchsichtiger Belag an den Wänden des Glasfläschchens sichtbar. Die getrockneten Lipide werden anschließend in 1,5 mL 65°C warmen PBS resuspendiert. Die Lösung wird gevortext und danach in einem auf 40°C vorgeheizten Ultraschallbad für 5 min sonifiziert. Dieser Schritt wird dreimal wiederholt. Nach dem dritten und letzten Sonifizieren wird die Emulsion in einer Spritze aufgezogen und durch einen, mit PBS vorgewaschenen, Millex-HV Filter in ein neues Glasfläschchen filtriert.

2.5.10 ^3H , ^{14}C LIPOSOMENAUFNAHME

Material

- ^3H , ^{14}C -markierte Liposomen
- bovine LpL (0,1µg/mL Stock)
- Tetrahydrolipstatin (Roche)
- PBS (14190-094 Gibco, Invitrogen)
- Heparin-Natrium 25000IE (PZN3029843, Braun)
- 0,1N NaOH
- Szintillatorlösung
- Liquid Scintillation Counter 1409 Wallac (Perkin Elmer, USA)

Methode

Die Messung der Liposomenaufnahme erfolgte unter Verwendung von *Low-Density* Lipoproteinen (LDL) und Liposomen (LP). Über die Vermessung im β -Counter wird die spezifische Aktivität (cpm/µg Protein) der Probe bestimmt.

Für den Versuch werden Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien verwendet (undifferenzierte Kontrollzellen, Tag 7 und Tag 14) die mindestens einen Tag in Standardmedium ohne Differenzierungszusätze kultiviert und nachfolgend über Nacht gehungert werden. Die Zellen werden mit warmem Inkubationsmedium gewaschen und anschließend erfolgt die Inkubation in 3 verschiedenen Ansätzen: Liposomen, Liposomen mit LpL und Liposomen mit LpL und mit THL (THL=Tetrahydrolipstatin, spezifischer Inhibitor der Lipoprotein Lipase). Die Inkubationsansätze werden zunächst 30 min bei 37°C vorinkubiert, um eine Hydrolyse der Partikel durch die LpL zu ermöglichen und anschließend auf die Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 1 bzw. 4 Stunden wird die Radioaktivität abgenommen,

zweimal 3 min mit PBS-Heparin (100 U/mL) und dreimal für 3 min mit PBS gewaschen. Die Zellen werden in 500 µL 0,1 N NaOH lysiert und davon 100 µL für die Proteinbestimmung zurückbehalten. Die restlichen 400 µL werden mit 4 mL Szintillatorlösung versetzt und gevortext. Die Radioaktivität kann anschließend im β-Szintillation-Counter vermessen werden. Der Mechanismus der Szintillation beruht auf der Anregung von Molekülzuständen in einem primären Fluoreszenzstoff, die bei ihrem Zerfall UV-Strahlung emittieren und so detektiert werden können.

2.5.11 ¹²⁵I-LIPOPROTEINAUFNAHME

Material

- ¹²⁵Iod-markierte Chylomikronen-Remnants
- bovine LpL (0,1µg/mL Stock)
- Tetrahydrolipstatin (Roche), 50 mg/mL in Ethanol
- PBS (14190-094 Gibco, Invitrogen)
- Heparin-Natrium 25000IE (PZN3029843, Braun)
- 0,1N NaOH
- Automatic γ-Counter LKB-Wallac CliniGamma 1272 (Perkin Elmer, USA)

Methode

Die Messung der Lipoproteinaufnahme erfolgte unter Verwendung von Low Density Lipoprotein (LDL) und Chylomikronenremnants (CR). Mittels der Iodmonochloridmethode werden die Proteinanteile der Partikel mit ¹²⁵Iod radioaktiv markiert. Über die Vermessung im γ-Counter wird die spezifische Aktivität (cpm/µg Protein) der Probe bestimmt.

Für den Versuch werden Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien verwendet (undifferenzierte Kontrollzellen, Tag 7 und Tag 14) die mindestens einen Tag in Standardmedium ohne Differenzierungszusätze kultiviert und nachfolgend über Nacht gehungert. Die Zellen werden mit warmem Inkubationsmedium gewaschen und anschließend erfolgt die Inkubation in 3 verschiedenen Ansätzen: CR, CR mit LpL und CR mit LpL und mit THL (THL = Tetrahydrolipstatin, spezifischer Inhibitor der Lipoprotein Lipase). Die Inkubationsansätze werden zunächst 30 min bei 37°C vorinkubiert, um eine Hydrolyse der Partikel durch die LpL zu ermöglichen und anschließend auf die Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 1 bzw. 4 Stunden wird die Radioaktivität abgenommen, zweimal 3 min mit PBS-Heparin (100 U/mL) und dreimal für 3 min mit PBS gewaschen, die Zellen in 500 µL 0,1 N NaOH lysiert und das Lysat im γ-Counter vermessen.

Für die Untersuchung der Chylomikronen-Remnantaufnahme unter Einfluss von Insulin werden die Zellen zunächst für 30 min mit Inkubationsmedium mit 50 nM Insulin vorinkubiert, und anschließend die markierten Partikel wie oben beschrieben zugesetzt und die Aufnahme nach 1 bzw. 4 Stunden gemessen.

2.5.12 APOE-ELISA

Material

- Maxisorp-Immuno Moduls Mikrotiterstreifen (469949, Nunc) mit Rahmen (460348, Nunc) und Deckel (263339, Nunc)
- Tischinkubator Typ B15 (Hereaus, Hanau)
- Waschpuffer: PBS (Gibco, 14190-094, Invitrogen), 0,02% Tween20 (170-6531 Bio-Rad)
- Blockingpuffer: 1 M NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 (p.A.), 0,15 M NaCl (p.A.), 1,0% BSA (112018, Merk), 1,0 mM EDTA (Titriplex III, 1.08418 Merk), 0,055% Tween20 (170-6531, Bio-Rad), pH 7.0
- Kontrollserum (OUPH07, Dade Behring)
- Substrat: 0,3% Tetramethylbenzidine (TMB, T-2885, Sigma) in 0,2 M Malonsäure
- Substratpuffer: 1,3 M Malonsäure, 0,6 M Natrium-Acetat, 1,11 M NaOH
- 0,2% H_2O_2
- 2 M H_2SO_4
- Antikörper α -ApoE-HRP (Genetex)

Methode

Die Sekretion von ApoE in den Zellkulturüberstand der Adipozyten wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung gemessen. Für das Experiment werden die Zellen über Nacht in Hungermedium gehalten. Am nächsten Tag werden die Überstände abgenommen und mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) die Konzentration des zu untersuchenden Proteins bestimmt. Diese Werte wurden auf den Zellproteingehalt normalisiert.

Die Konzentration des Apolipoprotein E wurde mit einem im Labor Beisiegel entwickelten ELISA gemessen. Dabei werden zunächst 100 μL Zellkulturüberstand ggf. vorverdünnt in die Maxisorp-Streifen pipettiert und für 1,5 Stunde bei 37°C an diese gebunden. Nach dreimaligem Waschen werden 100 μL des α -ApoE-Antiköpers (1:2000 in Blockingpuffer), an den gleichzeitig eine Peroxidase gekoppelt ist, pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Als Substrat wurde 250 μL Tetramethylbenzidin verwendet, dessen Farbumschlag nach abstoppen der Reaktion mit 50 μL 2 M Schwefelsäure bei 450 nm detektiert wird.

Die Standardkurve wurde aus einem humanem Plasmapool in einer Konzentration von 0 bis 64 ng/mL erstellt, als Positivkontrolle wurde ein Kontrollserum mit einer ApoE-Konzentration von 40 ng/mL mitgeführt.

2.5.13 GELFILTRATIONSCHROMATOGRAPHIE (FPLC)

Material

- Äkta FPLC-Apparatur (GE Healthcare)
- Gelchromatographie-Säule mit Dextran-Agarose-Matrix (HiLoad Superdex 200, 17-1069-01 Pharmacia)
- Gelfiltrationschromatographiepuffer (FPLC-Puffer: 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8,0; filtriert)

Methode

Ein schonendes Verfahren zur Auftrennung von globulären Proteinen in wässrigen Lösungen ist die Gelfiltrationschromatographie, eine spezielle Applikation der FPLC (Fast Liquid Protein Chromatography). Das zu trennende Proteingemisch wird dabei unter Druck und in einem physiologischen Puffer durch eine Säule mit einer Gel-Matrix aus Dextran und Agarose gepumpt. Kleine Moleküle können in die Gel-Matrix

interkalieren und verlassen die Säule wegen der Retardierung später als große Moleküle, welche die Matrix passieren ohne zu interkalieren. Dadurch kommt es unter physiologischen Bedingungen zur Separation der Moleküle nach ihrer relativen Größe.

Diese Methode eignet sich auch besonders gut für die Auftrennung von Lipoproteingemischen, da diese während der Größentrennung in der Säule in ihrer nativen Lipid- und Proteinzusammensetzung erhalten bleiben. Dabei wird eine Säule (Superdex 200) verwendet, die über eine Matrix-Partikelgröße von 34 μM Durchmesser verfügt und Partikel im Molekulargewichtsbereich von 10-600 kDa trennen kann. HDL haben beispielsweise ein mittleres Molekulargewicht von ca. 37 kDa und einen Durchmesser von 5-12 nm. Die Probe, d.h. in diesem Fall der Zellkulturüberstand wurde ggf. aufkonzentriert und in einem Volumen von 200 μL auf die Säule geladen. Die Flussrate des Puffers betrug 1 mL/Minute, wobei die Fraktionssammlung nach 36 mL Durchlauf begann und 40 Fraktionen zu je 500 μL gesammelt wurden. In den Fraktionen erfolgte dann die Bestimmung der Lipidparameter (Cholesterol, Triglyzeride, Phospholipide) und ApoE, um die Hypothese zu überprüfen, ob ApoE an Lipoproteine assoziiert sekretiert wird.

3 ERGEBNISSE

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Lipoproteine für den Adipozytenstoffwechsel untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Sekretion und Aufnahme von Lipoproteinen, sowie insbesondere die Rolle des Apolipoprotein E untersucht. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind daher in vier Kapitel gegliedert. Der erste Teil (3.1) zeigt eine vergleichende Charakterisierung des verwendeten Zellsystems mit humanen Präadipozyten Adipozyten mittels quantitativer RT-PCR und proteinchemischen Methoden. In Kapitel 3.2 wird die Synthese und Sekretion von Lipoproteinen, vor allem des Apolipoprotein E, bezüglich der Regulation der Sekretion als auch der Charakterisierung der sekretieren Lipoproteine dargestellt. Kapitel 3.3 beschreibt die Aufnahme von Lipoproteinen in differenzierte humane Adipozyten, zum Einen über radioaktiv markierte Lipoproteine, zum Anderen über fluoreszenzmarkierte Chylomikronen-Remnants. Abschließend wurde im letzten Teil (3.4) die Bedeutung des Apolipoprotein E für die Adipozytenfunktion anhand von Knockdown- und Überexpressions-Modellen untersucht.

3.1 CHARAKTERISIERUNG DES VERWENDETEN ZELLSYSTEMS

Das verwendete humane mesenchymale Zellsystem, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde zuvor von Janne Prawitt in unserem Institut etabliert (Prawitt et al., 2008). Zu Beginn dieser Arbeit wurden die humanen mesenchymalen Stammzellen hinsichtlich der adipozytären Differenzierung auf morphologischer und molekularbiologischer Ebene untersucht. Diese Charakterisierung erfolgte im Vergleich zu Fettgewebsbiopsien aus humanem visceralen und subkutanen Fettgewebe und daraus isolierten Präadipozyten.

Die verwendete humane mesenchymale Stammzelllinie wurde durch Insertion der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase immortalisiert, was sich im Namen hMSC-Tert, für Telomerase Reverse Transkriptase niederschlägt (Simonsen et al., 2002). Die adipozytäre Differenzierung dieser Zellen wurde nach dem von Prawitt beschriebenen Standardprotokoll durchgeführt. Die Zellen wurden dabei über 14 Tage mit einem Differenzierungs-Cocktail bestehend aus 0,1 μM Dexamethason, 450 μM Isobuthylmethylxanthin (IBMX), 2 μM Insulin, 1 μM Rosiglitazon und 1 μM U0126 differenziert.

Das synthetische Glukokortikoid Dexamethason kann sowohl Einfluss auf die Regulation des Wachstums, als auch auf die Differenzierung der Zellen nehmen. IBMX ist ein unspezifischer Inhibitor der cAMP- und cGMP-Phosphodiesterasen und bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären cAMP/cGMP-Spiegel. Diese beiden Faktoren haben in Kombination eine effektive Wirkung auf die Differenzierung. Insulin wirkt in der eingesetzten Konzentration von 2 μM hauptsächlich auf den *Insulin-like Growth Factor Receptor* (IGF)-I, welcher das Signal zur Differenzierung weiterleitet. Das Thiazolidindion Rosiglitazon ist ein Agonist des Transkriptionsfaktors *Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ* (PPAR γ), der als der zentrale Regulator der

Adipogenese gilt. U0126 wirkt als spezifischer und nichtkompetitiver Inhibitor der *Mitogen-Activated* Kinase Kinasen (MAPK Kinasen) MEK1 und MEK2 primär proliferationshemmend und aktiviert so die Differenzierung.

3.1.1 hMSC-TERT ADIPOZYTEN

Im ersten Schritt erfolgte eine morphologische Charakterisierung des Phänotyps der differenzierenden hMSC-Tert Adipozyten. Abbildung 3.1 zeigt die hMSC-Tert Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Lipidakkumulation in den Zellen ist durch Färbung der Neutrallipide durch Fettrot sichtbar gemacht worden. Undifferenzierte hMSC-Tert Zellen (Tag 0, A) adherieren flach am Boden der Kulturschale, ihre Form ist dreieckig bis polygonal und sie bilden eine kopfsteinpflasterartige Struktur. Eine Woche nach der Induktion der Differenzierung (Tag 7, B) sind die Zellen noch dichter geworden und es sind erste kleine Lipidtröpfchen zu erkennen. Bis zum Ende der Differenzierung (Tag 14, C) verdichten sich die Zellen noch etwas stärker, was an vermehrt auftretenden dunkelgrauen Strukturen zu erkennen ist. Die Anzahl der Lipidvesikel und ihre Größe nehmen deutlich zu.

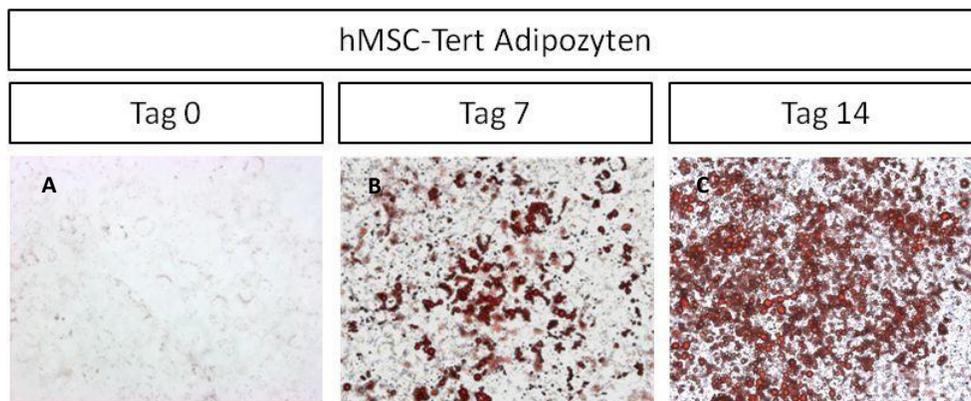


Abb.3.1 hMSC-Tert Adipozyten im Differenzierungsverlauf. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung mit 4% PFA fixiert und die Neutrallipide mittels Fettrot gefärbt, um die steigende Lipidakkumulation in den Zellen sichtbar zu machen.

Im zweiten Schritt wurden Expressionsanalysen mittels quantitativer Taqman® RT-PCR Expressionsanalysen von adipozytären Markern und für den Lipoproteinstoffwechsel wichtigen Genen auf Ebene der mRNA durchgeführt. Dafür wurden Proben von verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung von hMSC-Tert Zellen, primären humanen Adipozyten und humanem Fettgewebsbiopsien miteinander verglichen. Es wurde für alle Proben die gleiche cDNA Menge eingesetzt und das untersuchte Gen auf das des *Housekeeping*-Gens *TATA box-binding-Proteins* normalisiert.

Die Abbildung 3.2 zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalysen an 4 Zeitpunkten während der Differenzierung in hMSC-Tert Adipozyten. Betrachtet wurden als Marker der frühen adipozytären Differenzierung die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und

C/EBP α . Als Marker für Präadipozyten und terminal differenzierte Adipozyten wurden das *Adipocyte Lipid Binding Protein 2* (aP2), Adiponektin, ApoE, LpL und der Insulin-abhängige Glukosetransporter 4 (Glut4) detektiert. Außerdem wurden die Lipoproteinrezeptoren LDL-R, LRP1 und VLDL-R untersucht.

Die Expression von C/EBP α wird ab Tag 7 von den Zellen exprimiert. Die Expression steigt an Tag 14 noch weiter an. PPAR γ dagegen ist am stärksten an Tag 7 exprimiert. Für die adipozytären Marker Adiponektin, aP2, ApoE und LpL wurde eine steigende Expression während des Differenzierungsverlaufs detektiert, wobei ApoE mit $2 \times 10^6 / 10^4$ Kopien Tbp am stärksten synthetisiert wird. Der LDL-Rezeptor wird bereits in undifferenzierten Zellen exprimiert und wird auch an Tag 2 und Tag 7 auf ähnlichem Niveau synthetisiert. In differenzierten Adipozyten hingegen sinkt die LDL-R Expression auf ca. 50% der Ausgangsexpression. LRP1 und der VLDL-Rezeptor werden mit zunehmender Differenzierung stärker exprimiert, wobei die Expression von LRP1 an Tag 14 wieder abnimmt. Der Insulin-abhängige Glukose-Transporter 4 (GLUT4) wird ab Tag 7 exprimiert.

Die mit dieser Methode klar darstellbaren Unterschiede in der Expression sind primär zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen festzustellen. Das Absinken der Expression in der zweiten Differenzierungshälfte ist bei LDL-R und LRP1 auf das Differenzierungsprotokoll zurückzuführen, wobei das Insulin ab Tag 9 der Differenzierung ausgewaschen wird, um eine bleibende Insulin-Sensitivität der Zellen zu gewährleisten. Dies konnte durch Expressionsanalysen an Tag 10 der Differenzierung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

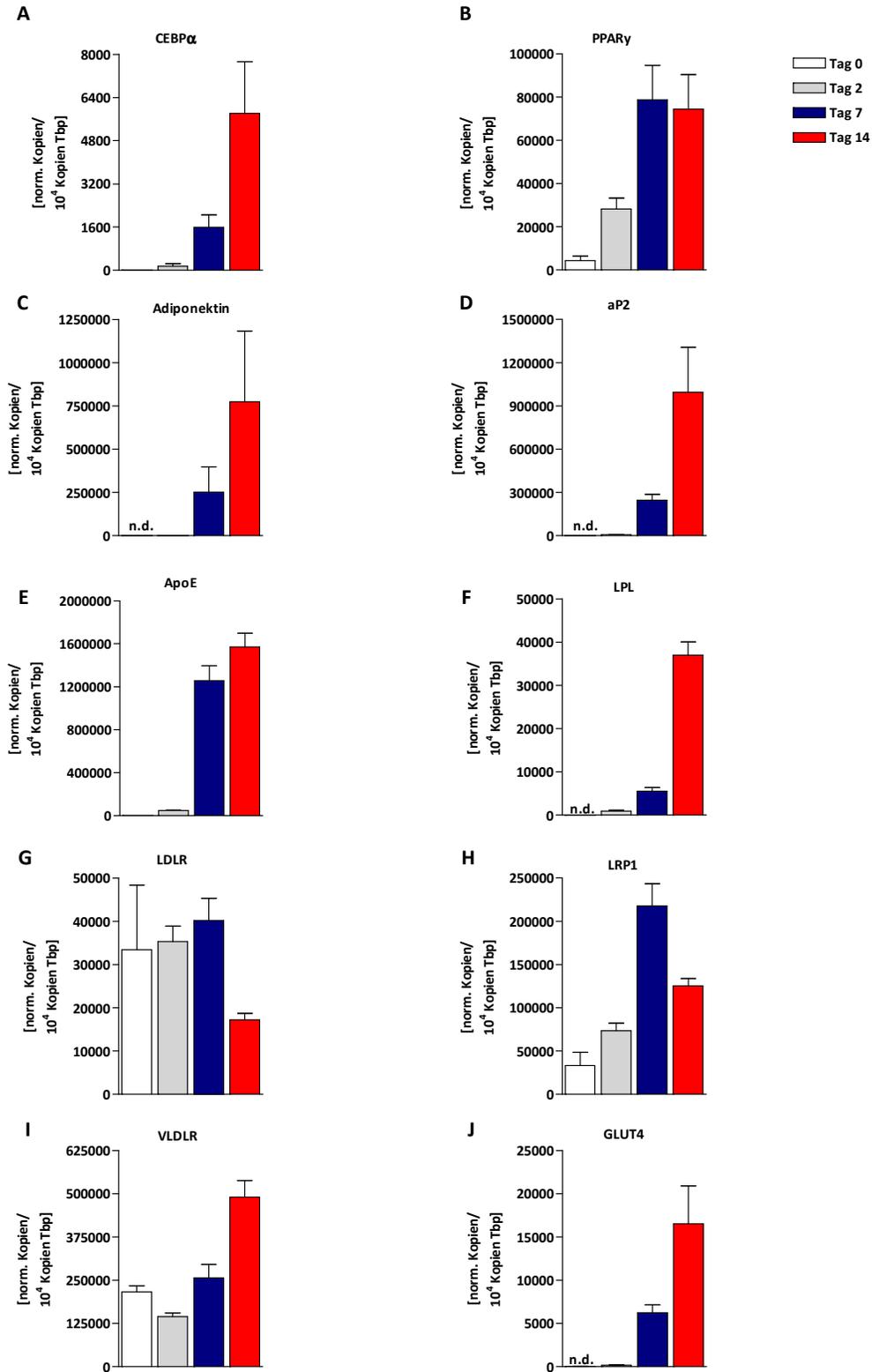


Abb.3.2 mRNA-Expressionsanalysen mittels quantitativer Taqman[®] RT-PCR von adipozytären Markern und Genen des Lipoproteinstoffwechsel in hMSC-Tert Adipozyten. Die Expression ist angegeben als normalisierte Kopienzahl/10⁴Kopien TBP. Alle gemessenen Gene werden innerhalb der ersten Differenzierungshälfte exprimiert (n=3).

Weiterführend wurde die Expression von ApoE und des adipozytären Markers aP2 im Verlauf der Differenzierung auf Proteinebene untersucht. Der Nachweis erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Westernblot. Dafür wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung Gesamtzelllysate hergestellt. Die Proben wurden standardisiert auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt. Als interner Proteinstandard wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Das Expressionsmuster der untersuchten Proteine ist in Abbildung 3.3 zusammengestellt. Verglichen wurde die Expression im Differenzierungsverlauf, in undifferenzierten und entsprechend in 2, 7 und 14 Tage differenzierten Adipozyten. Die Proteinexpression von ApoE ist in undifferenzierten Zellen nicht nachzuweisen. Ab Tag 2 der Differenzierung ist jedoch eine schwache Bande zu erkennen, die im weiteren Differenzierungsverlauf mit steigender Intensität detektiert wird.

Der Proteinexpression des adipozytenspezifischen Markers aP2 kann nach sieben Tagen adipogener Differenzierung nachgewiesen werden.

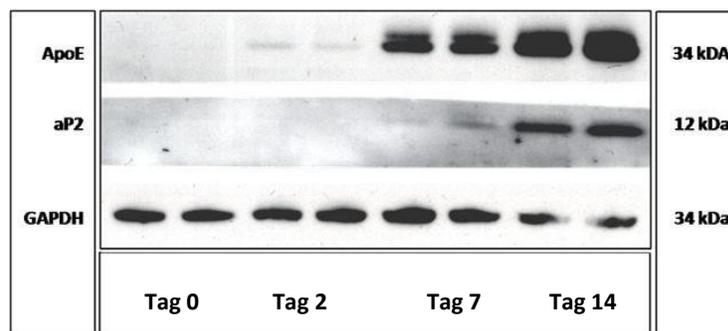


Abb.3.3 Proteinexpression von ApoE und adipozytenspezifischen Markern im Differenzierungsverlauf. Die Analyse erfolgte mit spezifischen Antikörpern im Westernblot. ApoE zeigt eine Bande bei 34 kDa; adipozytenspezifischer Marker ist das *Adipocyte Lipid Binding Protein* aP2 (12 kDa). Als interner Standard wird Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH, 34 kDa) mitgeführt.

Als interner Standard wurde die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) gemessen, um eine Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Banden nachzuweisen. Eine Verringerung der GAPDH-Expression an Tag 14 ist auf die adipozytäre Differenzierung zurückzuführen, da die stattfindende Spezialisierung der Zellen zu einer verringerten Expression der Haushaltsgene bzw. Proteine führt, was in den hMSC-Tert-Adipozyten auch für einen anderen standardmäßig verwendeten Marker β -Aktin gezeigt werden konnte.

Die Expressionsanalyse der differenzierten Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigt, dass ab Tag 7 der Differenzierung eine präadipozytäre Zellpopulation vorliegt und die Zellen stabil differenzieren. Dies wird auch durch den Nachweis von ausschließlich im Fettgewebe exprimierter Proteine wie aP2 bestätigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zellen ab Tag 2 der Differenzierung ApoE in kontinuierlich steigender Konzentration exprimieren.

3.1.2 HUMANE PRÄADIPOZYTEN

Um zu überprüfen, ob die hMSC-Tert Adipozyten hinsichtlich ihrer Morphologie und der Expression der adipozytären Marker reife humane Adipozyten abbilden, wurden aus visceralen Fettgewebsbiopsien primäre Preadipozyten isoliert und nach dem Standardprotokoll differenziert. In Abb.3.4 zeigt die isolierten Präadipozyten vor (Tag 0) und nach 12 Tagen adipogener Differenzierung.

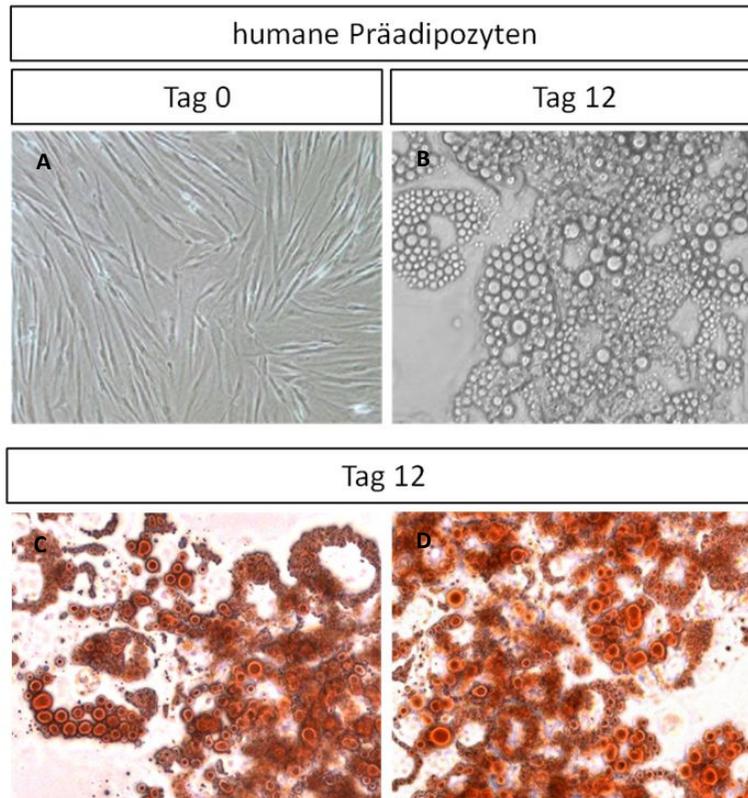


Abb.3.4 Humane Präadipozyten aus visceralen Fettgewebsbiopsien. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll isoliert und für 12 Tage differenziert (B). Als Kontrolle sind undifferenzierte Präadipozyten gezeigt (Tag 0, A). Die Fettakkumulation wurde in den differenzierten Adipozyten zusätzlich durch Fettrotfärbung sichtbar gemacht (C, D). Die Aufnahmen wurden im Durchlicht bei 400facher Vergrößerung angefertigt.

Die humanen Präadipozyten haben nach der Isolation aus dem Gewebe eine Fibroblasten-ähnliche Struktur. Nach 12 Tagen adipozytärer Differenzierung weisen sie eine Vielzahl Trauben kleiner Lipidvakuolen in den Zellen auf, was morphologisch Präadipozyten entspricht.

Um das Expressionsmuster der hMSC-Tert Adipozyten mit dem primärer Zellen zu vergleichen, wurden Expressionsanalysen von visceralen und subkutanen Fettgewebsbiopsien und aus dem visceralem Fett isolierten Präadipozyten durchgeführt (Abb.3.5).

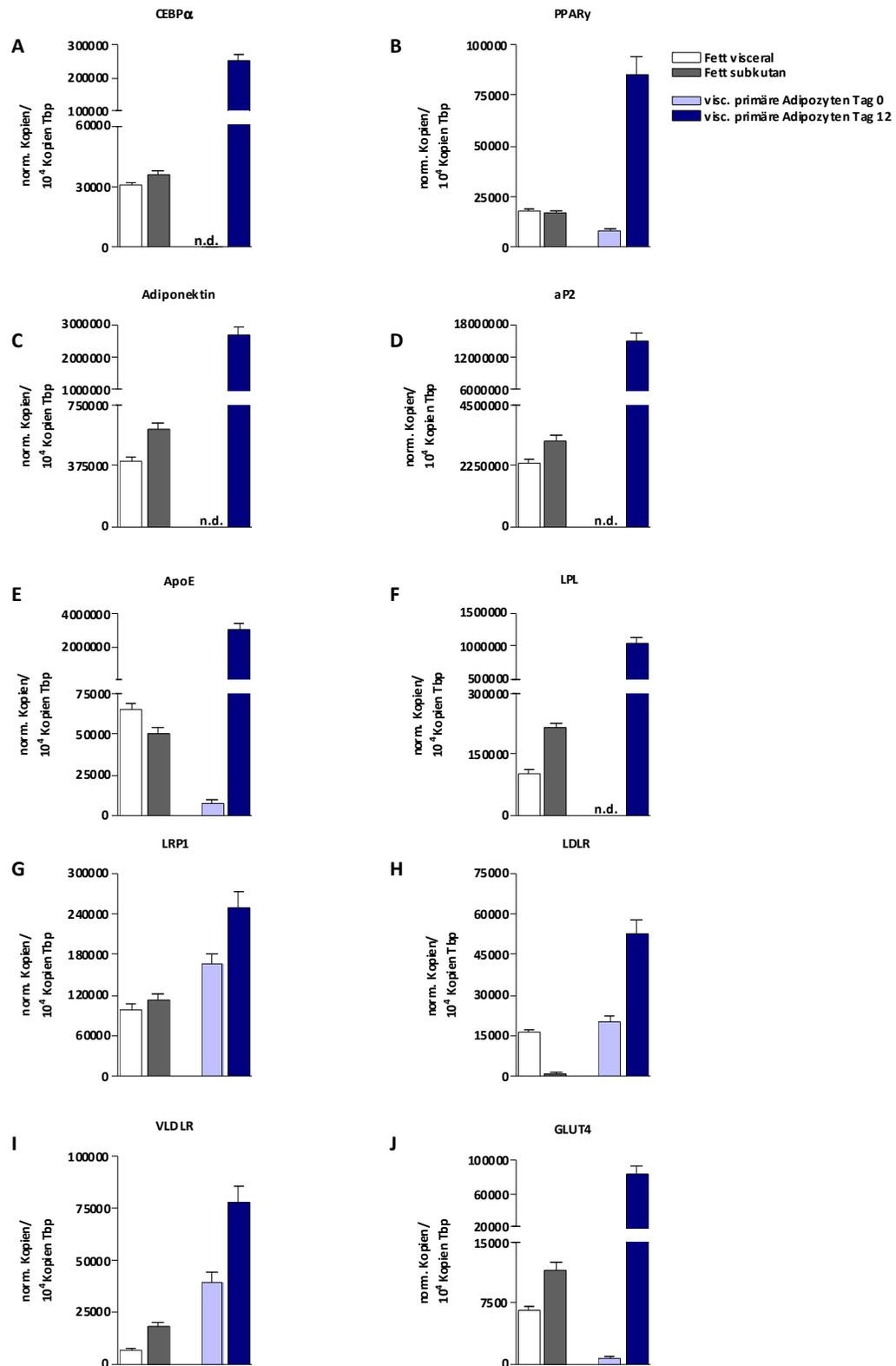


Abb.3.5 mRNA-Expressionsanalysen mittels quantitativer Taqman[®] RT-PCR von adipozytären Markern und Lipoprotein-Rezeptoren in humanem visceralem und subkutanen Fettgewebsbiopsien und aus visceralem Fett isolierten Präadipozyten (undifferenziert Tag 0, differenziert Tag 12). Die Expression ist angegeben als normalisierte Kopienzahl/10⁴ Kopien TBP. Alle gemessenen Gene werden innerhalb der ersten Differenzierungshälfte exprimiert (n=2).

Die Expressionsanalysen der Fettgewebsbiopsien zeigen eine Expression der untersuchten Gene sowohl in visceralem als auch in subkutanem Fettgewebe. Die beiden Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PPAR γ werden sowohl in visceralem als auch subkutanem Fett in ähnlicher Menge synthetisiert. Das antiinflammatorische Cytokin Adiponektin, aP2 sowie LpL werden in subkutanem Fettgewebe stärker exprimiert. Die Lipoproteinrezeptoren LDL-R und VLDL-R, sowie der Insulin-abhängige Glukosetransporter Glut4 werden in den beiden Fettgewebstypen unterschiedlich stark exprimiert. Der LDL-R wird, ebenso wie ApoE, verstärkt in visceralem Fett synthetisiert, VLDL-R und Glut4 zeigen eine höhere Expression in den subkutanen Proben.

Die primären Präadipozyten wurden aus visceralen Fettbiopsien isoliert und nach dem Standardprotokoll für 12 Tage differenziert. Der Transkriptionsfaktor C/EBP α , und die Marker für differenzierte Adipozyten aP2 und Adiponektin können in den Präadipozyten noch nicht detektiert werden, zeigen aber eine starke Expression in den differenzierten Adipozyten (Tag 12). Alle anderen untersuchten Gene können bereits in undifferenzierten Präadipozyten detektiert werden und werden in differenzierten Adipozyten stark erhöht synthetisiert. Die Unterschiede in der Expression zwischen den Fettbiopsien und den isolierten Präadipozyten bzw. differenzierten Adipozyten lässt sich zum einen durch die heterogene Zellpopulation in den Gewebeproben erklären, kann aber möglicherweise auch auf den *in vivo* und *in vitro* Ursprung der Proben zurückzuführen sein.

Zusammenfassend entsprechen die hMSC-Tert Adipozyten in der Expression der adipozytären Marker den primären humanen Adipozyten. Morphologisch bilden die hMSC-Tert Zellen reife humane Adipozyten noch besser ab als die primären Zellen, da für diese Zellen auch nach 12 Tagen adipozytärer Differenzierung kein monokulärer Phänotyp erreicht werden konnte. Aufgrund des großen technischen Aufwandes und der Schwierigkeit geeignete Biopsien für die Isolation humaner Präadipozyten zu bekommen, wurden die weiterführenden Experimente ausschließlich in den hMSC-Tert Adipozyten durchgeführt, da diese ein sehr gutes Modell zur Untersuchung humaner Adipozyten darstellen.

3.2 SYNTHESE UND SEKRETION VON LIPOPROTEINEN

Adipozyten synthetisieren verschiedene für den Lipoproteinstoffwechsel wichtige Proteine wie CETP und Apolipoproteine wie ApoC und insbesondere ApoE. Nach der Charakterisierung des verwendeten Zellsystems hinsichtlich der adipozytären Differenzierung, bei der sich auch eine hohe Expression des ApoE in den hMSC-Tert Adipozyten gezeigt hat, wird in diesem Abschnitt die Synthese und Sekretion von Lipoproteinen, anhand des Apolipoprotein E, durch die hMSC-Tert Adipozyten untersucht.

3.2.1 APOE-SEKRETION

ApoE trägt am N-Terminus ein 18-Aminosäuren langes Signalpeptid, welches seiner Kennzeichnung als sekretorisches Protein dient. Um die Sekretion von ApoE aus den hMSC-Tert Adipozyten zu untersuchen, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert und die ApoE-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Um einen eventuellen Einfluss der Differenzierungszusätze auf die ApoE-Sekretion auszuschließen, wurden die Zellen standardmäßig zwei Tage vor dem Experiment ausgewaschen.

Abbildung 3.6 zeigt die Sekretion von ApoE aus den hMSC-Tert Adipozyten während des Differenzierungsverlaufs. Die ApoE-Sekretion ist in ng/mg Zellprotein angegeben. Übereinstimmend mit den mRNA- und Protein-Expressionsdaten, wird an Tag 0, d.h. von den undifferenzierten Stammzellen nur sehr wenig ApoE sezerniert, steigt dann aber signifikant von Tag 7 auf ein Maximum an Tag 14.

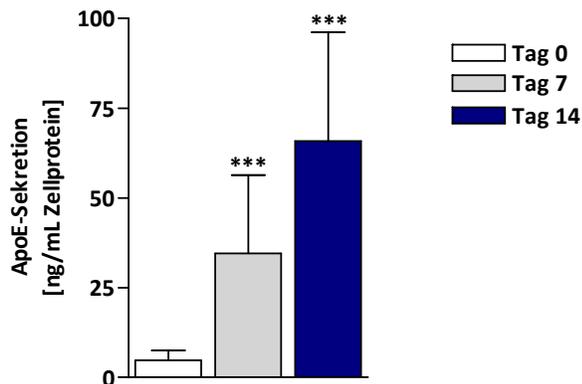


Abb.3.6 ApoE-Sekretion in den Zellkulturüberstand der hMSC-Tert Adipozyten. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll bis zu 14 Tagen differenziert. Die Abb. zeigt die ApoE Sekretion zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die ApoE Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und ist in ng/mg Zellprotein angegeben (n=3).

Wie durch die hohen Standardabweichungen in der obigen Abbildung zu sehen, liegen hohe Variationen in den Konzentration des sezernierten ApoE der hMSC-Tert Adipozyten zwischen den einzelnen Experimenten vor. Aus diesem Grund wird die ApoE-Sekretion in den nachfolgenden Experimenten in relativen Werten angegeben. Tabellen mit den Originaldaten befinden sich im Anhang (Anhang Tabelle 1-8).

3.2.2 REGULATION DER APOE-SEKRETION

Da die Charakterisierung der hMSC-Tert Zellen gezeigt hat, dass diese Zellen ApoE in hohen Konzentration synthetisieren und auch sezernieren, sollte anhand der ApoE-Sekretion überprüft werden, inwiefern die differenzierten Adipozyten Lipoproteine sezernieren. Dafür sollte zunächst geprüft werden, ob der Prozess der ApoE-Sekretion der hMSC-Tert-Adipozyten selbst einer Regulation unterliegt. Da sich in den

vorangegangenen Experimenten gezeigt hat, dass die ApoE-Sekretion durch terminal differenzierte Zellen am höchsten ist, wurden für die nachfolgenden Versuche ausschließlich differenzierte Adipozyten (Tag 14) verwendet. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll differenziert und, soweit nicht anders angegeben, die Sekretion über Nacht in serumfreies Medium gemessen. Um zunächst den Einfluss von Rosiglitazon und Insulin auf die ApoE-Sekretion zu untersuchen, wurden die Zellen über Nacht mit serumfreiem Medium mit 50 nM Insulin bzw. 1 µM Rosiglitazon, die Kontrollgruppe nur mit serumfreiem Medium, inkubiert.

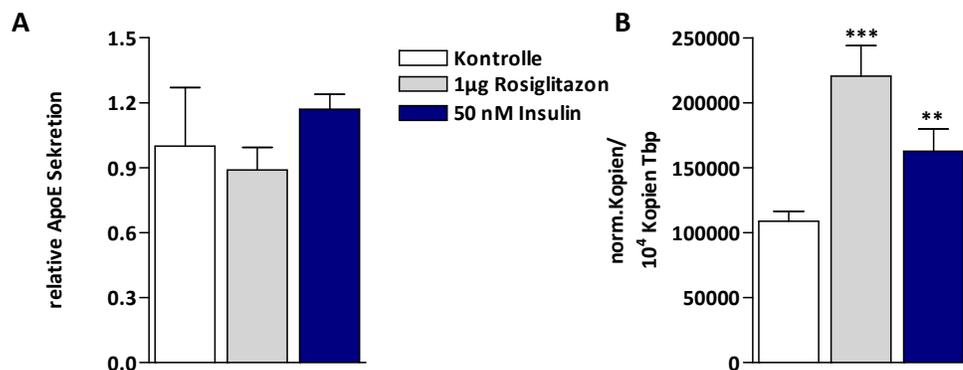


Abbildung 3.7 Sekretion (A) und Expression (B) von ApoE nach Inkubation mit 50 nM Insulin und 1 µM Rosiglitazon. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll differenziert und die Inkubation mit 50 nM Insulin oder 1 µM Rosiglitazon erfolgte über Nacht in FCS-freies Medium. Die mRNA-Expression wurde durch TaqMan®-RT-PCR, die ApoE-Sekretion mittels ELISA bestimmt. Die Genexpression ist auf die des Tbp normalisiert. Die ApoE-Sekretion ist in Bezug auf die Kontrolle in relativen Werten angegeben (n=2).

Abbildung 3.7A zeigt die ApoE-Sekretion nach Übernachtinkubation mit Insulin bzw. Rosiglitazon. Dabei ist weder durch die Stimulation mit Rosiglitazon noch durch Insulin eine signifikante Änderung der Sekretion zu beobachten. Ein Vergleich mit der ApoE mRNA-Expression nach Rosiglitazongabe zeigt wie erwartet, einen signifikanten Anstieg der Expression gegenüber der Kontrolle. Auch die Inkubation mit Insulin erhöht signifikant die ApoE-mRNA-Expression (Abb.3.7B), was ebenfalls nicht in einer gesteigerten ApoE-Sekretion resultiert.

ApoE spielt eine wichtige Rolle als Kofaktor bei der Aufnahme von Lipoproteinen. Um den Einfluss der Lipidaufnahme auf die ApoE-Sekretion zu untersuchen, wurden der Effekt der Stimulation mit Liposomen und Liposomen zusammen mit aktiver Lipoprotein Lipase auf die ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Adipozyten untersucht. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll bis Tag 14 differenziert und über Nacht ohne/mit Liposomen und Liposomen mit aktiver Lipoprotein Lipase inkubiert und anschließend die ApoE-Sekretion, sowie die ApoE-mRNA Expression gemessen. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

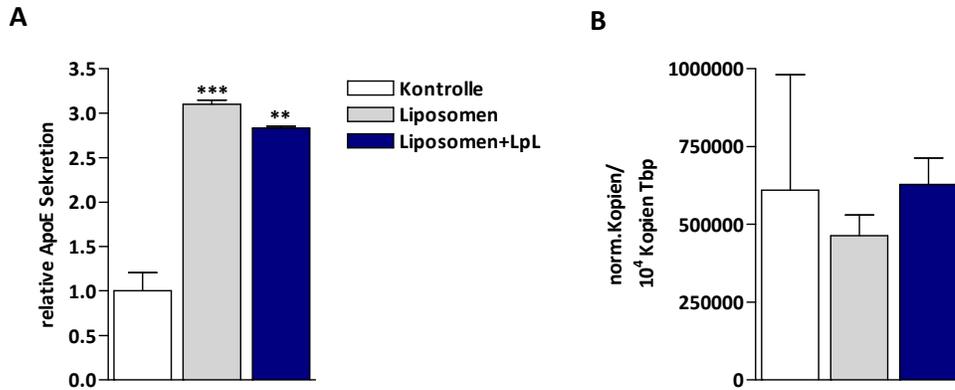


Abb.3.8 ApoE-Sekretion (A) und mRNA-Expression (B) nach Inkubation mit Liposomen und Liposomen+LpL. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll 14 Tage terminal differenziert und über Nacht mit serumfreiem Medium, serumfreiem Medium mit Liposomen und Liposomen+LpL inkubiert. Die mRNA Expression wurde mittels TaqMan® RT-PCR, die ApoE Sekretion durch ELISA bestimmt (n=2).

Die ApoE-Sekretion ist in Bezug auf die Kontrolle in relativen Werten angegeben.

Die Inkubation der Adipozyten mit Liposomen und Liposomen zusammen mit aktiver Lipoprotein Lipase führt zu einer hochsignifikanten Erhöhung der ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Adipozyten (Abb.3.8A), der nicht aus einem Anstieg der mRNA-Expression resultiert (Abb.3.8B). Durch Inkubation der Adipozyten mit Liposomen kann eine 3fach erhöhte ApoE-Sekretion gegenüber der Kontrolle erreicht werden. Eine Inkubation der Adipozyten mit Liposomen zusammen mit aktiver LpL führt ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der ApoE-Sekretion gegenüber der Kontrolle.

Vergleicht man die Inkubation mit Liposomen und die Inkubation mit Liposomen und aktiver LpL, so gibt es keinen zusätzlichen Effekt der LpL und der aus den Liposomen hydrolysierten freien Fettsäuren auf die ApoE-Sekretion. Dies deutet daraufhin, dass die Liposomen das sekretierte ApoE extrazellulär stabilisieren, wie es für HDL beschrieben ist (Dory, 1991).

Es sollte nun weiterführend überprüft werden, ob die ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Adipozyten auch durch die in Literatur beschriebenen Cholesterolakzeptoren ApoAI und HDL noch weiter gesteigert werden kann. Die Zellen wurden dafür für mit 10 µg ApoAI bzw. 10 µg HDL inkubiert und die ApoE-Sekretion über Nacht gemessen. In Abbildung 3.9 ist das Ergebnis dieser Experimente dargestellt.

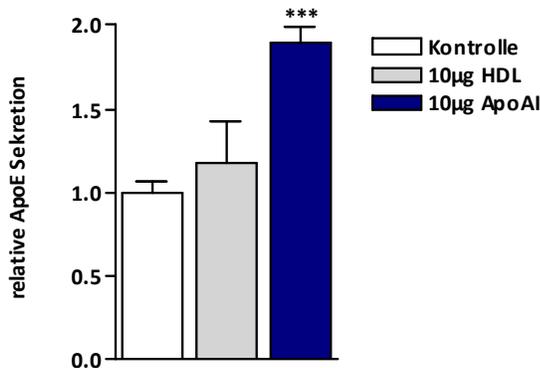


Abb.3.9 ApoE-Sekretion nach Inkubation mit HDL bzw. ApoAI in den Zellkulturüberstand. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll differenziert über Nacht mit 10 µg/mL HDL bzw. 10 µg/mL ApoAI inkubiert. Die ApoE-Sekretion wurde mittels ELISA bestimmt und ist als relativer Wert zur Kontrolle angegeben. Die ApoE-Sekretion ist in Bezug auf die Kontrolle in relativen Werten angegeben (n=2).

Die Stimulation der Adipozyten mit ApoAI führt zu einer signifikanten Erhöhung der ApoE-Sekretion, wohingegen dieser in der Literatur ebenfalls für HDL beschriebene Effekt für die hMSC-Tert Adipozyten hier nicht reproduziert werden konnte. Eine Stimulation der Zellen mit HDL resultiert, im Gegensatz zu der Inkubation mit Liposomen, somit nicht in einer veränderten ApoE-Sekretion.

Um die Regulation der ApoE-Sekretion weiterführend zu untersuchen, wurde im Folgenden der Einfluss von spezifischen Inhibitoren auf die Proteinsekretion getestet. Dafür wurden Inhibitoren ausgewählt, die den sekretorischen Weg in der Zelle an verschiedenen Punkten inhibieren.

Für die konstitutive Proteinsekretion ist vor allem ein intakter Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran erforderlich. Um eine mögliche konstitutive Sekretion des ApoE zu untersuchen, wurden die Zellen 4 Stunden in serumfreiem Medium mit Brefeldin A (BFA), Colchicin und Cytochalasin D inkubiert. BFA ist ein aus einem Pilz isoliertes Metabolit. Es hemmt die Aktivierung von ADP-Ribosylierungsfaktoren und damit die Bildung von COPI-Vesikeln am Golgi-Apparat (Donaldson et al., 1991), wodurch sekretorische Proteine wieder in das endoplasmatische Retikulum rückverlagert werden (Lippincott-Schwartz et al., 1990). Colchicin ist ein pflanzliches Alkaloid, welches an die freien Mikrotubulli-Untereinheiten bindet, so dass diese für den intrazellulären Vesikeltransport nicht mehr zur Verfügung stehen, was dadurch in einer intrazellulären Proteinaggregation resultiert (Hamel, 1996). Cytochalasin D ist ebenfalls ein aus einem Pilz isoliertes Metabolit, welches auf das Aktinskelett der Zelle wirkt, indem es die Polymerisation und Elongation des Aktins inhibiert und eine Arretierung der kontraktiven Aktinfilamente nach sich zieht (Brown and Spudich, 1981). Eingesetzt wurden jeweils die höchsten nicht cytotoxisch-wirkenden Konzentrationen der einzelnen Inhibitoren. Abbildung 3.10 vergleicht die ApoE-Sekretion nach Inkubation mit BFA, Colchicin und Cytochalasin D.

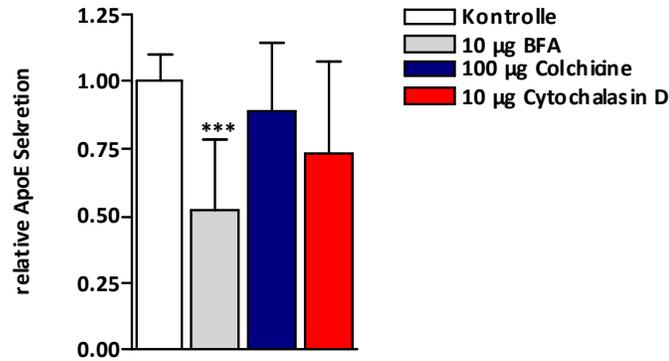


Abb.3.10 ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Adipozyten nach Inkubation mit Cytochalasin D, Colchicin und BFA. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll für 14 Tage differenziert und 4h mit serumfreiem Medium mit steigender Inhibitor-Konzentration inkubiert. Die ApoE-Sekretion in den Zellkulturüberstand wurde anschließend mittels ELISA gemessen. Die ApoE-Sekretion ist in Bezug auf die Kontrolle in relativen Werten angegeben (n=3).

Eine Blockierung des Golgi-Apparates durch BFA führt zur einer signifikant reduzierten ApoE-Sekretion der Adipozyten um ca. 50%. Eine Blockade des Vesikeltransports durch Colchicin, welcher sich der Prozessierung der Proteine durch den Golgi-Apparat anschließt führt dagegen nur zu einer um ca. 10% verringerten Sekretion von ApoE. Die Inkubation mit Cytochalasin D bewirkt eine 30%igen Reduktion der Sekretion. Der Effekt ist aber für beide Inhibitoren nicht signifikant. Dies deutet darauf hin, dass ein intaktes Aktinskelett für eine ApoE-Sekretion nötig ist, wohingegen die Aktivität der Mikrotubulli für die ApoE-Sekretion der Adipozyten nur eine untergeordnete Bedeutung zu haben scheint.

Im nächsten Schritt wurde eine Regulation der ApoE-Sekretion durch intrazelluläres Calcium-Signaling getestet. Dafür wurden die Inhibitoren BAPTA-AM und 2-APB verwendet. BAPTA-AM ist ein Calcium-Komplexbildner, welches freies Ca^{2+} in der Zelle bindet und die Calcium-regulierte Proteinsekretion inhibiert (Tsien, 1980; Strayer et al., 1999). 2-APB ist ein spezifischer IP_3 -Rezeptor Antagonist (Maruyama et al., 1997). Abbildung 3.11 zeigt, dass beide Inhibitoren eine signifikante Reduktion der ApoE-Sekretion um ca. 30-35% verursachen.

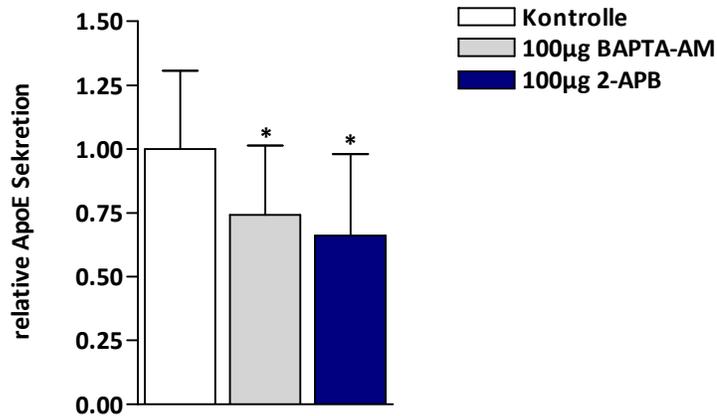


Abb.3.11 ApoE-Sekretion der differenzierten Adipozyten nach Inkubation mit BAPTA-AM und 2-APB. Die Zellen wurden für 14 Tage nach dem Standardprotokoll differenziert und mit serumfreiem Medium und je 100 µg/mL Inhibitor für 4h inkubiert. Die ApoE-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde anschließend mittels ELISA bestimmt (n=3).

Eine Inhibition der Proteinkinase A durch H89 führt ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der ApoE-Sekretion durch die hMSC-Tert Adipozyten. Abbildung 3.12 zeigt einen Rückgang der Sekretion durch H89 um ca. 30%.

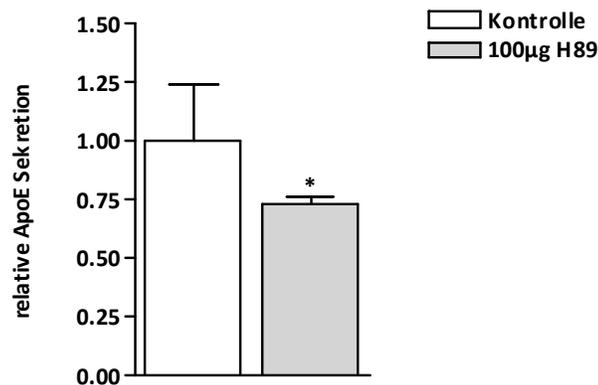


Abb.3.12 ApoE-Sekretion in den Zellkulturüberstand nach Inkubation der Zellen mit 100 µg H89. Die Zellen wurden für 14 Tage nach dem Standardprotokoll differenziert und mit serumfreiem Medium und für 4 Stunden mit 100 µg H89 inkubiert. Die ApoE-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde anschließend mittels ELISA bestimmt und ist in Bezug auf die Kontrolle in relativen Werten angegeben (n=3).

Zusammenfassend kann die ApoE-Sekretion sowohl durch eine Blockade des Golgi-Apparates, des Calcium-Signalings und durch eine Inhibition der PKA signifikant beeinträchtigt werden. Keiner der getesteten Inhibitoren führt aber zu einer vollständigen Blockade der ApoE-Sekretion, so dass eine komplexe Regulation der ApoE-Sekretion wahrscheinlich ist.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die ApoE-Sekretion durch ApoAI signifikant gesteigert werden kann (Abb. 3.9), wurde in einem weiterführenden Experiment

geprüft, ob das durch ApoAI mobilisierte ApoE über alternative Sekretionswege aus den Zellen ausgeschleust wird. Dafür wurden die Zellen zunächst für 30 min mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert, um eine Bindung der Inhibitoren zu ermöglichen. Anschließend wurden 10 µg ApoAI den Reaktionsansätzen gegeben und für weitere 4 Stunden inkubiert. Abbildung 3.13A vergleicht die ApoE-Sekretion nach Inhibition mit BFA und Colchicin und Stimulation durch ApoAI.

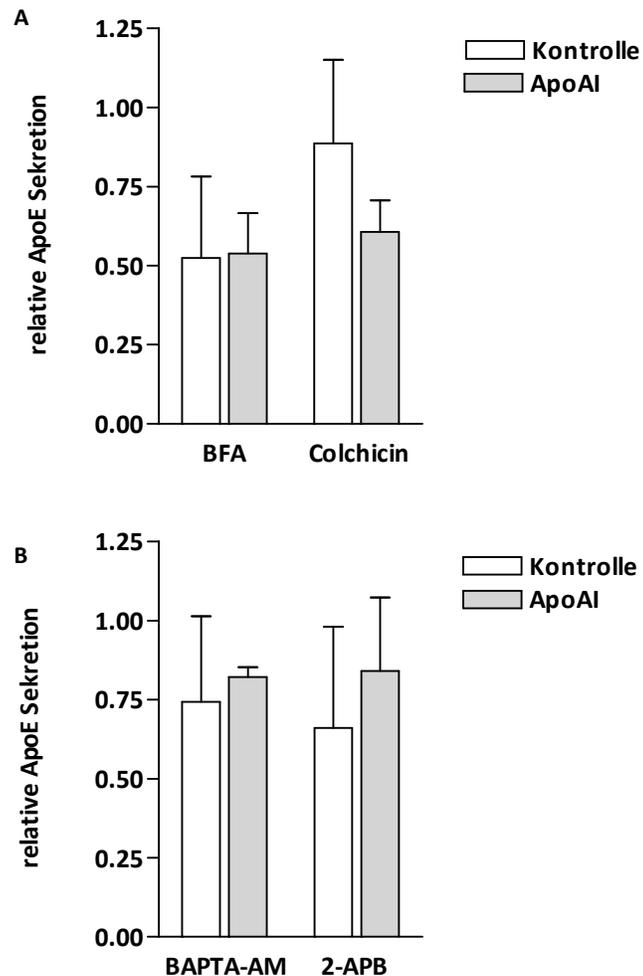


Abb.3.13 ApoE-Sekretion in den Zellkulturüberstand nach Inhibition mit BFA und Cochicin und Stimulation durch ApoAI (A) und nach Inkubation mit BAPTA-AM und 2-APB und Stimulation durch ApoAI (B). Die Zellen wurden für 14 Tage nach dem Standardprotokoll differenziert und die Inhibition erfolgte in serumfreiem Medium für 30 min. Anschließend wurden 10 µg ApoAI zu den Inkubationsansätzen gegeben und für weitere 4 Stunden inkubiert. Die ApoE-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und ist in Bezug auf die Kontrolle in relativen Werten angegeben (n=3).

Die durch BFA um ca. 50% verminderte Sekretion kann durch eine Stimulation mit ApoAI nicht wieder gesteigert werden, auch hier beträgt die Sekretion nur ca. 50% des Basalwertes. Bei einer Inhibition mit Colchicin, liegt die Konzentration nach Stimulation mit ApoAI mit nur ca. 60% des Basalwertes noch unter der Inhibitorkontrolle mit ca. 80%.

In Abb. 13.B ist für die Inhibitoren BAPTA-AM und 2-APB nach Stimulation mit ApoAI jeweils eine leichte Erhöhung der ApoE-Sekretion zu beobachten, jedoch sind beide Effekte nicht signifikant.

Abb. 14 zeigt die Inhibition der PKA durch H89 und die infolgedessen verringerte ApoE-Sekretion. Auch hier konnte keine zusätzliche Stimulation durch ApoAI erreicht werden.

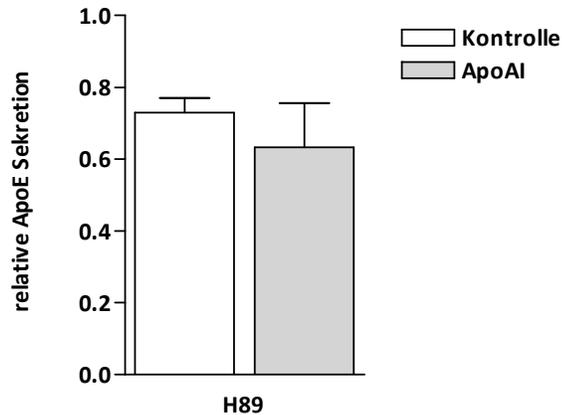


Abb.3.14 ApoE-Sekretion in den Zellkulturüberstand nach Inhibition mit H89 und Stimulation durch ApoAI. Die Zellen wurden für 14 Tage nach dem Standardprotokoll differenziert und die Inhibition erfolgte in serumfreiem Medium für 30 min. Anschließend wurden 10 µg ApoAI zu den Inkubationsansätzen gegeben und für weitere 4 Stunden inkubiert. Die ApoE-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und ist in Bezug auf die Kontrolle in relativen Werten angegeben (n=3).

Um die ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Adipozyten mit der anderer adipozytenspezifischer Proteine zu vergleichen, wurde in den Proben mit signifikanter Reduktion der ApoE-Konzentration die Adiponektin-Sekretion in den Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Abb.3.14 zeigt die Adiponektin-Konzentration nach Inhibition mit BFA, BAPTA-AM und H89 (A) und nach gleichzeitiger Stimulation durch ApoAI (B). Die Adiponektin-Sekretion kann signifikant durch BFA und H89 inhibiert werden (Abb.3.15A). Bei gleichzeitiger Stimulation durch ApoAI (Abb.3.15B) kann keine zusätzliche Mobilisierung des Adiponektins erzielt werden, in diesem Fall führen alle drei getesteten Inhibitoren zu einer signifikanten Reduktion der Adiponektin-Sekretion verglichen mit der ausschließlich mit ApoAI stimulierten Kontrolle.

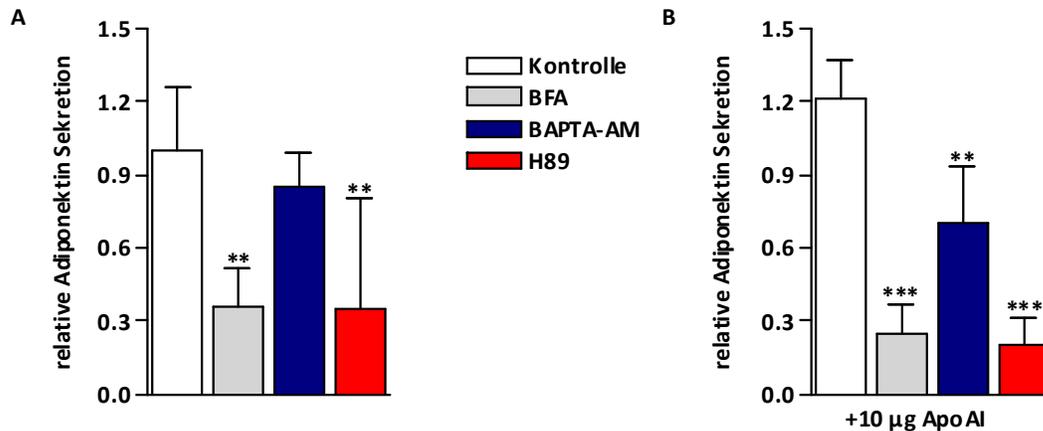


Abb.3.15 Adiponektin-Sekretion in den Zellkulturüberstand nach Inhibition mit BFA, BAPTA-AM und H89 (A) und Stimulation durch ApoAI (B). Die Zellen wurden für 14 Tage nach dem Standardprotokoll differenziert und die Inhibition erfolgte in serumfreiem Medium für 30 min. Anschließend wurden 10 µg ApoAI zu den Inkubationsansätzen gegeben und für weitere 4 Stunden inkubiert (B). Die Adiponektin-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und ist in Bezug auf die Kontrolle in relativen Werten angegeben (n=2).

Zusammenfassend ist trotz einer Erhöhung der basalen ApoE-Sekretion durch ApoAI, die ApoE-Sekretion nach Inhibition des Golgi-Apparates (BFA), des Aktin-Skeletts (Colchicin), des Calcium-Signalings (BAPTA-AM und 2-APB) und der PKA durch H89 keine Stimulation durch ApoAI erreicht werden. Die durch ApoAI mobilisierte ApoE-Sekretion verläuft demnach über die gleichen sekretorischen Wege wie die basale ApoE-Sekretion.

Für Adiponektin konnte eine Reduktion der Sekretion durch BFA und H89 um ca. 70% gezeigt werden. Die Inhibition mit BAPTA-AM dagegen ist nicht signifikant. Eine Stimulation mit ApoAI führt auch hier zu keiner Aufhebung der Inhibition. Da dieses Experiment nur einmal als Kontrolle zur ApoE-Sekretion durchgeführt wurde, muss es in weiteren Experimenten bestätigt werden.

3.2.3 CHARAKTERISIERUNG DER SEKRETIERTEN LIPOPROTEINE

Nachdem eine komplexe Regulation der ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Adipozyten gezeigt werden konnte, sollte anschließend anhand der ApoE-Sekretion die Lipoproteinskeretion der Adipozyten analysiert werden. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob ApoE in lipidierter Form als Lipoprotein von den Adipozyten sezerniert wird. Dafür wurden die Zellen nach dem Standardprotokoll für 14 Tage differenziert und der Überstand gesammelt. Die in den Zellkulturüberstand sekretierten Lipoproteine wurden über eine Gelfiltrationschromatographie (FPLC) nach ihrer Größe getrennt und die ApoE-Konzentration mittels ELISA in den einzelnen Fraktionen bestimmt. In den ApoE-Fraktionen sollte anschließend die Cholesterol-, Triglyzerid- und Phospholipidkonzentration durch enzymatisch gekoppelte Bestimmungen erfasst werden. Es stellte sich heraus, dass mit den verwendeten kommerziellen Analysemethoden keine Lipide in den ApoE-Fraktionen nachgewiesen werden konnten. Auch nach einer Aufkonzentration des Zellkulturüberstandes oder

einer Aufreinigung des ApoE aus dem Überstand über eine Affinitätschromatographie-Säule konnten keine Lipide in den ApoE-Fractionen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da die Sensitivität dieser enzymgekoppelten Tests offenbar nicht ausreicht eine geringe Menge Lipid in den ApoE-Fractionen zu bestimmen, wurde eine Inkubation mit radioaktiv markierten Lipiden durchgeführt. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll differenziert und für 4 Stunden mit ^3H -Cholesterol, ^3H -Phosphatidylcholin oder ^3H -Cholinchlorid inkubiert. ^3H -Cholesterol und ^3H -Phosphatidylcholin sollten nach der Aufnahme in sezernierte Lipoproteine eingebaut vorliegen, ^3H -Cholinchlorid dient als Cholinquelle für die Eigensynthese der Phospholipide.

Nach 4 stündiger Inkubation wurde die Radioaktivität abgenommen und die Zellen zunächst für 1 Stunde in DMEM (4 g/mL Glukose) + 5% Lipoprotein-defizientem Serum (LPDS) und anschließend über Nacht serumfrei in DMEM (1 g/mL Glukose) inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Zellkulturüberstand gesammelt, das ApoE über eine Affinitätschromatographie (Heparin-Sepharose) aufgereinigt und die ApoE-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Auch bei diesen Experimenten konnte keine Anreicherung radioaktiver Lipide in den ApoE-Fractionen nachgewiesen werden. Die Tabelle 3.1 zeigt exemplarisch die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

	^3H -Cholesterol [cpm]		^3H -Phosphatidylcholin [cpm]		^3H -Cholinchlorid [cpm]		ApoE Konzentration [ng/mL]	
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2
Überstand	2898	3065	908	1244	8819	7823	52,4	49,9
Eluat	82	144	24	88	74	152	58,7	53,9
Durchlauf	2675	2772	582	704	5817	6152	3,8	0,96
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2

Tabelle 3.1 Inkubation der hMSC-Tert Adipozyten mit ^3H -markierten Lipiden. Der Überstand wurde gesammelt und über eine Affinitätschromatographie-Säule (Heparin-Sepharose) aufgereinigt. Die ApoE-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und die ^3H -Aktivität wurde im β -Counter gemessen.

Da diese Experimente auf eine lipidfreie Sezernierung des ApoE hindeuten, wurde weiterführend getestet inwiefern sich die Zusammensetzung des sezernierten Lipoprotein-Partikel durch Zugabe von Lipiden zum Kulturmedium ändert, wurden Zellen über Nacht vergleichend mit serumfreiem Medium mit 1% BSA (Fettsäure frei) oder 1% Lipoprotein-haltigem Serum inkubiert und anschließend eine Gelchromatographie durchgeführt.

Die Abbildung 3.16 zeigt die ApoE-Konzentration in den FPLC-Fractionen. Bei Inkubation mit 1% BSA liegt der Peak zwischen den Fractionen 5-20, was einer

Partikelgröße zwischen 30 und 18 nm Durchmesser und somit VLDL bzw. LDL entspricht. Bei Inkubation mit 1% FCS im Medium hingegen ist eine deutliche Verschiebung des ApoE-Peaks hin zu Fraktion 13-30 zu beobachten. Die Partikel haben nun eine Größe von 20 und 5 nm, was LDL bzw. HDL entspricht.

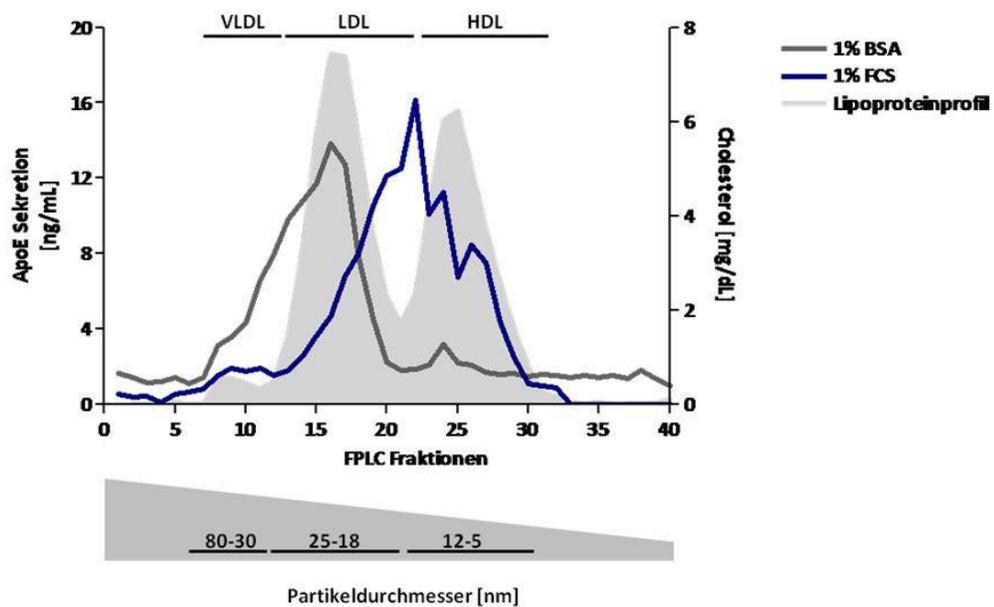


Abb.3.16 ApoE-Konzentration in den FPLC-Fraktionen. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll für 14 Tage differenziert. Für das Experiment wurden die Zellen über Nacht in Hungermedium mit 1% BSA bzw. 1% FCS inkubiert. 200µL Überstand wurden über eine S6-FPLC-Säule getrennt und die ApoE-Konzentration in den Fraktionen wurde mittels ELISA bestimmt.

Die Verschiebung des Ausschlussvolumens könnte auf eine Aggregation des ApoE in lipidfreiem Medium hindeuten. Bei Inkubation mit Serum hingegen, kann die Verschiebung der Größe auf eine Assoziation von ApoE an die im Serum vorliegenden Lipoproteine bedeuten.

Zusammenfassend konnte mit verschiedenen Methoden der ApoE-Aufreinigung aus dem Zellkulturüberstand nachgewiesen werden, dass ApoE lipidfrei in das extrazelluläre Milieu abgegeben wird und dort mit Lipoproteinen assoziieren kann.

3.3 AUFNAHME VON APOE-HALTIGEN LIPOPROTEINEN

Da die vorangegangenen Untersuchungen im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zur Charakterisierung der hMSC-Tert Zelllinie und weiterer Adipozyten-Zelllinien gezeigt haben, dass Adipozyten während ihrer Differenzierung verstärkt ApoE und Lipoprotein-Rezeptoren synthetisieren, sollte im dritten Teil die Hypothese geprüft werden, ob Adipozyten aus diesem Grund vermehrt Lipoproteine durch rezeptorvermittelte Endozytose aufnehmen.

3.3.1 AUFNAHME VON $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -MARKIERTEN LIPOSOMEN IN HMSC-TERT

ADIPOZYTEN

Um die Aufnahme von Lipoproteinen in hMSC-Tert Adipozyten zu untersuchen wurden zunächst Untersuchungen mit radioaktiv markierten Liposomen durchgeführt. Die Liposomen wurden aus Lipiden zusammengesetzt, welche aus humanen Chylomikronen eines hyperlipämischen Spenders isoliert wurden. Zur Markierung wurde dem Lipidextrakt ein radioaktives Doppellabel zugesetzt, wobei ^{14}C -Triolein zur Markierung der hydrolysierbaren Triglyzeride der Liposomen und ^3H -Cholesteroleylether zur Markierung des Lipidkerns genutzt wurde. Cholesteroleylether können intrazellulär nicht hydrolysiert werden, folglich entspricht die intrazelluläre Menge an ^{14}C -Aktivität einer Fettsäureaufnahme, die gemessene ^3H -Aktivität hingegen einer Partikelaufnahme in die Adipozyten.

Die Zellen wurden standardmäßig bis Tag 7 und Tag 14 differenziert, als Kontrollzellen wurden undifferenzierte hMSC-Tert-Zellen (Tag 0) verwendet. Die Zellen wurden über Nacht in Hungermedium (DMEM 1 g/mL Glukose, 0,1% fettsäurefreies BSA, 1% Penicillin/Streptomycin) gehalten und am nächsten Tag für 1 bzw. 4 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 mit 3 verschiedenen Versuchsansätzen inkubiert, wobei einer Liposomen allein, die anderen beiden zusätzlich aktive bzw. inaktive Lipoprotein Lipase enthielten. Die Ergebnisse der ^3H -Cholesteroleylether-Aufnahme aus 4 unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 3.17 zusammengefasst.

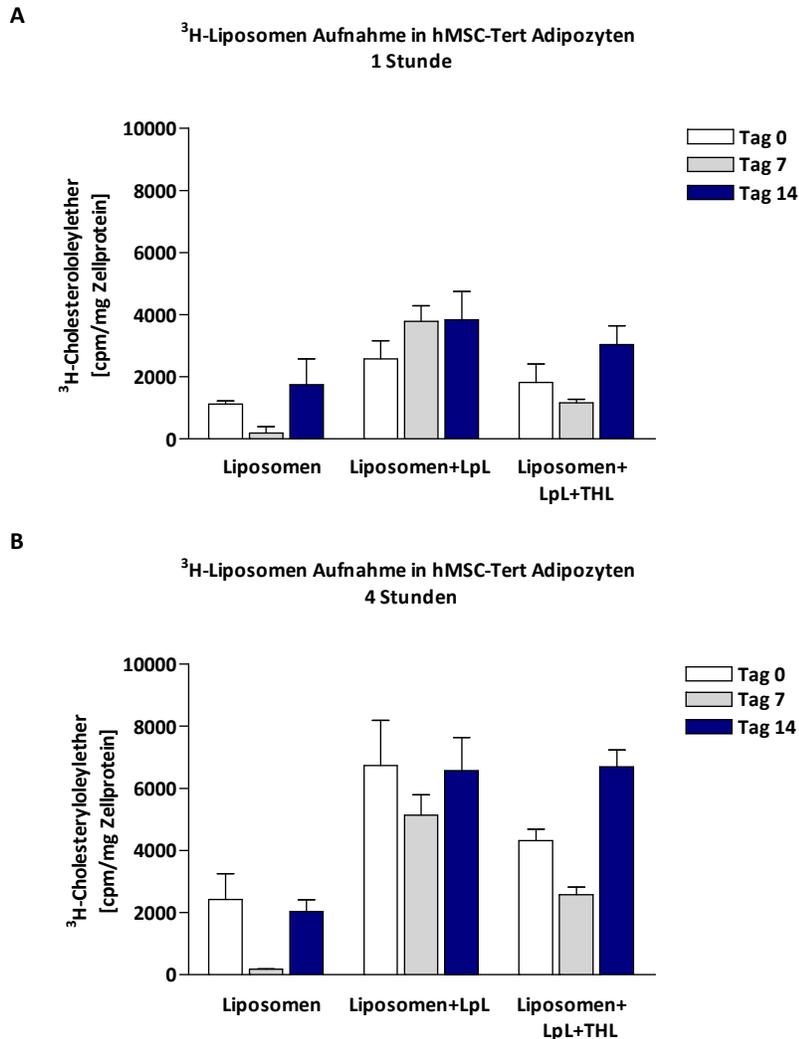


Abb.3.17 Aufnahme von ³H-Cholesteroleylether markierten Liposomen in hMSC-Tert Adipozyten. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll 7 bzw. 14 Tage differenziert und für 1 Stunde (A) oder 4 Stunden (B) mit radioaktiv markierten Liposomen inkubiert. Als Kontrolle wurden undifferenzierte Zellen (Tag 0) mitgeführt. Die Unterschiede in der Aufnahme sind nicht signifikant (n=4).

In Abbildung 3.17A ist die Aufnahme von ³H-Cholesteroleylether nach 1, in 3.17B nach 4 Stunden dargestellt. Bereits nach 1 Stunde kann man in Anwesenheit von aktiver LpL einen 2,3fachen Anstieg der ³H-Aktivität in die undifferenzierten Zellen, einen 20fachen Anstieg bei 7 Tagen und einen 2fachen Anstieg bei 14 Tage differenzierten Zellen beobachten. Bei Inaktivierung der LpL durch Tetrahydrolipstatin, einem spezifischen LpL-Inhibitor, ist gegenüber dem Basalwert immer noch eine erhöhte Aufnahme zu beobachten. Nach 4 Stunden Inkubation ist ein ähnliches Muster hinsichtlich der Partikelaufnahme zu beobachten, wobei eine deutlich gesteigerte Aufnahme mit aktiver LpL zu verzeichnen ist. Die gesteigerte Aufnahme in Anwesenheit von LpL, aktiv und inaktiv, gegenüber Liposomen allein impliziert eine strukturelle Bedeutung der Lipoprotein Lipase für die Partikelaufnahme in die Adipozyten. Da dieser Effekt auch bei undifferenzierten Zellen zu sehen ist, konnte mit dieser Methode kein Adipozyten spezifischer Effekt in Bezug auf die Partikelaufnahme

detektiert werden. Auffällig ist eine verringerte Aufnahme der 7 Tage differenzierten Zellen, sowohl nach einer als auch nach 4 Stunden Inkubation, die sich nicht aus dem Experiment erklären lassen, oder auf eine verringerte Rezeptor-Expression an Tag 7 zurückzuführen sind (vergl. Abb.3.2).

Abbildung 3.18 zeigt die Aufnahme von ^{14}C -Triolein in die Adipozyten nach 1 (A) und nach 4 Stunden (B). Wie zu erwarten, steigt in Anwesenheit von aktiver LpL bereits nach 1 Stunde die intrazelluläre ^{14}C -Aktivität auf das 5,8fache des Basalwertes, da vermutlich extrazellulär ^{14}C -markierte Fettsäuren von der LpL freigesetzt und von den Zellen aufgenommen werden. Bei Inaktivierung der LpL durch Tetrahydrolipstatin lässt sich die Aufnahme der ^{14}C -markierten Fettsäuren signifikant inhibieren. Nach 4 Stunden Inkubation ist bei den undifferenzierten Zellen ein Anstieg um das 8,2fache des Basalwertes, an Tag 7 sogar um das 113fache zu beobachten. Auch hier kommt es zu einer signifikanten Verringerung der Aufnahme bei Inhibition der LpL.

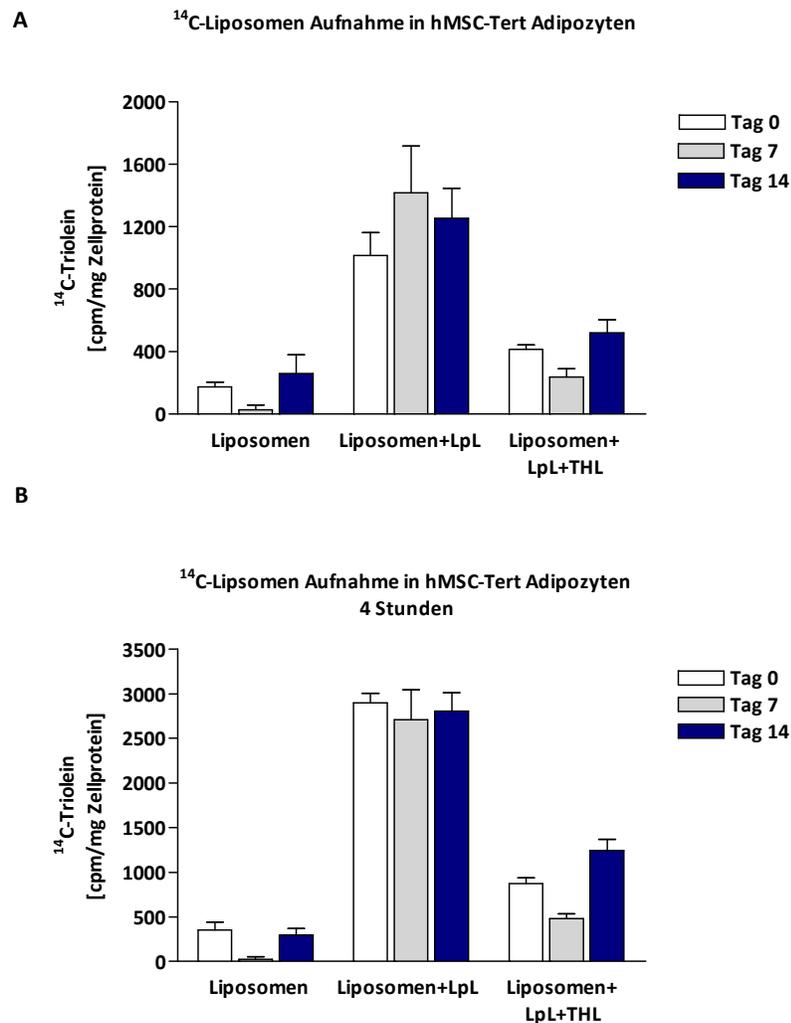


Abb.3.18 Aufnahme von ^{14}C -Triolein markierten Liposomen in hMSC-Tert Adipozyten. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll bis 7 bzw. 14 Tage differenziert und für 1 (A) bzw. 4 (B) Stunden mit radioaktiv markierten Liposomen inkubiert. Als Kontrolle wurden undifferenzierte Zellen (Tag 0) mitgeführt (n=4).

Insgesamt ist eine Partikelaufnahme, gemessen am Anstieg der intrazellulären ^3H -Aktivität, in Anwesenheit von inaktiver LpL zu beobachten. Der Anstieg der intrazellulären ^{14}C -Aktivität wird bei Zugabe von aktiver LpL deutlich gesteigert. Dies deutet primär auf Aufnahme der aus den Lipoproteinen hydrolysierten Fettsäuren. Auch für die Fettsäure-Aufnahme ist eine beeinträchtigte Aufnahme an Tag 7 zu beobachten, die sich aus dem Experiment nicht erklären lässt.

Für Adipozyten sind u.a. die Fettsäuretransporter CD36, FATp1 und auch SR-BI in der Literatur beschrieben. Um eine spezifische Aufnahme über diese Transporter zu untersuchen, müssten z.B. über lentiviralen shRNA-Knockdown diese Transporter gezielt ausgeschaltet werden.

Da sich Hinweise auf eine gesteigerte Partikelaufnahme, zumindest in Anwesenheit die LpL ergeben haben, sollte weiterführend die spezifische Aufnahme über die Lipoprotein-Rezeptoren LDL-R, VLDL-R und LRP1 für die Partikelaufnahme getestet werden. Dabei wurden die Lipoprotein-Rezeptoren zunächst mit den Liganden *Chaperon Receptor-associated Protein* (RAP), LDL und Lactoferrin inhibiert und anschließend die spezifische Aufnahme der radioaktiv markierten Liposomen gemessen. RAP ist gleichermaßen ein Ligand für LRP1 als auch für den VLDL-R, LDL bindet an den LDL-R und Lactoferrin ist ein Ligand für LRP1. Da die höchste Partikelaufnahme in Anwesenheit von aktiver LpL gemessen wurde, wurde in diesem Experiment ausschließlich dieser Ansatz gewählt. Die Zellen wurden zunächst für 15 min mit 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RAP oder 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lactoferrin vorinkubiert, um eine Bindung der Liganden an die Rezeptoren zu ermöglichen und so eine Inhibition zu gewährleisten. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Liposomen zu den Inhibitionsansätzen pipettiert und für weitere 1 bzw. 4 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

In der Abbildung 3.19 ist die Aufnahme von ^3H -Cholesterolethylether markierten Liposomen nach 1 (A) und nach 4 Stunden (B) dargestellt. In den undifferenzierten Zellen ist insgesamt eine geringfügig höhere Partikelaufnahme gegenüber den differenzierten Zellen zu beobachten. Die Inhibition der Lipoprotein-Rezeptoren mit LDL, RAP und Lactoferrin hat keinen signifikanten Effekt auf die Partikelaufnahme. Nach einer Stunde ist eine sehr leichte Tendenz auf eine verringerte Aufnahme in 7 Tage differenzierten Zellen nach Inhibition mit Lactoferrin zu beobachten. Nach 4 Stunden Inkubation sind keine Unterschiede in der Aufnahme mehr zu beobachten.

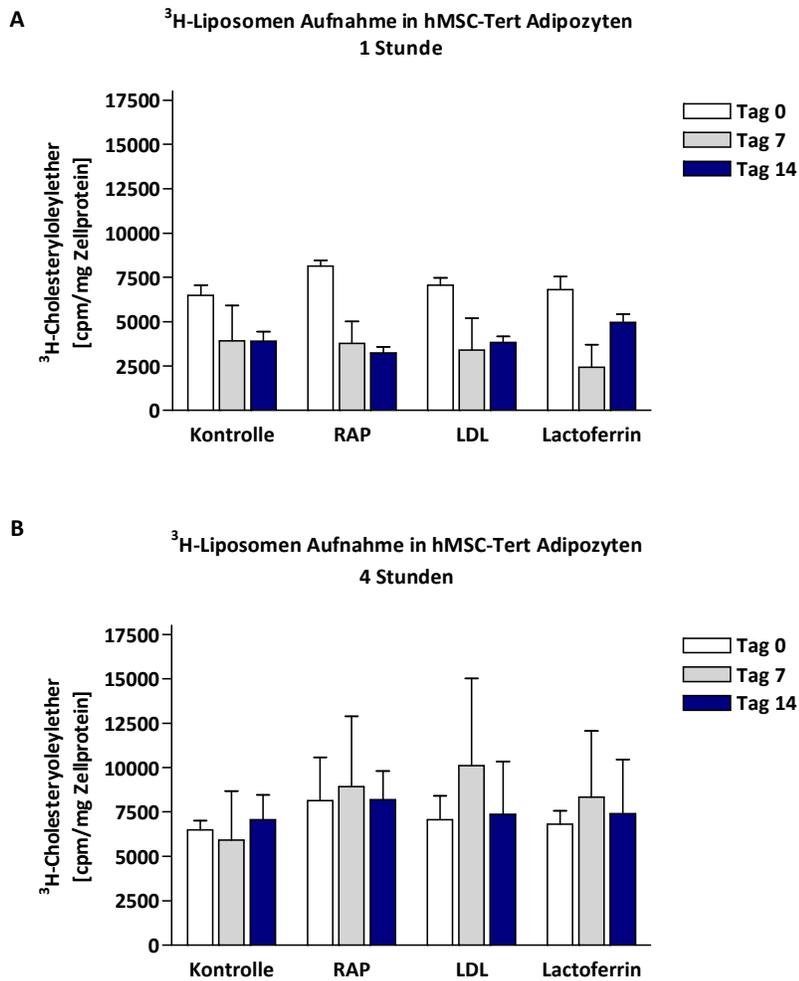


Abb.3.19 Aufnahme von ^3H -Cholesteroloylether markierten Liposomen in Anwesenheit von aktiver LpL in hMSC-Tert Adipozyten nach 1 Stunde (A) und nach 4 Stunden (B). Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll bis Tag 14 differenziert und für 4 Stunden mit ^3H -CE inkubiert. Die Zellen wurden je nach Ansatz vor der Inkubation mit ^3H -Cholesteroloylether 15 min mit 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RAP oder 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lactoferrin inkubiert (n=2).

Auch die in Abbildung 3.20 dargestellte Aufnahme von ^{14}C -Triolein markierten Liposomen bleibt durch Inhibition der Lipoprotein-Rezeptoren durch die Liganden LDL, RAP und Lactoferrin unbeeinflusst, was für die Fettsäure-Aufnahme zu erwarten gewesen ist.

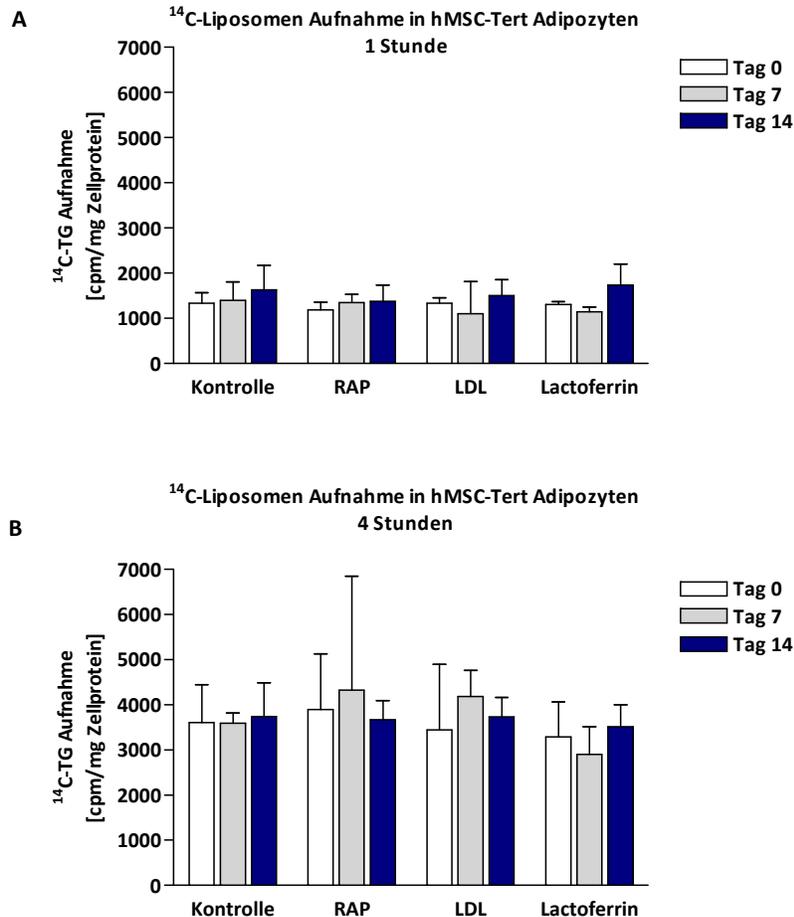


Abb.3.20 Aufnahme von ¹⁴C-Triolein markierten Liposomen in Anwesenheit von aktiver LpL in hMSC-Tert Adipozyten. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll bis d14 differenziert und für 1 (A) bzw. 4 Stunden (B) mit ¹⁴C-Triolein inkubiert. Die Zellen wurden je nach Ansatz vor der Inkubation mit ¹⁴C-Triolein 15 min mit 200 µg/mL LDL, 100 µg/mL RAP oder 100 µg/mL Lactoferrin inkubiert (n=2).

3.3.2 AUFNAHME VON ¹²⁵I-CHYLOMIKRONEN-REMNANTS IN HMSC-TERT ADIPOZYTEN

Nachdem in den Experimenten mit ³H/¹⁴C markierten Liposomen eine geringe Partikel Aufnahme in die Adipozyten gezeigt werden konnte, führte die Inhibition des LDL-Rezeptors und von LRP1 nicht zu einer Verringerung der Aufnahme.

Aus diesem Grund wurden im Folgenden Aufnahme-Experimente mit ¹²⁵I-markierten Chylomikronen-Remnants durchgeführt, da diese Apolipoproteine enthalten und somit besser die physiologischen Bedingungen der Partikel Aufnahme nachahmen. Die Chylomikronen-Remnants wurden aus dem Plasma eines ApoCII-defizienten Spenders durch Ultrazentrifugation (2.5.7) gewonnen und der Proteinanteil der CR mit radioaktivem ¹²⁵Iod markiert. Die Inkubation der Adipozyten erfolgte wie bei den vorangegangenen Experimenten für 1 bzw. 4 Stunden in Anwesenheit von aktiver oder inaktiver Lipoprotein Lipase. Um die Effizienz der CR-Aufnahme in Adipozyten mit der von Leberzellen zu vergleichen, wurden die Experimente auch in humanen HuH7-

Hepatomazellen durchgeführt. In Abbildung 3.21 sind die Ergebnisse als Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.21A zeigt die Aufnahme der ¹²⁵I-markierten Chylomikronen-Remnants in die Adipozyten nach 1 Stunde Inkubation. In dem Ansatz ohne LpL ist eine erhöhte Aufnahme in den terminal differenzierten Zellen zu beobachten. Insgesamt ist, wie bei der Liposomen-Aufnahme, eine erhöhte Aufnahme von Chylomikronen-Remnants in Anwesenheit von LpL zu beobachten. Auch ist ein Trend zu erhöhter Aufnahme in den 7 bzw. 14 Tage differenzierten Zellen gegenüber den undifferenzierten Zellen zu beobachten, der allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant ist. Nach 4 Stunden Inkubation (3.21B) verstärkt sich die Differenz zwischen den undifferenzierten zu den differenzierten Zellen bei Inkubation mit aktiver LpL. Bei inaktiver LpL sind keine Unterschiede zwischen den einzelnen Differenzierungsstadien mehr zu verzeichnen.

In Abbildung 3.21C ist die Aufnahme in die HuH7-Hepatomazellen gezeigt, die als Positivkontrolle für das Experiment mitgeführt wurden. Hier ist ein deutlicher Anstieg der Partikelaufnahme nach 4 Stunden Inkubation mit LpL zu beobachten.

Insgesamt ist die Chylomikronen-Remnant-Aufnahme in die HuH7-Zellen 3fach höher als in die hMSC-Tert Adipozyten, was der Leberzelle physiologisch als Hauptabnehmer der durch Nahrung aufgenommener Chylomikronen-Remnants entspricht.

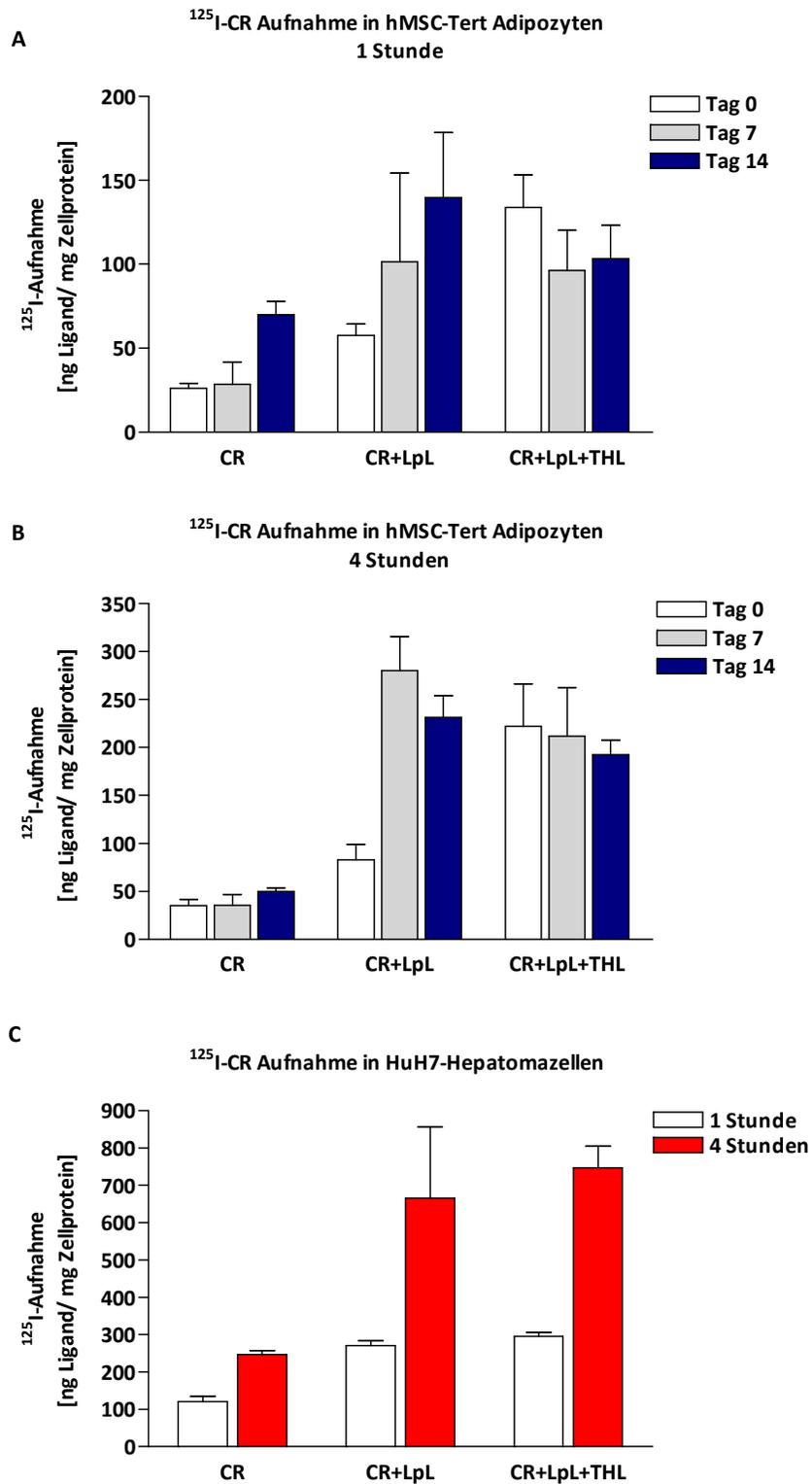


Abb.3.21 Aufnahme von ^{125}I -markierten Chylomikronen-Remnants in hMSC-Tert Adipozyten und HuH7-Hepatomazellen. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll bis 14 Tage differenziert. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ Proteinanteil für 1 (A) bzw. 4 Stunden (B) mit CR, CR+LpL, CR+LpL+THL. Als Kontrolle wurden undifferenzierte Tert-Zellen und HuH7-Hepatomazellen (C) mitgeführt (n=4).

Da die Lipoprotein-Clearance aus dem Plasma und auch die Aufnahme über LRP1 in die Leber Insulin-abhängig ist (Laatsch et al., 2009), wurde in einem weiteren Experiment überprüft, ob auch die Partikelaufnahme in Adipozyten durch Insulin stimulierbar ist. Dafür wurden die Zellen vor der Inkubation mit ^{125}I -Chylomikronen-Remnants für 15 min mit 50 nM Insulin vorinkubiert, und anschließend die markierten CR, CR mit aktiver LPL, CR mit inaktiver LpL dazu pipettiert und für weitere 1 bzw. 4 Stunden inkubiert.

In der Abbildung 3.22 ist die Aufnahme von Chylomikronen-Remnants mit und ohne Insulinstimulus nach 1 Stunde (A) und nach 4 Stunden (B) Inkubation in den verschiedenen Differenzierungsstadien dargestellt, abgebildet ist ein Mittelwert aus 4 unabhängigen Experimenten.

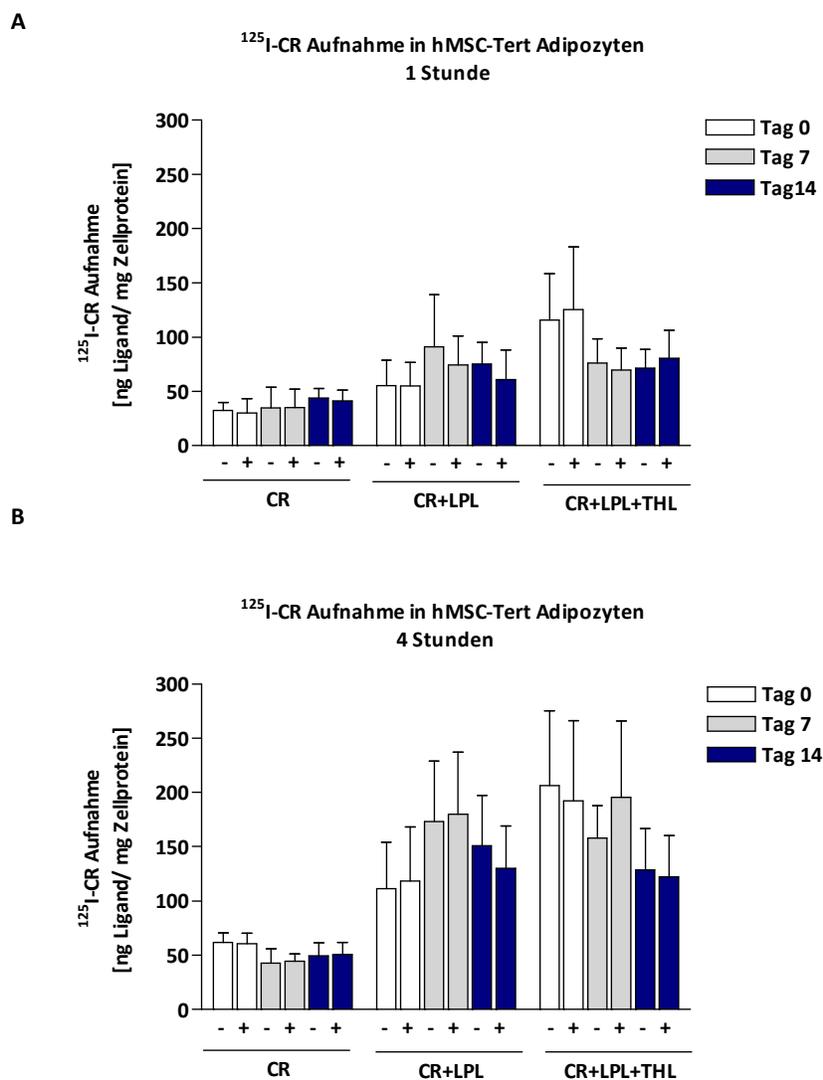


Abb. 3.22 Aufnahme von ^{125}I -markierten Chylomikronen-Remnants in hMSC-Tert Adipozyten. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll bis zu 14 Tagen differenziert. Vor der Inkubation ^{125}I -CR mit wurden die Zellen für 15 min mit 50 nM Insulin vorinkubiert. Anschließend wurden 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Proteinanteil ^{125}I -CR +/- LpL/THL zu den Ansätzen pipettiert und für weitere 1 (A) bzw. 4 Stunden (B) inkubiert. Als Kontrolle wurden undifferenzierte Tert-Zellen (Tag 0) mitgeführt (n=4).

Insgesamt spiegelt dieses Experiment die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen wieder. Bei beiden Inkubationszeiten gibt es einen Trend zu erhöhter Aufnahme von Chylomikronen-Remnants in Anwesenheit von LpL. Ebenso hat der Differenzierungszustand keinen Einfluss auf die Aufnahme. Die Stimulation der Zellen mit 50 nM Insulin vor der Inkubation hat keinen Einfluss auf die Chylomikronen-Aufnahme in die hMSC-Tert Zellen.

3.3.3 AUFNAHME VON CY5-MARKIERTEN CHYLOMIKRONEN-REMNANTS

In den vorangegangenen Experimenten mit radioaktiv-markierten Lipoprotein-Partikeln waren zum Teil sehr große Schwankungen in der Aufnahme in den verschiedenen adipozytären Stadien, undifferenzierte Stammzelle (Tag 0), Präadipozyt (Tag 7) und terminal differenzierter Adipozyt (Tag 14) aufgetreten. Da in einer Differenzierungs-Passage immer eine heterogene Zellpopulation vorliegt und auch nach 14 Tagen adipogener Differenzierung in den Passagen noch Zellen in unterschiedlichen Differenzierungs-stadien vorliegen, sollte durch Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Chylomikronen-Remnants abschließend geklärt werden, ob differenzierte Adipozyten Chylomikronen aufnehmen, oder ob die Unterschiede in der Aufnahme durch eine unterschiedliche Anzahl undifferenzierter Zellen in den Differenzierungs-Passagen zu erklären ist.

Dafür wurden die hMSC-Tert-Zellen für 14 Tage adipogen differenziert, als Kontrolle wurden undifferenzierte Zellen (Tag 0) mitgeführt. Der Proteinanteil der Chylomikronen-Remnants wurde mit einem fluoreszierenden Cy5-Farbstoff markiert und die Inkubation der Zellen erfolgte für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Nach der Inkubation wurde zusätzlich eine indirekte Immunfluoreszenz gegen ApoE und eine Dapi-Kernfärbung durchgeführt. Die Abbildung 3.23 zeigt exemplarisch eins von drei unabhängigen Experimenten.

Aufnahme von Cy5-markierten Chylomikronen-Remnants in hMSC-Tert Adipozyten

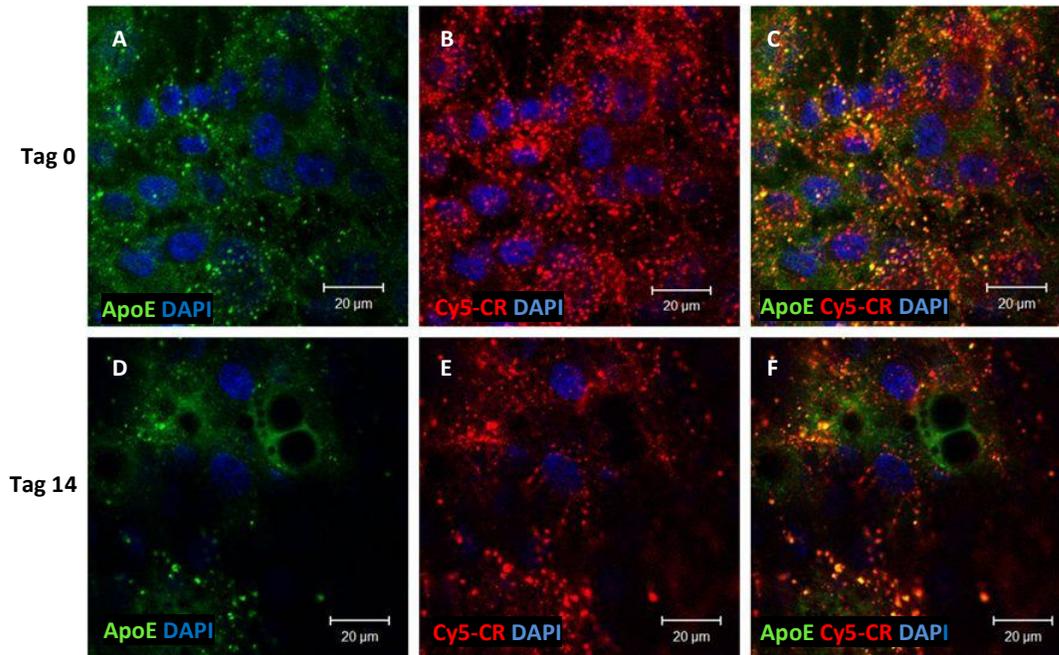


Abb.3.23 Aufnahme von Cy5-CR (rot) in undifferenzierte (A-C) und 14 Tage differenzierte (D-F) hMSC-Tert Adipozyten nach 4 Stunden Inkubation. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und immunocytochemisch gegen ApoE (anti-ApoE, Epitomics) gefärbt (grün). Kernfärbung mit Dapi (blau). In A und D ist ApoE, in B und E die Cy5-CR-Aufnahme und in C und F die Überlagerung der beiden Signale dargestellt.

Das ApoE-Signal in 3.23A resultiert in undifferenzierten Zellen aus dem ApoE-Anteil der aufgenommenen Chylomikronen-Remnants, da die hMSC-Tert Zellen kein ApoE synthetisieren. Es ist eine starke Cy5-CR Aufnahme in die undifferenzierten Zellen zu beobachten, wohingegen bei den terminal differenzierten Adipozyten (D-F) eine deutlich geringere Aufnahme der Cy5-CR zu sehen ist. Es ist auch deutlich zu erkennen, dass die Aufnahme bei den differenzierten Zellen vornehmlich in die Zellen ohne, oder mit nur sehr kleinen Lipid-Akkumulationen, also weniger oder undifferenzierten Zellen, erfolgt.

Da bei im Vorfeld eine verstärkte Partikel-Aufnahme in Anwesenheit von Lipoprotein-Lipase gemessen wurde, wurde im Anschluss auch für die Aufnahme von Cy5-markierten Chylomikronen-Remnants eine Inkubation zusammen mit aktiver LpL durchgeführt. Abbildung 3.24 zeigt vergleichend zu Abb.3.23 die Aufnahme von Cy5-CR mit aktiver LpL.

Aufnahme von Cy5-markierten Chylomikronen-Remnants in hMSC-Tert Adipozyten

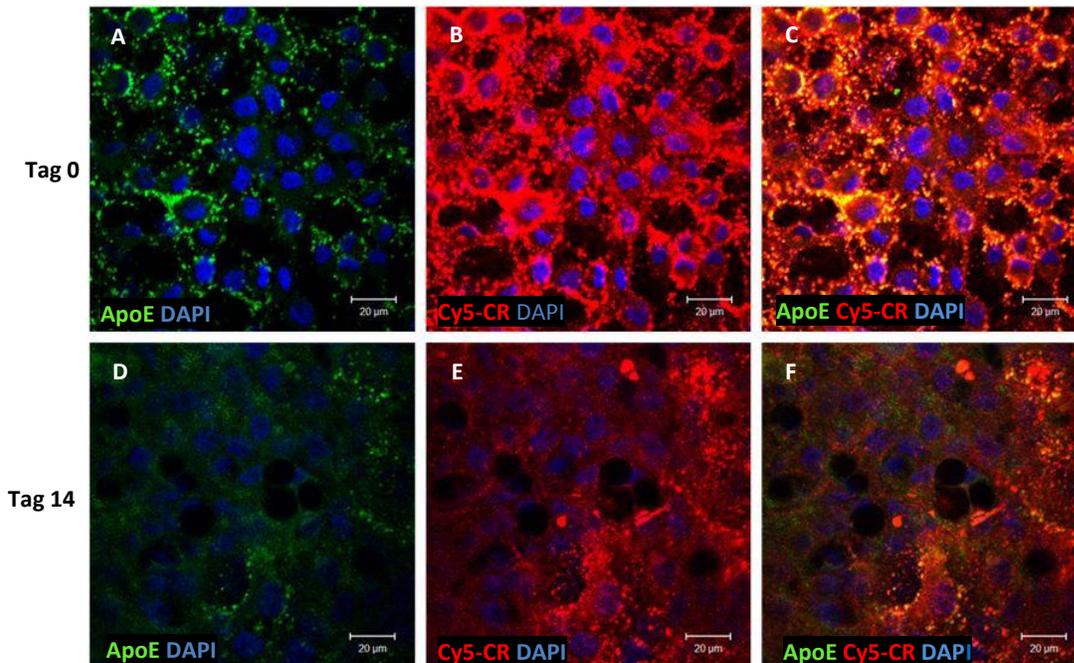


Abb.3.24 Aufnahme von Cy5-CR +LpL (rot) in undifferenzierte (A-C) und 14 Tage differenzierte (D-F) hMSC-Tert Adipozyten nach 4 Stunden Inkubation. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und immunocytochemisch gegen ApoE (anti-ApoE, Epitomics) gefärbt (grün). Kernfärbung mit Dapi (blau). In A und D ist ApoE, in B und E die Cy5-CR-Aufnahme und in C und F die Überlappung der beiden Signale dargestellt.

Die Lipoprotein Lipase führt insgesamt zu einer stark erhöhten Aufnahme in die hMSC-Tert Zellen. In den undifferenzierten Zellen (A-C) kommt es zu einer gleichmäßigen Aufnahme der Cy5-Chylomikronen-Remnants. In den terminal differenzierten Adipozyten hingegen (D-F), ist hauptsächlich eine Aufnahme in die Zellen zu sehen, die keine oder nur sehr wenige Lipide akkumuliert haben.

Um die Heterogenität der Zellpopulationen während der einzelnen Differenzierungs-Passagen und die Aufnahme in die weniger differenzierten Zellen noch deutlicher herauszustellen wurde ein weiterer Aufnahme-Versuch mit fluoreszenz-markierten Chylomikronen-Remnants nach gleichem Schema durchgeführt. Die Zellen wurden für 4 Stunden mit Cy5-CR inkubiert und anschließend eine Kernfärbung mit Dapi und eine Färbung der Neutralfette mit Nilrot durchgeführt. Abbildung 3.25 zeigt exemplarisch eins von zwei unabhängigen Experimenten.

Aufnahme von Cy5-markierten Chylomikronen-Remnants in hMSC-Tert Adipozyten

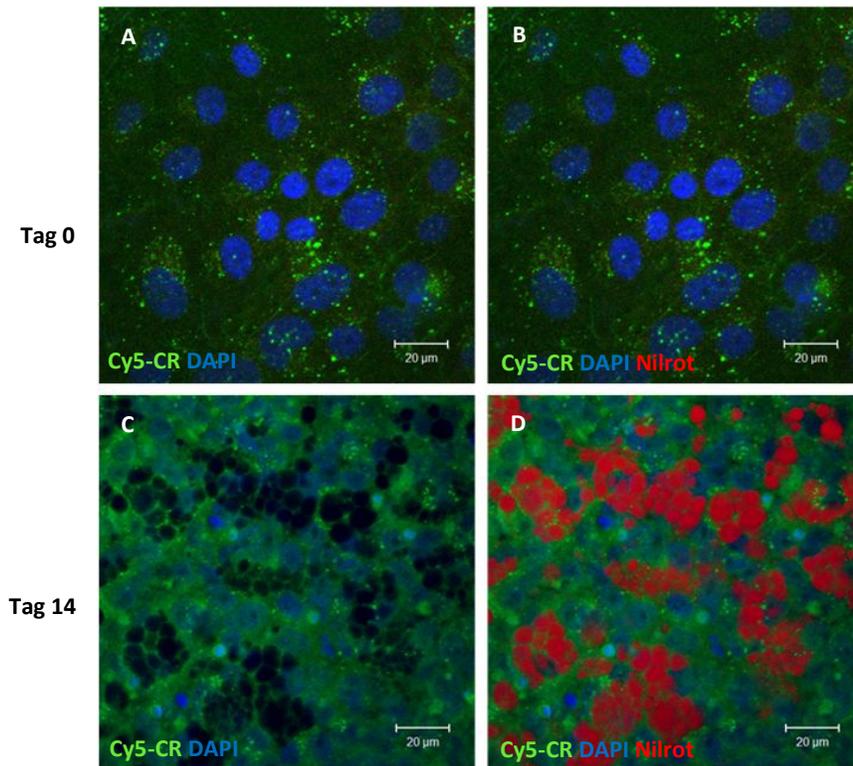


Abb.3.25 Aufnahme von Cy5-CR in hMSC-Tert Adipozyten nach 4 Stunden Inkubation. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll differenziert und anschließend die Neutralfette mit Nilrot gefärbt. A und B zeigen undifferenzierte hMSC-Tert Zellen (Tag 0), C und D terminal differenzierte Adipozyten (Tag 14).

Dies Experiment untermauert die bisher generierten Ergebnisse, durch die eine Aufnahme hauptsächlich in undifferenzierte Zellen gezeigt werden konnte. Die Färbung der akkumulierten Triglyzeride in der Zelle macht hier sehr deutlich, dass eine Aufnahme der Chylomikronen-Remnants auch an Tag 14 hauptsächlich in die undifferenzierten Zellen des Präparates stattfindet.

Zusammenfassend konnte durch die Aufnahme-Experimente mit fluoreszenzmarkierten Lipoproteinen gezeigt werden, dass nur ein geringer Teil der Chylomikronen-Remnants in differenzierte Adipozyten aufgenommen wird. Die gemessene Aufnahme in den Proben der terminal differenzierten Adipozyten (Tag 14) resultiert durch die natürlichen Varianzen bei der Differenzierung Zellen, wodurch immer eine heterogene Population von Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien vorliegt.

3.4 BEDEUTUNG DES APOE FÜR DIE ADIPOZYTENFUNKTION

3.4.1 CHARAKTERISIERUNG DER APOE-KNOCKDOWN ZELLINIE

Da die vorangegangenen Experimente eine massive Expression und auch Sekretion von ApoE durch die hMSC-Tert Zellen gezeigt haben, die Ergebnisse aber nur einen geringen Einfluss des ApoE auf den Lipidstoffwechsel der Adipozyten gezeigt haben, wurde im dritten Teil dieser Arbeit die Bedeutung des ApoE für die Adipozytenfunktion, im Hinblick auf die adipozytäre Differenzierung, untersucht.

Dafür wurden eine aus der hMSC-Tert20-Zelllinie, durch Insertion lentiviraler shRNA generierte, ApoE-Knockdown-Zelllinie (hMSC-Tert-shApoE) und die zugehörige Kontrollzelllinie (hMSC-Tert-shControl) verwendet.

Um diese Zelllinien hinsichtlich des ApoE-Knockdowns zu charakterisieren, wurden zunächst Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt. Die mRNA Expressionsanalyse für ApoE (Abb.3.26A) zeigt eine sehr geringe Expression in den undifferenzierten Zellen (hMSC-Tert 433 Kopien, hMSC-Tert-shControl 276 Kopien und hMSC-Tert-shApoE 153 Kopien). Nach 14 Tagen adipogener Differenzierung ist die ApoE Expression in den hMSC-Tert und hMSC-Tert-shControl-Zellen stark erhöht. Die hMSC-Tert-shApoE Zellen dagegen exprimieren nur ca. 4000 Kopien ApoE, was ungefähr 0,5% der Expression des Wildtyps (hMSC-Tert) und der Kontrolle (hMSC-Tert-shControl) entspricht.

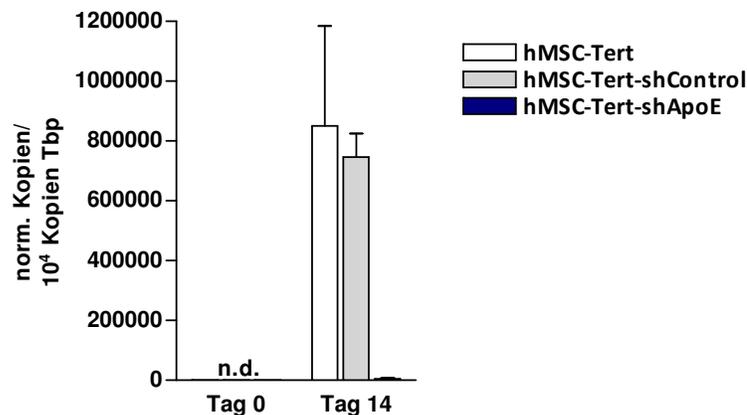


Abb.3.26A mRNA-Expressionsanalyse mittels quantitativer Taqman[®] RT-PCR von hMSC-Tert, hMSC-Tert-shControl hMSC-Tert-shApoE vor und nach 14 Tagen adipogener Differenzierung. Die Expression ist angegeben als normalisierte Kopienzahl/10⁴Kopien TBP (n=3).

Abbildung 3.25B zeigt vergleichend die ApoE-Proteinexpression der Zelllinien. Der Nachweis erfolgte mittels eines spezifischen Antikörpers gegen ApoE im Westernblot. Dafür wurde Gesamtzelllysat der Zelllinien in undifferenziertem Zustand und nach 14 Tagen adipogener Differenzierung hergestellt und standardisiert auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt. Als interner Proteinstandard wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

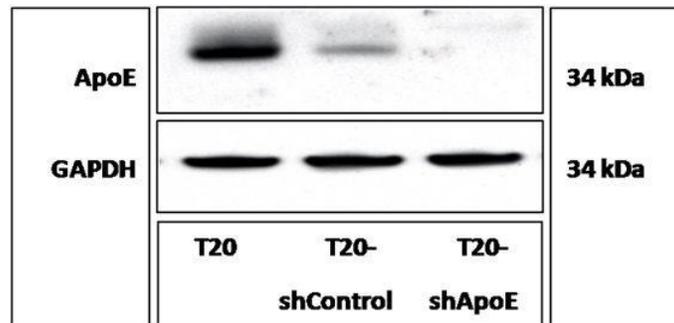


Abb.3.26B Proteinexpression von ApoE in hMSC-Tert, hMSC-Tert-shControl und hMSC-Tert-shApoE nach 14 Tagen adipogener Differenzierung. Als interner Proteinstandard ist GAPDH mitgeführt.

ApoE wird hier auf Proteinebene in Übereinstimmung mit der mRNA-Expressionsanalyse nach 14 Tagen Differenzierung massiv in den hMSC-Tert-Zellen und etwas verringert in den hMSC-Tert-shControl Zellen hergestellt. In den hMSC-Tert-shApoE-Zellen konnte kein ApoE detektiert werden.

Die Viruskontrolle hMSC-Tert-shControl zeigt eine weitgehend gleiche ApoE mRNA-Expression wie der Wildtyp. Auf Proteinebene ist die ApoE-Expression gegenüber dem Wildtyp etwas verringert. Die hMSC-Tert-shApoE-Zellen zeigen, wie erwartet, auf mRNA-Ebene eine stark verringerte, auf Proteinebene keine ApoE Expression. Aufbauend auf diesen Ergebnissen, konnten die Zelllinien für weiterführende Experimente hinsichtlich der Bedeutung des ApoE für die Adipozytenfunktion eingesetzt werden.

3.4.2 CHARAKTERISIERUNG DER ADIPOGENEN DIFFERENZIERUNG IN DEN APOE

KNOCKDOWN ZELLEN

Nach der Charakterisierung der ApoE-Knockdown-Konstrukte hinsichtlich ihrer ApoE-Sekretion, wurde die adipozytäre Differenzierung dieser Zellen im Vergleich zu den hMSC-Tert und den hMSC-Tert-shControl Zellen zunächst in morphologischer Hinsicht betrachtet. Abbildung 3.27 dokumentiert die adipogene Differenzierung der Zelllinien 14 Tage nach Induktion der Differenzierung, wobei die Akkumulation der Triglyzeride durch eine Fettrotfärbung sichtbar gemacht wurde.

Die hMSC-Tert-Zellen (A) und auch die hMSC-Tert-shControl (B) Zellen lassen eine sehr ausgeprägte Differenzierung durch die massive Akkumulation von Triglyzeriden in den Zellen nach 14 Tagen Differenzierung erkennen. Das Zellbild weist vor allem große vereinzelte Lipidvakuolen, aber auch weiterhin Trauben kleinerer Lipidvesikel auf. Ein Großteil der Zellen zeigt dementsprechend Merkmale ausdifferenzierter Adipozyten. Es handelt sich aber trotzdem um eine heterogene Zellpopulation, die aus einem noch undifferenzierten Hintergrund und Zellen in jedem möglichen Differenzierungsstadium besteht. Die hMSC-Tert-shApoE Zellen (C) dagegen weisen nur einen sehr geringen Anteil an monokulären Zellen auf. Vereinzelt sind ebenfalls kleinere Trauben von Lipidvesikeln zu erkennen, der größte Anteil der Zellen liegt aber in undifferenziertem oder einem sehr frühen Differenzierungsstadium vor. Diese Beobachtung wird durch

eine Quantifizierung der Fettrotfärbung bestätigt (D). Die hMSC-Tert-shControl Zellen zeigen nur eine geringfügig niedrigere Fettrotkonzentration als die Wildtyp-Zellen, in den hMSC-Tert-shApoE-Zellen hingegen ist der Fettrotanteil um ca. die Hälfte reduziert. Diese morphologischen Untersuchungen und die Quantifizierung der Differenzierungseffizienz bestätigen eine Beeinträchtigung der Differenzierung in den ApoE-Knockdown Zellen.

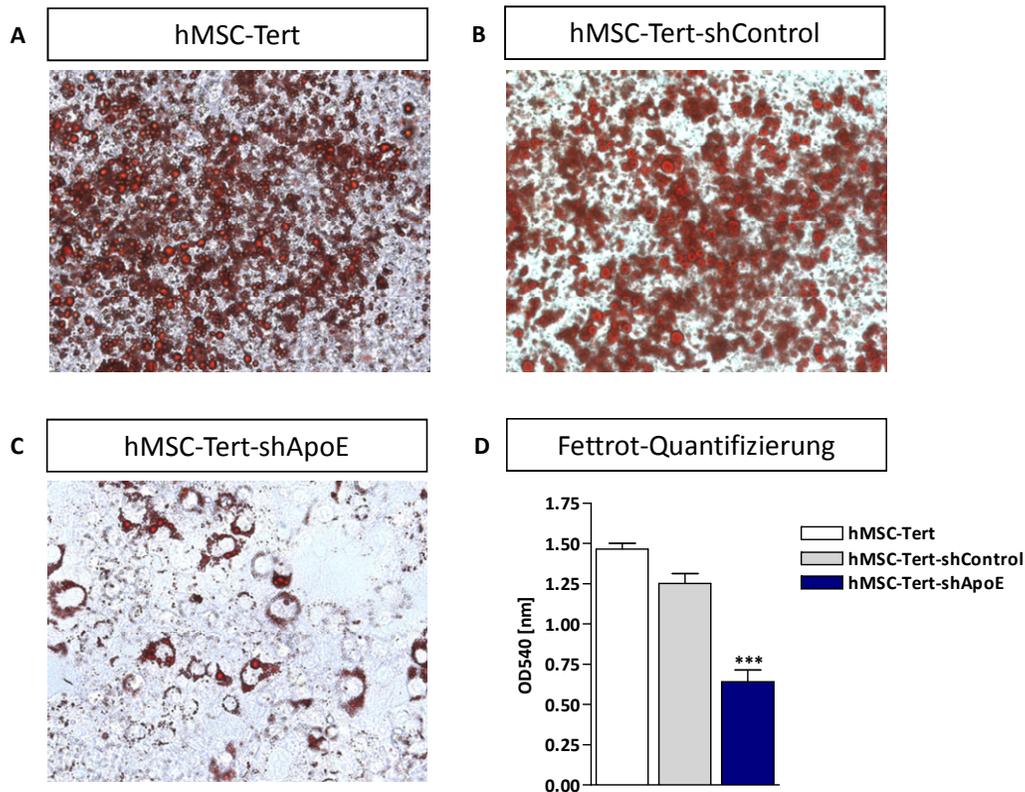


Abb.3.27 Fettrotfärbung der hMSC-Tert (A), hMSC-Tert-shControl (B) und hMSC-Tert-shApoE-Zellen (C) nach 14 Tagen adipogener Differenzierung. Die Neutrallipide in den Zellen wurden durch Fettrot angefärbt und sind als dunkelrote Strukturen erkennbar. In D ist eine Quantifizierung der Fettrotfärbung dargestellt. Die Aufnahmen wurden im Durchlicht bei 200facher Vergrößerung angefertigt.

Um die adipozytäre Differenzierung der shApoE-Knockdown Zellen genauer zu beleuchten, wurde die mRNA-Expression verschiedener adipozytärer Marker während der Differenzierung betrachtet.

In Abbildung 3.28 sind die Expressionsdaten der wichtigsten adipozytären Marker vergleichend für die hMSC-Tert, hMSC-Tert-shControl und die hMSC-Tert-shApoE Zelllinie im Differenzierungsverlauf dargestellt. Das Cytokin Adiponektin wird in den Wildtyp-Zellen mit fortschreitender Differenzierung verstärkt exprimiert (siehe auch Abb.3.2).

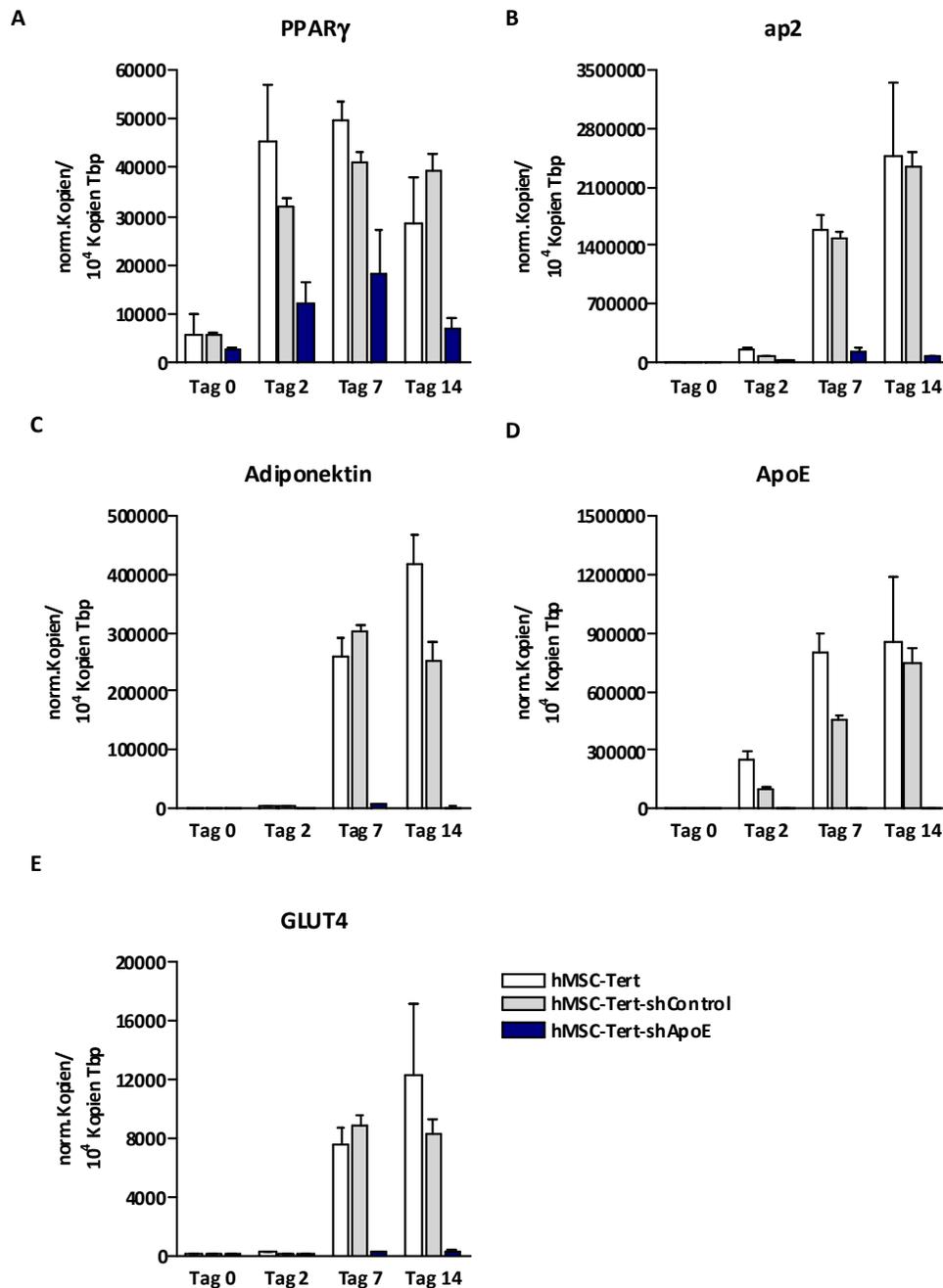


Abb.3.28 mRNA-Expressionsanalysen mittels quantitativer Taqman[®] RT-PCR von adipozytären Markern den verschiedenen Zelllinien. Die Expression ist angegeben als normalisierte Kopienzahl/ 10^4 Kopien TBP. Alle gemessenen Gene werden innerhalb der ersten Differenzierungshälfte exprimiert (n=3).

Die hMSC-Tert-shControl-Zellen weisen für Adiponektin ein ähnliches Expressionsmuster auf, es ist allerdings ein leichter Abfall der Expression an Tag 14 gegenüber Tag 7 und auch gegenüber dem Wildtyp zu beobachten. In den hMSC-Tert-shApoE Zellen ist die Expression erst ab Tag 7 überhaupt zu detektieren. Es konnten ca. 9000 Kopien/ 10^4 Kopien Tbp detektiert werden, was im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen eine Verringerung der Expression um das 29fache bedeutet, im Vergleich zu den hMSC-Tert-shControl-Zellen eine Verringerung um das 35fache. An Tag 14 werden in

den hMSC-Tert-shApoE Zellen 3000 Kopien/10⁴ Kopien Tbp exprimiert, was weniger als 1% der Wildtypexpression, und 2,8% der hMSC-Tert-shControl-Expression entspricht. Ähnlich wie für Adiponektin verhält es sich mit den anderen analysierten Genen. Das Expressionsmuster der hMSC-Tert-shControl-Zellen entspricht im Wesentlichen dem des Wildtyps. Die hMSC-Tert-shApoE-Zellen zeigen für alle gemessenen Marker eine stark verringerte Expression, was auf eine verringerte Adipogenese und somit auf eine Rolle des ApoE für die Differenzierung hindeutet.

Im zweiten Schritt wurde die Expression von PPAR γ als Hauptregulator der Adipogenese, auf Proteinebene betrachtet. Die PPAR γ -Proteinexpression ist in Abbildung 3.29 zusammengestellt. Verglichen wurden die verschiedenen Zelllinien während des Differenzierungsverlaufs.

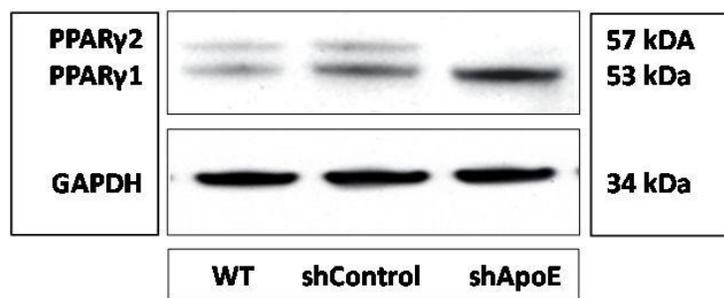


Abb.3.29 PPAR γ Expression auf Proteinebene nach 14 Tagen Differenzierung in den verschiedenen Zelllinien. Die Detektion erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Westernblot. Als interner Standard wurde GAPDH mitgeführt.

Der Transkriptionsfaktor PPAR γ liegt in zwei Isoformen vor, PPAR γ 1 und PPAR γ 2, wobei PPAR γ 2 Adipozyten-spezifisch ist. In den hMSC-Tert-Wildtyp Zellen werden beide Isoformen exprimiert, wobei PPAR γ 1 etwas stärker detektiert wird. Ein ähnliches Muster sieht man auch bei den shControl-Zellen, gleichwohl hier die PPAR γ 1 noch ausgeprägter ist. Die shApoE-Knockout Zellen dagegen, exprimieren auf Proteinebene gar kein PPAR γ 2. Die PPAR γ 1-Bande ist dafür stark ausgeprägt, auf der möglicherweise die geringe Differenzierung der shApoE-Knockdown Zellen beruht.

3.4.3 APOE REKONSTITUTION

Um zu bestätigen, dass der ApoE-Knockdown in den hMSC-Tert Adipozyten verantwortlich für die beeinträchtigte adipozytäre Differenzierung ist und ApoE somit eine Schlüsselrolle für den Adipozyten einnimmt, wurde in einer anschließenden Versuchsreihe begonnen, ApoE in den hMSC-Tert-shApoE durch exogene ApoE-Gabe zu rekonstituieren. Für die Rekonstitution wurde kommerzielles rekombinantes humanes ApoE und sekretiertes ApoE der ApoE3-überexprimierenden hMSC-Tert Zelllinie verwendet.

Im Vorfeld wurde dafür die ApoE-Expression und Sekretion der ApoE-überexprimierenden Zelllinie hMSC-Tert-hApo3-Lenti und der Kontrollzelllinie hMSC-

Tert-Empty-Lenti getestet. Die hMSC-Tert-hApoE3-Lenti Zellen zeigen schon in undifferenzierten Zellen eine starke mRNA-Expression von ApoE (Abb.3.30A), die nach 14 Tagen adipogener Differenzierung noch weiter ansteigt. Die Kontrollzelllinie hMSC-Tert-Empty-Lenti zeigt in undifferenziertem Zustand, wie erwartet, keine ApoE Expression. Nach 14 Tagen adipogener Differenzierung steigt die Expression auf ca. 200.000 Kopien, was 10% der Expression der überexprimierenden Zellen ausmacht.

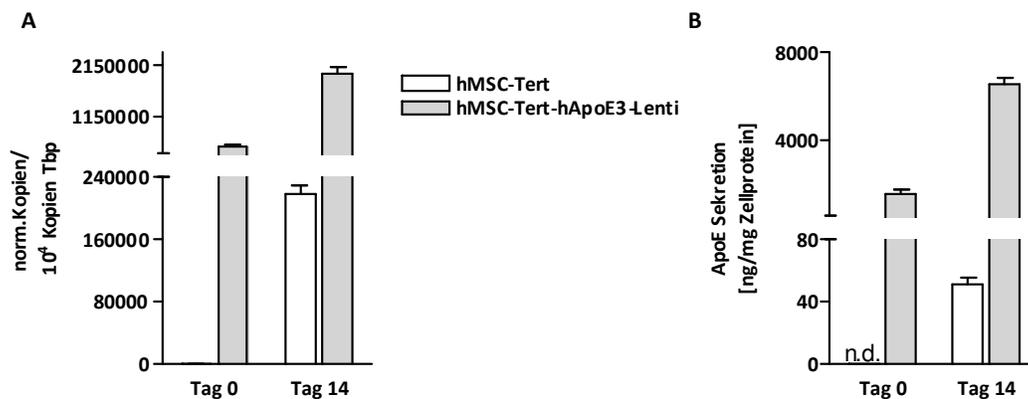


Abb.3.30 ApoE mRNA-Expression (A) und Sekretion (B) der ApoE-überexprimierenden Zelllinie hMSC-Tert-hApoE3-Lenti und der Kontrolle hMSC-Tert-Empty-Lenti. Verglichen wurden undifferenzierte und 14 Tage differenzierte Zellen. Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer Taqman[®] RT-PCR analysiert und ist angegeben als normalisierte Kopienzahl/10⁴Kopien TBP. Die Sekretion in den Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA detektiert und ist in ng/mg Zellprotein angegeben (n=3).

Auch auf Sekretionsebene konnte eine massive ApoE Sekretion der hMSC-Tert-hApoE3-Lenti-Zellen schon in undifferenziertem Zustand detektiert werden, der nach 14 Tagen adipogener Differenzierung noch um das 4fache ansteigt (Abb.3.30B). Für die Kontrollzelllinie hMSC-Tert-Empty-Lenti wurde, entsprechend der mRNA Expressionsdaten, an Tag 0 keine Sekretion gemessen. Die ApoE-Sekretion in diesen Zellen entspricht nach 14 Tagen adipogener Differenzierung weniger als 1% der ApoE3-überexprimierenden Zellen. Damit konnte eine massive ApoE3-Überexpression in den hMSC-Tert-hApoE3 Zellen schon in undifferenzierten Zellen detektiert werden und die Überstände der beiden Zelllinien für die ApoE-Rekonstitution eingesetzt werden.

Für die ApoE-Rekonstitution wurden die Zellen der hMSC-Tert-Empty-Lenti und hMSC-Tert-hApoE3-Lenti-Zelllinie undifferenziert in T175-Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz herangezogen, und anschließend für zwei Tage in Standardmedium gehalten. Der Überstand wurde gesammelt und standardmäßig die ApoE-Proteinkonzentration mittels ELISA bestimmt. Die Zellen der hMSC-Tert-shControl und hMSC-Tert-shApoE-Zelllinie wurden für die Differenzierung in 12well-Platten ausgesetzt und nach dem Standardprotokoll für 14 Tage differenziert. Dabei wurde das Differenzierungsmedium im Kontrollansatz für beide Zelllinien 1:1 mit dem gesammelten Überstand des hMSC-Empty-Lenti versetzt. Für die Rekonstitution wurde der Überstand der hApoE3-überexprimierenden Zellen, hMSC-Tert-hApoE3, mit

Standardmedium auf 10 µg/mL Protein eingestellt. Als weitere Kontrolle wurde ein Ansatz mit 10 µg/mL rekombinatem humanem ApoE3 supplementiert. In Abbildung 3.31A ist die Fettrotfärbung der Zellen nach 14 Tagen Differenzierung dargestellt.

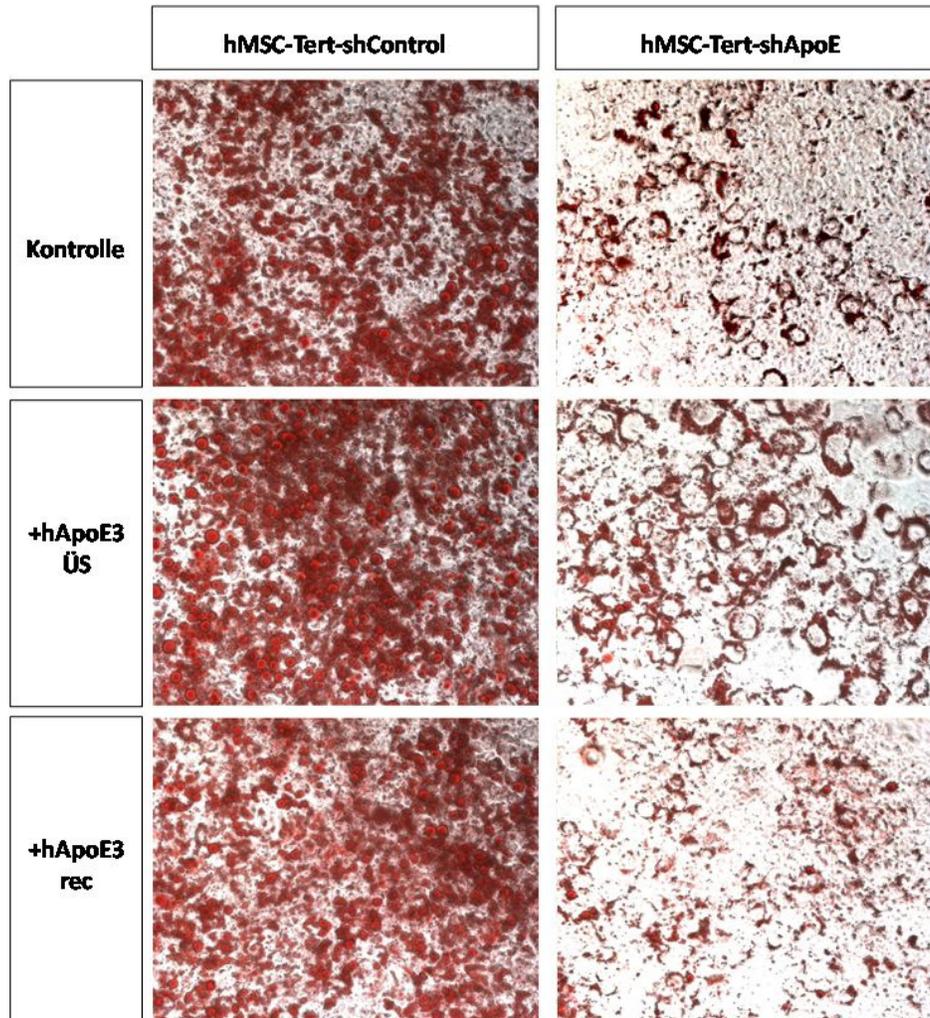


Abb.3.31A Fettrotfärbung der hMSC-Tert-shControl und hMSC-Tert-shApoE Zellen nach 14 Tagen adipogener Differenzierung und ApoE-Rekonstitution mit 10 µL/mL ApoE3 aus Überstand der ApoE-überexprimierenden Zellen (hApoE3 ÜS) und rekombinatem humanem ApoE3 (hApoE3rec). Die Lipidakkumulation in den Zellen wurde durch eine Färbung der Neutrallipide mit Fettrot sichtbar gemacht, und die Bilder im Durchlicht mit 200facher Vergrößerung angefertigt.

Die morphologische Beobachtung während der Differenzierung der hMSC-Tert-shApoE Zellen in diesem Experiment zeigt für den Kontrollansatz eine verringerte adipogene Differenzierung gemessen an der Triglyzeridakkumulation der Zellen nach 14 Tagen adipogener Differenzierung (vergl. Abb.3.28). Bei der Supplementation mit dem Überstand der hMSC-Tert-hApoE3 Zellen kommt es zu einer verstärkten Differenzierung und Lipideinlagerung sowohl in den hMSC-Tert-shControl als auch in den hMSC-Tert-shApoE Zellen. Bei Supplementation mit rekombinatem humanem ApoE3 ist dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt. Um diese Beobachtung zu

untermauern wurde eine Quantifizierung der Fettrotfärbung durchgeführt (Abb.3.31B).

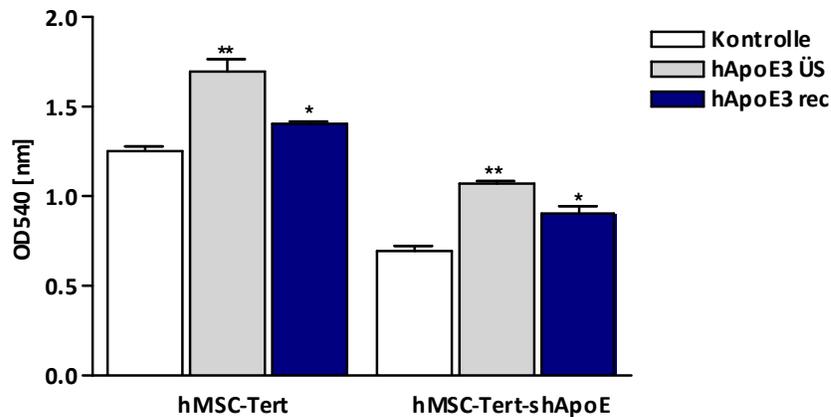


Abb.3.31B Quantifizierung der Fettrotfärbung nach der ApoE Supplementation der hMSC-Tert-shControl und hMSC-Tert-shApoE Zellen (n=2).

Die morphologische Betrachtung der Differenzierung der hMSC-Tert-shApoE Zellen lässt auf eine verstärkte adipogene Differenzierung der Zellen bei ApoE-Supplementation schließen, auch wenn die Differenzierungseffizienz immer noch unter der der hMSC-Tert-shControl Zellen liegt. Um die adipogene Differenzierung der hMSC-Tert-shApoE Zellen bei ApoE-Supplementation zu überprüfen, wurden mRNA-Analysen auf wichtige adipozytäre Marker im Vergleich zu hMSC-Tert-shControl nach 14 Tagen Differenzierung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.32 dargestellt.

Die Expression von Adiponektin, aP2, ApoE und Glut4 steigt bei Supplementation des ApoE mit Überstand der überexprimierenden Zellen, angezeigt als hApoE3-ÜS, signifikant gegenüber des Kontrollansatzes. Nur für den Transkriptionsfaktor PPAR γ ist keine signifikante Änderung der Expression zu messen. Die Rekonstitution mit rekombinantem humanem ApoE3 führt zu keiner Änderung in der Genexpression der gemessenen Marker verglichen mit dem Kontrollansatz. Das Expressionsmuster der hMSC-Tert-shControl-Zellen zeigt nur bei aP2 eine signifikante Erhöhung der Expression durch Rekonstitution mit hApoE3-Überstand.

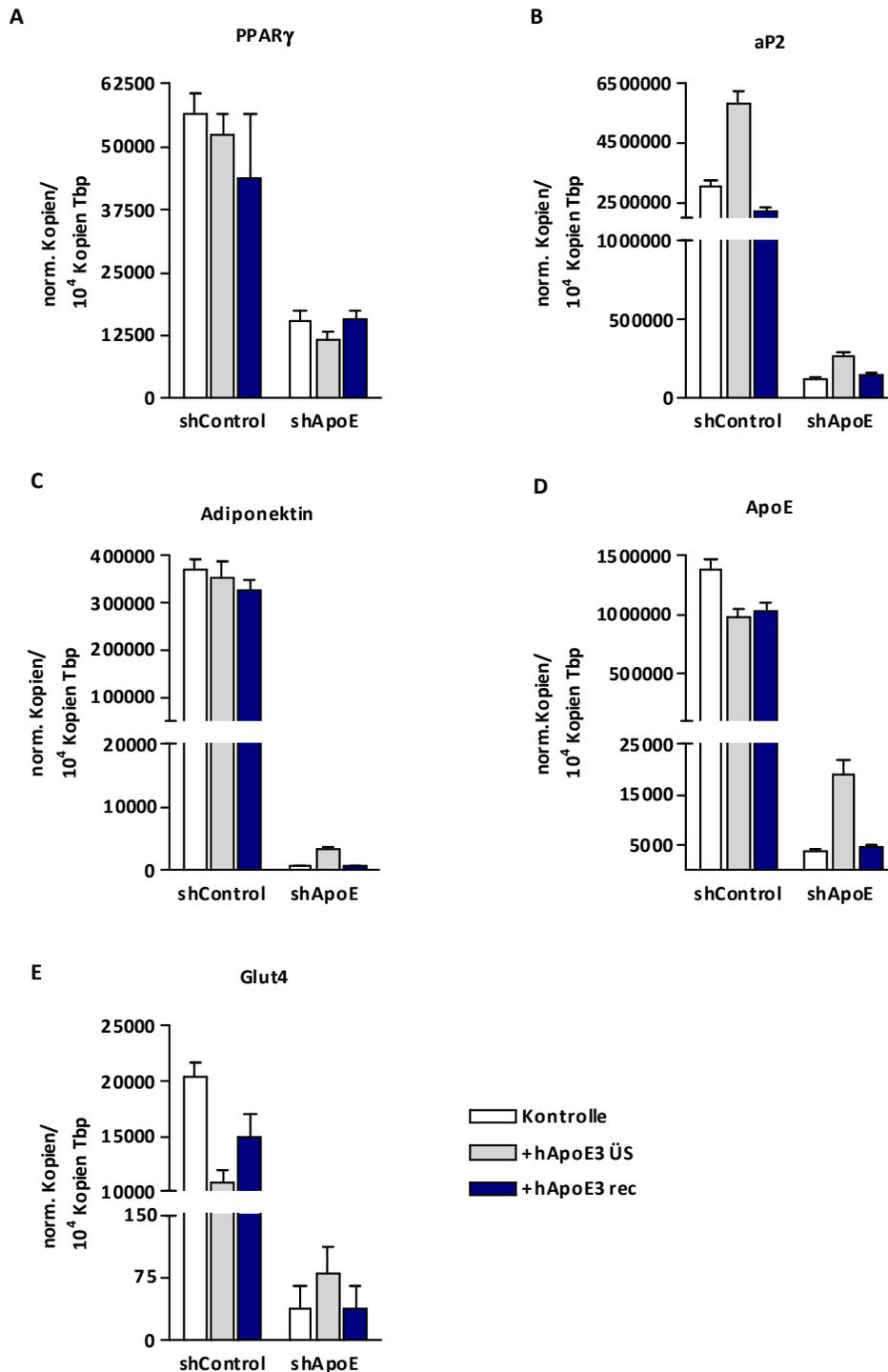


Abb.3.32 mRNA-Expressionsanalyse von adipozytären Markern der hMSC-Tert-shApoE Zellen nach 14 Tagen adipogener Differenzierung mit ApoE-Supplementation durch Überstand der hMSC-Tert-hApoE3-Lenti-Zellen und rekombinantes humanes ApoE3. Als Kontrolle sind mRNA Proben der hMSC-Tert-shControl-Zellen mitgeführt. Die gemessenen Kopien sind normalisiert auf 10^4 Kopien Tbp ($n=2$).

Diese Ergebnisse konnten auch durch eine Supplementation der shApoE-Knockdown Adipozyten mit ApoE-haltiger VLDL bestätigt werden. Dabei wurden hMSC-Tert - shControl und hMSC-Tert-shApoE-Zellen während der Differenzierung mit humaner

VLDL supplementiert. Die Abbildung 3.33 zeigt die Triglyzerid-Akkumulation in den Zellen nach 14 Tagen adipogener Differenzierung.

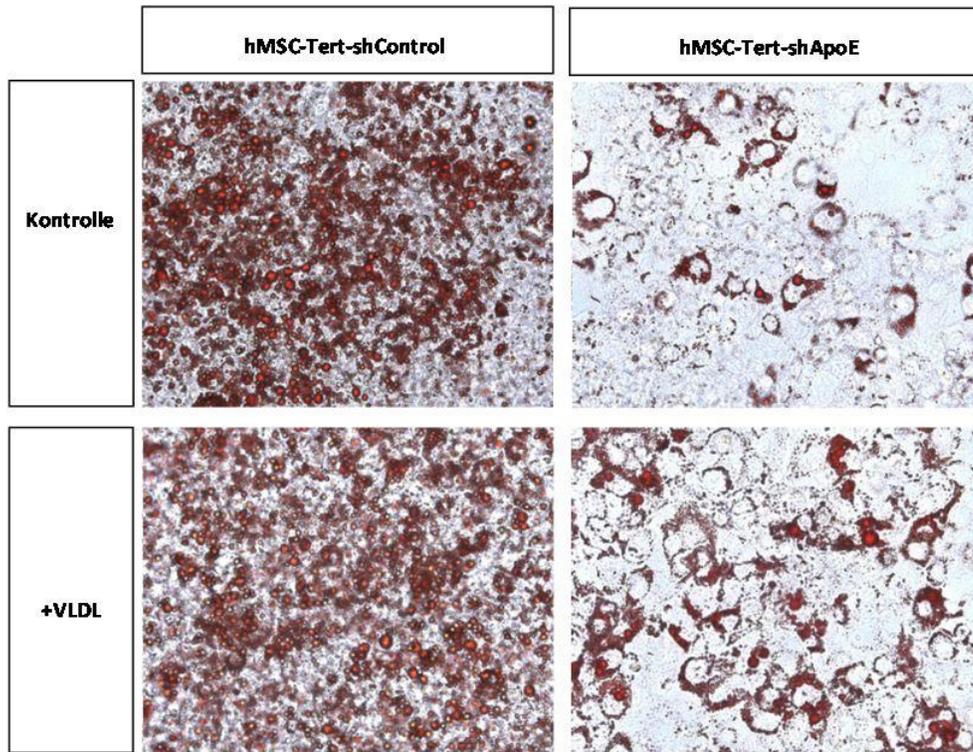


Abb.3.33 Fettrotfärbung der Triglyzeridakkumulation der hMSC-Tert-shControl und hMSC-Tert-shApoE Adipozyten, nach Supplementation mit humaner VLDL während der adipozytären Differenzierung. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll differenziert. Zu dem Differenzierungsmedium wurde alle zwei Tage 10 µg/mL humane VLDL hinzugefügt.

Die erhöhte Triglyzeridakkumulation nach Supplementation mit humaner VLDL führt, wie die Supplementation mit humanem ApoE, nicht zu einer Rekonstitution der adipozytären Differenzierung. Die Differenzierungsmarker PPAR γ , aP2, Adiponektin und ApoE werden in ihrer Transkription in den shApoE-Knockdown-Zellen nur geringfügig beeinflusst. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen sind in Abbildung 3.34 dargestellt.

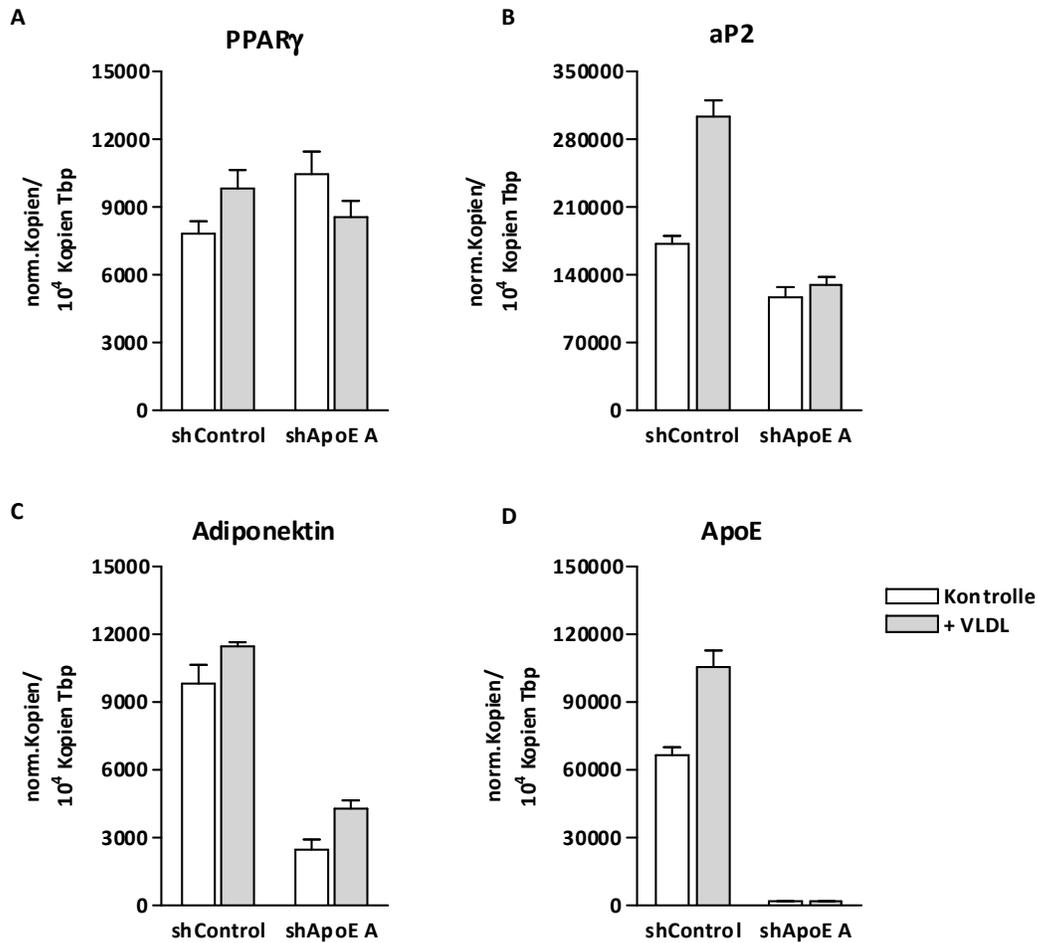


Abb.3.34 mRNA-Expressionsanalysen der hMSC-Tert-shControl und hMSC-Tert-shApoE-Adipozyten nach Supplementation der Differenzierung mit humaner VLDL. Die gemessenen Kopien sind normalisiert auf 10^4 Kopien Tbp (n=2).

Zusammenfassend ist eine signifikante Erhöhung der Lipidakkumulation in den T20-shApoE-Zellen bei Rekonstitution mit Überstand der T20-hApoE3-Zellen und humaner VLDL zu beobachten. Dies geht einher mit einer sehr geringen Erhöhung der Expression der adipozytären Marker auf mRNA-Ebene, die jedoch im Niveau weit unter dem des Wildtyps liegt. Die Daten deuten darauf hin, dass endogen synthetisiertes ApoE für die optimale Adipozytendifferenzierung notwendig ist, während exogen zugeführtes ApoE die Lipidaufnahme und damit die Triglyzeridspeicherung in den Zellen fördert.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sekretion und Aufnahme von Apolipoprotein E-haltigen Lipoproteinen in humanen Adipozyten untersucht. Dafür wurde im ersten Teil (3.1) eine vergleichende Charakterisierung des verwendeten Zellsystems, hMSC-Tert, mit primären humanen Adipozyten durch molekularbiologische und proteinchemische Methoden durchgeführt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im zweiten Abschnitt (3.2) die Synthese und Sekretion von Lipoproteinen im Hinblick auf die Form des sekretierten ApoE und die regulatorischen Mechanismen, denen diese Sekretion unterliegt, in hMSC-Tert Adipozyten untersucht. Ausgehend von einer hohen Expression der Lipoprotein-Rezeptoren LDL-R und LRP1 während der adipozytären Differenzierung wurde im dritten Abschnitt (3.3) die Aufnahme von ApoE-haltigen Lipoproteinen in die hMSC-Tert Adipozyten untersucht. Im letzten Teil (3.4) wurde mittels einer siRNA-vermittelten Depletion von ApoE in den hMSC-Tert Adipozyten die Bedeutung des ApoE für den Stoffwechsel und die Differenzierung in humanen Adipozyten *in vitro* untersucht.

4.1 CHARAKTERISIERUNG DES ADIPOZYTÄREN ZELLSYSTEMS

Die Charakterisierung der hMSC-Tert Adipozyten erfolgte vergleichend zu humanen Präadipozyten, die aus visceralem Fettgewebe isoliert wurden. Die hMSC-Tert Zellen stellen nach 14 Tagen Differenzierung reife humane Adipozyten dar. Morphologisch äußert sich dies in einem monokulären Phänotyp, der mit einer einzelnen großen Lipidvakuole und einem kleinen Kern/Cytoplasma-Verhältnis einher geht (Abb.3.1). Die humanen Präadipozyten hingegen zeigen nach 12 Tagen adipogener Differenzierung zwar eine starke Triglyzeridakkumulation, weisen aber noch multiple kleine Lipidvakuolen auf (Abb. 3.4). Dieser Phänotyp ist charakteristisch für Präadipozyten (Alihaud G. and Hauner H., 1998). Weiter wurden auf mRNA- und Proteinebene für die Charakterisierung des Zellsystems Expressionsanalysen adipozytärer Marker durchgeführt. Fünf der zehn untersuchten Gene, darunter die Lipoprotein-Rezeptoren, wurden schon in undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen detektiert, alle anderen wurden innerhalb der ersten Differenzierungswoche exprimiert (Abb.3.2). Dabei konnte eine erfolgreiche Differenzierung sowohl der hMSC-Tert-Zellen, als auch der primären humanen Adipozyten durch Nachweis adipozytenspezifischer Gene, gezeigt werden. Die Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PPAR γ konnten, wenn auch nur in einer sehr geringen Kopienzahl, schon in undifferenzierten hMSC-Tert Zellen nachgewiesen werden (Abb.3.2A, 3.2B). C/EBP α wird nach 14 Tagen maximal exprimiert, die Kopienzahlen sind aber im Vergleich zu den anderen gemessenen Genen gering. Die PPAR γ -Expression ist nach 7 Tagen Differenzierung maximal. Diese Unterschiede im zeitlichen Ablauf der Expression der beiden Transkriptionsfaktoren sind auf die positive Feedback-Regulation von PPAR γ auf C/EBP α zurückzuführen. PPAR γ aktiviert während der Adipogenese die Expression von C/EBP α , welcher zusätzlich zu der Stimulation durch PPAR γ einer Autoregulation unterliegt (Rosen et al.,

2002). Die direkt durch PPAR γ regulierten Marker Adiponektin (Maeda et al., 2001), aP2 (Tontonoz et al., 1994), ApoE (Yue et al., 2004), LpL (Lefebvre et al., 1997) und LRP1 (Gauthier et al., 2003) werden alle bereits nach 7 Tagen stark exprimiert (Abb.3.2). Die Expression steigt bis Tag 14 noch weiter an, was auf eine stabile Differenzierung und reife Adipozyten hindeutet. Die LRP1 mRNA-Expression kann zum Einen durch Insulin-sensitivierende Substanzen wie Rosiglitazon, einem PPAR γ -Agonist, und so stimulierend auf dessen Expression wirkt, induziert wird. Insulin wirkt aber auch direkt auf LRP1 (Misra et al., 1999), wodurch das Absinken der LRP1-Expression ist durch den Entzug des Insulins nach 9 Tagen aus dem Differenzierungsmedium zurückzuführen ist.

Auf Proteinebene kann man die Expression von aP2 ebenfalls ab Tag 7 der Differenzierung beobachten, die von ApoE schon ab Tag 2 (Abb.3.3). aP2 ist adipozytenspezifisch und unterliegt während der Differenzierung einer starken Regulation (Spiegelman et al., 1983). Die aP2-Expression kann, außer durch PPAR γ , auch durch Fettsäuren induziert werden (Amri et al., 1991). aP2 fungiert als lipidbindendes Protein im Cytoplasma und aktiviert dort die HSL (Shen et al., 2001). Ein Polymorphismus im humanen aP2-Promotor korreliert mit einer reduzierten aP2-Expression und einem verringertem Risiko an koronarer Herzkrankheit oder einem Diabetes mellitus Typ II zu erkranken (Tuncman et al., 2006). Auch bei Mäusen wurde aP2 als Verbindungsglied zwischen Adipositas und Insulinresistenz beschrieben (Hotamisligil et al., 1996; Scheja et al., 1999). Der insulinabhängige Glukosetransporter 4 (GLUT4) wird ebenfalls ab Tag 7 der Differenzierung exprimiert. GLUT4 wird durch C/EBP α reguliert (Lin and Lane, 1994), wodurch sich die im Verhältnis zu den anderen untersuchten Genen niedrigen Kopienzahlen und die nicht messbare Insulin-abhängige Glukose-Aufnahme der Zellen erklären lassen (Prawitt et al., 2008). Die Expression der Lipoprotein-Rezeptoren VLDL-R, LDL-R und LRP1 werden in Zusammenhang mit der Lipoproteinaufnahme in Abschnitt 4.3 diskutiert.

Weiterhin konnte durch den Vergleich mit den aus humanen visceralen Fettgewebsbiopsien isolierten Präadipozyten ebenfalls gezeigt werden, dass die aus den hMSC-Tert-Stammzellen generierten Adipozyten den Zustand reifer, humaner Adipozyten gut abbilden. Die humanen Präadipozyten zeigen, wie die hMSC-Tert Adipozyten, eine massiv erhöhte Expression der gemessenen Gene nach 12 Tagen adipozytärer Differenzierung (Abb.3.5). Ebenso werden die Lipoprotein-Rezeptoren VLDL-R, LDL-R und LRP1 schon in den undifferenzierten Zellen exprimiert (vergl. Abb. 3.2 und 3.5G,H,I).

Durch die vergleichende Charakterisierung des hMSC-Tert-Zellsystems konnte gezeigt werden, dass eine stabile und vollständige Differenzierung der Zellen zu reifen Adipozyten durch das verwendete Differenzierungsprotokoll ermöglicht wird. Aufgrund dieser Ergebnisse sind die hMSC-Tert-Adipozyten ein geeignetes Zellmodell, um die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit erfolgreich zu bearbeiten.

4.2 SYNTHESE UND SEKRETION VON APOE IN hMSC-TERT ADIPOZYTEN

Die Expression von ApoE in murinen Adipozyten wurde erstmals 1991 von Zechner et al. beschrieben (Zechner et al., 1991). In den hMSC-Tert Adipozyten konnte ab Tag 2 der adipozytären Differenzierung eine kontinuierliche Erhöhung der ApoE mRNA- (Abb.3.2E) und Proteinexpression (Abb.3.3) detektiert werden. An Tag 14 der Differenzierung ist die Menge der ApoE-Expression maximal erhöht (Abb.3.3). Die ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Zellen konnte mittels ELISA ab Tag 2 der Differenzierung detektiert werden, und steigt dann kontinuierlich auf ein Maximum an Tag 14. Vergleicht man die ApoE mRNA-Expression (Abb.3.2) mit den Protein- und Sekretionsdaten (Abb.3.3, Abb.3.6), so fällt auf, dass der Anstieg in der Proteinexpression deutlich stärker ist, als der Anstieg der mRNA-Expression. Da auch die ApoE-Sekretion an von Tag 7 auf Tag 14 stark ansteigt, kann ein zunächst vermutetes intrazelluläres Auflaufen des Proteins an Tag 14 ausgeschlossen werden.

Vassiliou und McPherson haben für das adipozytäre ApoE eine Rolle im Cholesterolefflux postuliert, wobei das von den Adipozyten synthetisierte und sezernierte ApoE in der Plasmamembran mit Cholesterolestern angereichert wird, und diese ApoE vermittelt durch Bindung an die HSPGs über LRP1 durch Rezeptor-vermittelte Endozytose wieder in die Zellen aufgenommen werden (Vassiliou and McPherson, 2004a). Diese Theorie geht einher mit der gesteigerten ApoE-Sekretion nach einer Inkubation der Adipozyten mit Liposomen (Abb.3.8). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Assoziation von ApoE mit den Liposomen zu der gesteigerten Sekretion führt, da die Inkubation der Zellen mit Liposomen zusammen mit LpL in keiner weiteren Steigerung der ApoE-Sekretion resultiert. Die LpL induziert eine gesteigerte Lipidaufnahme der Liposomen, so dass die vermehrte Aufnahme von Lipiden die ApoE-Sekretion nicht wesentlich beeinflusst. Im reversen Cholesteroltransport spielen ApoAI und HDL eine wichtige Rolle. Die Inkubation von Makrophagen mit ApoAI oder HDL (Kockx et al., 2004; Kockx et al., 2008) stimulierte in diesem Zellsystem die ApoE-Sekretion, wobei interessanterweise nur die Inkubation mit ApoAI aber nicht ApoE-freier HDL in hMSC-Tert Adipozyten nur eine statistisch nicht signifikante Erhöhung der ApoE-Konzentration im Zellkulturüberstand induziert hat (Abb. 3.9). Nach der Theorie von Vassiliou und McPherson würde dies aber auch darauf hindeuten, dass das von den Adipozyten sezernierte ApoE an Cholesterolester gebunden, also in lipidierter Form, sezerniert wird.

Um zu überprüfen, ob das von Adipozyten sezernierte ApoE in lipidierter Form als Lipoprotein oder Lipoprotein-Präkursor freigesetzt wird, wurde das ApoE in den Überständen der hMSC-Tert Adipozyten charakterisiert. Die Zellkulturüberstände wurden dafür mittels Gelchromatographie analysiert und die Fraktionen hinsichtlich Cholesterol-, Triglyzerid- und Phospholipidgehalt untersucht. Durch herkömmliche enzymatisch gekoppelte Analysemethoden konnten dabei keine Lipide in den ApoE-Fractionen nachgewiesen werden. Auch durch radioaktivmarkierte Lipide wie Cholesterol und Phospholipide, die bei einer „Partikel-Sekretion“ an das ApoE

assoziiert vorliegen sollten so und einfach detektiert werden könnten, konnte keine Aktivität in den ApoE-Fraktionen gemessen werden (Tab.3.1). Somit konnte gezeigt werden, dass ApoE von den humanen Adipozyten lipidfrei sezerniert wird, und *in vivo* vermutlich erst im Plasma an Lipoproteine assoziiert. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch die Beobachtung, dass bei einer Inkubation der Zellen zum Einen mit lipidfreiem (1% BSA) und zum Anderem mit serumhaltigem (1% FCS) Medium eine Verschiebung des in den Fraktionen mittels ELISA gemessenen ApoE erfolgt (Abb.3.14). Dabei liegt das ApoE nach Inkubation mit 1% BSA in den Fraktionen 5-20 vor, was ungefähr einer Partikelgröße zwischen 80 und 20 nm entspricht. Dies deutet auf eine Aggregation des ApoE in lipidfreiem Medium hin, da in den parallel durchgeführten Messungen zur Lipidbestimmung weder Cholesterolester noch Triglyzeride detektiert wurden. In Anwesenheit von Serum verschiebt sich die Größe der ApoE-Partikel hin zu 12 bis 5 nm, was der Größe der HDL entspricht und auf eine Assoziation des sezernierten ApoE mit denen im Serum vorliegenden Lipoproteinen hindeutet. Dieses Ergebnis ist auf den ersten Blick kontrovers zu dem von Vassiliou und McPherson postulierten *Efflux-Recapture* Prozess, bei dem ApoE in der Plasmamembran mit Cholesterolestern assoziiert und somit in lipidierter Form sezerniert wird. Da die Autoren allerdings hauptsächlich die Rolle des LRP1 in diesem Prozess untersucht haben, und nicht die Lipidierung des ApoE an sich, ist es möglich dass auch bei dieser Studie die Lipidierung des ApoE nicht in der Plasmamembran sondern erst später im Plasma bzw. Zellkulturmedium erfolgt. Denkbar wäre auch, dass das ApoE in Adipozyten, ähnlich wie für Makrophagen und Hepatozyten beschrieben (Hasty et al., 2005; Heeren et al., 2006), einem Recycling-Prozess unterliegt. Dabei kann bis zu 60% des sezernierten ApoE wieder in die Zellen aufgenommen und resekretiert werden. Durch diese Hypothese kann zum Einen die im Vergleich zur mRNA-Expression deutlich höhere Proteinexpression und Sekretion erklärt werden, zum Anderen unterstützt dies auch die erhaltenen Ergebnisse, die eine lipidfreie Sekretion des ApoE implizieren (vergl. 3.2.3). Um diese Hypothese zu bestätigen müssten aber weitere Experimente hinsichtlich des ApoE-Recyclings durchgeführt werden.

Aufgrund der pathophysiologischen Relevanz von Makrophagen für den reversen Cholesteroltransport und der hohen ApoE-Expression in diesen Zellen, sind viele Studien im Zusammenhang mit dem reversen Cholesteroltransport und ApoE in Makrophagen durchgeführt worden. Es zeigte sich dabei, dass die ApoE-Sekretion dieser Zellen einer komplexen Regulation unterliegt (Kockx et al., 2007). Basierend auf den weiter oben bereits diskutierten Ergebnissen, wurde entsprechend auch für die hMSC-Tert Adipozyten überprüft, ob auch in Adipozyten der Prozess der ApoE-Sekretion selbst einer Regulation unterliegt. Da ApoE ein direktes Target des Transkriptionsfaktors PPAR γ ist und eine erhöhte Expression und Sekretion von ApoE in murinen 3T3-L1 Adipozyten durch PPAR γ -Agonisten beschrieben wurde (Yue et al., 2004), wurde zunächst der Einfluss von Rosiglitazon auf die ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Adipozyten gemessen (Abb.3.7). Die ApoE-Sekretion wird bei einer wie hier durchgeführten Kurzzeitstimulation durch Rosiglitazon nicht beeinflusst (Abb.3.7A).

Dahingegen konnte der in der Literatur beschriebene Effekt auf die mRNA-Expression bestätigt werden (Abb.3.7B). Um den induzierenden Effekt von Rosiglitazon auf Proteinebene deutlicher herauszuarbeiten, müssten vermutlich Zellzustände untersucht werden, bei der die Kinetik der Sekretion sowie unterschiedliche Konzentrationen der PPAR γ -Agonisten eingesetzt werden. Eine Stimulation mit Insulin führt nur zu einer geringfügigen Beeinflussung der ApoE-Sekretion der Zellen, die jedoch nicht mit der signifikant erhöhten mRNA-Expression korreliert. Dies deutet darauf hin, dass die ApoE-Sekretion unabhängig vom Ernährungszustand der Zellen reguliert wird. Somit erfolgt auch in der postprandialen Phase keine gesteigerte ApoE-Sekretion der Adipozyten, was für eine vermehrte Aufnahme von Lipoproteinen in das Fettgewebe essentiell wäre.

Um die intrazellulären Wege aufzuklären, die an der Sekretion des adipozytären ApoE beteiligt sind, wurde zunächst die konstitutive Sekretion der Zellen blockiert. Eine Blockade des Golgi-Apparates mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Brefeldin A führt zu einer signifikant verringerten ApoE-Sekretion um ca. 50% (Abb.3.10). BFA hemmt die Aktivierung von ADP-Ribosylierungsfaktoren und damit die Bildung von COPI-Vesikeln am Golgi-Apparat (Donaldson et al., 1991), wodurch sekretorische Proteine wieder in das Endoplasmatische Retikulum rückverlagert werden (Lippincott-Schwartz et al., 1990). Colchicin bindet die freien Mikrotubulli-Untereinheiten, so dass diese für den intrazellulären Transport nicht mehr zur Verfügung stehen und daraus eine intrazelluläre Proteinaggregation resultiert (Hamel, 1996). Eine Inkubation der HSMC-Tert Adipozyten mit Colchicin resultiert in einer leicht reduzierten ApoE-Sekretion. Eine Arretierung der kontraktilen Aktinfilamente durch Cytochalasin D (Brown and Spudich, 1981), führt ebenfalls zu einer Reduktion der Sekretion um ca. 30% (Abb.3.10). Keiner der getesteten Inhibitoren führt zu einer vollständigen Inhibition der ApoE-Sekretion, so dass eine ausschließlich konstitutive Sekretion des ApoE nicht wahrscheinlich ist und die Sekretion auch in Adipozyten einer komplexen Regulation unterliegt.

Um diesen Mechanismus weiter aufzuklären wurde als nächstes der Einfluss des intrazellulären Calcium-Signalings untersucht. Calcium ist als *second messenger* ein wichtiger Regulator der Proteinsekretion, welcher ebenfalls an der Regulation der Ausschüttung von Neurotransmittern und Hormonen aus endokrinen und neuronalen Zellen beteiligt ist (Neher, 1998). Eine Komplexierung des intrazellulären Calciums mit 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetate-acetoxymethyl ester (BAPTA-AM) inhibiert die Calcium-regulierte Proteinsekretion (Tsien, 1980; Strayer et al., 1999). Ein signifikant inhibierender Effekt von BAPTA-AM ist auch für die Sekretion von ApoE in hMSC-Tert Adipozyten zu beobachten (Abb.3.11). Weiterführend wurde auch die Inhibition des IP3-Rezeptors durch 2-APB getestet. Auch hier wurde eine Reduktion um ca. 30% erreicht, was darauf hindeutet, dass die IP3-vermittelte Calcium-Ausschüttung an der regulierten Sekretion von ApoE beteiligt ist.

Die Proteinkinase A reguliert den Transport von Proteinen an mehreren Stellen der konstitutiven Proteinsekretion (Muniz et al., 1996). Für eine Reihe von PKA-Inhibitoren wurde in Makrophagen eine Reduktion der ApoE-Sekretion beschrieben (Kockx et al.,

2007). Die Autoren konnten durch Transfektion mit ApoE-GFP zeigen, dass die PKA-Aktivität für die Mobilität der ApoE-haltigen Vesikel unerlässlich ist. In *Pulse-Chase* Experimenten konnte durch Inhibition der PKA eine verringerte ApoE-Sekretion und ein intrazelluläres Auflaufen des Proteins in Makrophagen gezeigt werden. Die Degradation des ApoE wird dadurch nicht beeinflusst. Wahrscheinlich ist diese Beobachtung auf eine intrazelluläre Akkumulation der ApoE-haltigen Vesikel durch Inhibition der PKA zurückzuführen, die nicht für lysosomale Degradation zugänglich ist, sondern in einem intrazellulärem Auflaufen des Proteins resultieren (Kockx et al., 2008). Eine Inhibition der Proteinkinase A resultiert ebenfalls in einer reduzierten ApoE-Sekretion (Abb.3.12).

Der *ATP-Binding Cassette Transporter 1* (ABCA1) gilt als der Schlüsselregulator des Cholesterin-Efflux auf ApoAI, und ein Defekt in ABCA1 ist ursächlich für die Tangier-Krankheit, die durch den gestörten Cholesterin-Efflux mit einer verringerten Bildung von HDL einhergeht. Die ApoE-Sekretion ist wie oben beschrieben in vielen Geweben an den ApoAI-vermittelten Cholesterin-Efflux gekoppelt. Die basale konstitutive ApoE-Sekretion in Makrophagen ist ebenfalls ABCA1 abhängig (Von Eckardstein et al., 2001). Eine Stimulation der hMSC-Tert Adipozyten mit ApoAI bewirkt einen Anstieg in der ApoE-Sekretion (Abb.3.9), wohingegen nur eine sehr geringe Erhöhung der ApoE-Sekretion aus der Stimulation der Zellen mit HDL resultiert. Eine Inhibition der durch ApoAI-stimulierten Sekretion konnte mit allen beschriebenen Inhibitoren erreicht werden (Abb.3.13). Bei einer Inhibition der Sekretion mit BAPTA-AM und 2-APB ist die ApoE-Sekretion nach Stimulation mit ApoAI im Vergleich zur Kontrolle nur mit Inhibitor leicht erhöht. Dies lässt vermuten, dass die durch ApoAI induzierte ApoE-Sekretion, zumindest zu einem geringen Anteil, über einen alternativen Sekretionsweg verläuft, unabhängig vom intrazellulären Calcium-Signaling. Kockx et al. haben gezeigt, dass zwar die basale, aber nicht die ApoAI induzierte ApoE-Sekretion, ABCA1 abhängig ist, wodurch möglicherweise auch ein ABCA1-unabhängiger Sekretionsmechanismus die Inhibition durch BAPTA-AM und 2-APB verringern kann (Kockx et al., 2007).

Zusammenfassend konnte somit gezeigt, dass ApoE vermutlich in lipidfreier Form von humanen Adipozyten sezerniert wird. Die Regulation der ApoE-Sekretion beinhaltet eine konstitutive und eine Calcium-abhängige Komponente, wobei die physiologische Bedeutung dieser Beobachtungen noch geklärt werden muss.

4.3 AUFNAHME VON APOE-HALTIGEN LIPOPROTEINEN IN ADIPOZYTEN

Die in die hMSC-Tert Adipozyten gemessene Aufnahme von ApoE-haltigen Lipoproteinen muss im Zusammenhang mit dem ermittelten Expressionsmuster der ApoE-bindenden Lipoprotein-Rezeptoren der LDL-R Genfamilie betrachtet werden. Die Expression des LDL-R steigt in der ersten Differenzierungshälfte leicht an, in der zweiten Woche der Differenzierung sinkt die Expression auf ca. 50% der undifferenzierten Zellen (Abb.3.2G). Die Tatsache, dass die Expression des LDL-R durch den Transkriptionsfaktor *Sterol regulatory element binding protein* (SREBP) reguliert

wird, erklärt die zunächst steigende Expression während der Differenzierung (Briggs et al., 1993). Die Aufnahme von LDL dient der Versorgung der Zelle mit Cholesterol z. B. für den Aufbau von Membranen (Brown and Goldstein, 1986). Da während der adipogenen Differenzierung einer mesenchymalen Stammzelle, primär Triglyzeride in den *Lipid Droplets* der Adipozyten gespeichert werden, ist der Cholesterolbedarf dieser nicht-proliferierenden Zellen gering, so dass die Aufnahme von LDL durch die LDL-R in Adipozyten runterreguliert wird. Da das Fettgewebe eine vergleichsweise niedrige Cholesterol-Eigensynthese hat (Dugail et al., 2003; Le Lay et al., 2004), wird der niedrige Cholesterolbedarf weitestgehend aus extrazellulären Quellen über den LDL-R gedeckt.

Sowohl der VLDL-R als auch LRP1 werden während der Differenzierung der hMSC-Tert Zellen mit zunehmender Stärke exprimiert (Abb.3.2H, Abb.3.2I). In 3T3-L1 Zellen ist während der Adipogenese eine Induktion des VLDL-Rs beschrieben (Gafvels et al., 1994). Neuere Publikationen zeigen eine Regulation des VLDL-R durch PPAR γ (Takazawa et al., 2009; Tao et al., 2009). Takazawa et al. konnten durch spezifische Promotor-Analysen ein *Peroxisome Proliferator Responsive Element* (PPRE) im Promotor des VLDL-R nachweisen und zeigen, dass PPAR γ direkt an den VLDL-R-Promotor bindet und so dessen Expression reguliert. Induktion des VLDL-R durch die Aktivierung von PPAR γ konnte auch *in vivo* im Fettgewebe von Wildtyp-Mäusen gezeigt werden (Tao et al., 2009), und führte *ex vivo* zur Adipogenese von isolierten Präadipozyten. Auch in humanen Adipozyten wurde die Expression des VLDL-R nachgewiesen (Niemeier et al., 1996). VLDL-R-defiziente Mäuse haben verglichen mit Wildtyp-Mäusen ein reduziertes Fettgewebe (Frykman et al., 1995), zeigen aber unter Normaldiät keine Unterschiede im Lipoproteinprofil und auch eine normale VLDL-Clearance aus dem Plasma. Unter Stress, z.B. durch langes Fasten oder eine Hochfettdiät oder Kreuzungen mit hyperlipämischen Leptin-defizienten (*ob/ob*) Mäusen, führt die VLDL-R Depletion zu einer Hypertriglyzeridämie. Unter diesen Bedingungen sind die Tiere dabei aber vor der Ausprägung einer durch eine Hochfettdiät induzierten Adipositas geschützt (Goudriaan et al., 2001). Es wird vermutet, dass der VLDL-R primär an der Verankerung von TG-reichen Lipoproteinen und der anschließenden Hydrolyse durch die LpL und am Prozess der Aufnahme von VLDL-assoziierten Fettsäuren in das Fettgewebe beteiligt ist (Voshol et al., 2009), da VLDL-R defiziente Mäuse ebenfalls eine reduzierte LpL-Expression und sowohl pre- als auch postprandial erhöhte Plasma-Triglyzeridwerte aufweisen (Yagyu et al., 2002; Goudriaan et al., 2004; Voshol et al., 2009).

Auch LRP1 wird im Adipozyten durch PPAR γ induziert (Gauthier et al., 2003). In den hMSC-Tert-Zellen wird LRP1 schon in den undifferenzierten Stammzellen und bis Tag 9 der Differenzierung mit zunehmender Konzentration exprimiert (Abb.3.2). Eine Aufrechterhaltung seiner Expression durch den Zusatz von Rosiglitazon kann ausgeschlossen werden, da der Entzug des Rosiglitazons an Tag 12, verglichen mit durchgehender Rosiglitazon-Gabe, zu keinem negativen Effekt auf die Expression führt. Jedoch führt der durch das Differenzierungsprotokoll bedingte Verzicht auf Insulin ab

Tag 9, zu einem Abfall der Expression ab Tag 10 (Daten nicht gezeigt), was sich auch in der Expressionshöhe nach 14 Tagen Differenzierung niederschlägt. Bei einer fortlaufenden Gabe von Insulin steigt die LRP1-Synthese auch bis Tag 14 kontinuierlich an. LRP1 vermittelt durch die Interaktion mit ApoE und LpL die Aufnahme von Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants in die Leber (Hussain et al., 1991; Beisiegel et al., 1991; Rohlmann et al., 1998). Durch den postprandialen Insulin-Stimulus wird nicht nur, wie weiter oben bereits diskutiert, die LRP1-Expression erhöht, sondern es erfolgt auch eine Translokation des LRP1 aus endozytischen Vesikeln hin zur Plasmamembran, wodurch der Rezeptor für die Aufnahme der CR zu Verfügung steht (Laatsch et al., 2009). Kürzlich wurde gezeigt, dass LRP1 ebenfalls für den Adipozytenstoffwechsel eine wichtige Rolle innehat (Masson et al., 2009). In dieser Publikation wurde gezeigt, dass die Adipozyten-spezifische Inaktivierung von LRP1 eine deutliche Reduktion der Fettgewebsmasse *in vivo* bewirkt. Es wird vermutet, dass die verminderte Aufnahme von Triglyzerid-reichen Lipoproteinen für diesen Effekt verantwortlich ist. Allerdings konnte in den hier untersuchten differenzierten hMSC-Tert-Adipozyten insgesamt nur eine geringe Partikel-Aufnahme gezeigt werden, die unabhängig vom Differenzierungszustand der Zellen auf einem ähnlichen Niveau liegt (Abb.3.17, Abb.3.21). Dieser Unterschied zu den von Masson et al. publizierten Daten und den in dieser Dissertation generierten Ergebnissen kann möglicherweise auf die speziesspezifischen Unterschiede zwischen Maus und Mensch zurückzuführen sein. Der Stoffwechselumsatz von Mäusen ist vielfach schneller als der von Menschen und kann sich so auch in der Lipoproteinaufnahme in das Fettgewebe auswirken. Denkbar wäre aber auch eine Zellsystem-spezifische Ursache, die für die Unterschiede in der Aufnahme zwischen primären murinen Zellen und den aus humanen mesenchymalen hMSC-Tert Adipozyten verantwortlich sind.

Die Anwesenheit aktiver und ebenso inaktiver Lipoprotein Lipase führt indes zu einer verstärkten spezifischen Partikelaufnahme, ebenso wie für die Fettsäure-Aufnahme (Abb.3.18). Es ist bekannt, dass die LpL im Plasma nach der Hydrolyse an die Remnant-Partikel assoziiert verbleibt (Felts et al., 1975; Goldberg et al., 1986; Vilella et al., 1993; Zambon et al., 1996). Ebenso konnte in *in vivo* Studien eine verbesserte Bindung und Aufnahme der TRL an die Lipoprotein-Rezeptoren gezeigt werden (Goldberg, 1996; Beisiegel and Heeren, 1997). Dieser Effekt wird durch die C-terminale Domäne der LpL mediiert und verläuft über eine Bindung an die HSPG und die Lipoprotein-Rezeptoren (Beisiegel et al., 1991). Transgene Mäuse, die katalytisch inaktive LpL im Muskel überexprimieren, zeigen eine Erhöhte *Clearance* der VLDL aus dem Plasma in den Muskel (Merkel et al., 1998). Da für die hMSC-Tert Adipozyten die Partikel-Aufnahme eine gleichbleibend hohe Aufnahme auch in Anwesenheit inaktiver LpL detektiert wurde, ist eine *Bridging*-Funktion, also eine strukturelle Bedeutung der LpL, auch für die Partikelaufnahme in Adipozyten plausibel.

Auffallend ist in diesen Experimenten eine stark verringerte Aufnahme an Tag 7 der Differenzierung, sowohl für die Partikel-Aufnahme als auch für die Fettsäureaufnahme (vergl. Abb.3.17, 3.18). Dieses Absinken der Aufnahme von ca. 90% der in

undifferenzierten Zellen gemessenen Aufnahme an Tag 7 kann aus dem experimentellen Ansatz nicht plausibel erklärt werden, da u.a. eine verringerte Expression der Lipoprotein-Rezeptoren an Tag 7 ausgeschlossen werden kann (vergl. Abb. 3.2). Demnach ist die geringe Aufnahme vermutlich auf die natürliche Varianz der einzelnen Passagen und Differenzierungsansätze zurückzuführen. Dieser Verdacht erhärtet sich durch die hohe Aufnahme von Chylomikronen an Tag 7 (Abb.3.21), da für diese Experimente neuere Passagen der hMSC-Tert-Zellen verwendet wurden.

Da eine, wenn auch geringe, Partikelaufnahme in die differenzierten Adipozyten gezeigt werden konnte, wurde eine Inhibition der Lipoprotein-Rezeptoren durch die Liganden LDL (LDL-R), RAP (VLDL-R, LRP1) und Lactoferrin (LRP1) getestet, um eine spezifische Aufnahme der Lipoproteine zu überprüfen. Dabei konnte für keinen der Lipoprotein-Rezeptoren eine spezifische Aufnahme gezeigt werden (Abb.3.19). Es zeigte sich, dass schon nach einer Stunde die maximale Aufnahme der undifferenzierten Zellen erreicht wurde, wohingegen die maximale Aufnahme in die 7 und 14 Tage differenzierten Zellen erst nach 4 Stunden Inkubation erreicht ist. Nach einer Stunde konnte eine leicht verringerte Aufnahme in 7 Tagen differenzierten Zellen bei Inhibition mit LDL und Lactoferrin beobachtet werden, was für eine hauptsächliche Aufnahme über den LDL-R und LRP1 bedeuten würde. Nach 14 Tagen Differenzierung konnte bei Inhibition durch RAP eine leichte Verringerung der Aufnahme detektiert werden, was eine Aufnahme vorrangig über LRP1 und den VLDL-R entspricht. Da die Effekte der Inhibitoren allerdings sehr gering und statistisch nicht signifikant sind, kann hier keine Aussage über eine spezifische Aufnahme der Lipoproteine in die Adipozyten gemacht werden. LRP1 und der LDL-R sind in der Lage bei einem Ausfall eines Rezeptors die Aufnahme zu kompensieren. Da nach 4 Stunden keine Effekte der Inhibitoren messbar waren, könnte auf eine Kompensation der Aufnahme durch die anderen Rezeptoren deuten. Um die spezifische Aufnahme der Lipoproteine weiter zu untersuchen, müsste ein Knockout der Rezeptoren, z.B. über induzierbare lentivirale Systeme, durchgeführt werden.

Um eine artifizielle Aufnahme durch die künstlich hergestellten Lipoproteine auszuschließen, wurde die Lipoproteinaufnahme mit humanen Chylomikronen-Remnants (CR) wiederholt. Dabei zeigte sich eine erhöhte Aufnahme der CR in die differenzierten Adipozyten nach 1 Stunde, nach vier Stunden ist dieser Effekt nicht mehr zu beobachten (Abb.3.21A, B). Auffällig ist hier, die stark erhöhte Aufnahme der CR nach 7 und 14 Tagen Differenzierung nach 4 Stunden Inkubation und vorheriger Hydrolyse durch LpL. Da sich die Aufnahme in Anwesenheit von inaktiver LpL auch für undifferenzierte Zellen auf einem ähnlichen Niveau befindet, bestätigt sich eine *Bridging* – Funktion der LpL für die Lipoprotein-Aufnahme in die Adipozyten. Postprandiale Lipoproteine werden primär in die Leber aufgenommen (Yu and Cooper, 2001), so dass zur Kontrolle für die beschriebenen Aufnahmeexperimente humane Hepatomazellen mit untersucht wurden. Im Vergleich zu der humanen Hepatoma-Zelllinie HuH7, konnte insgesamt eine wesentlich geringere CR-Aufnahme in die hMSC-Tert Adipozyten gemessen werden (Abb.3.21C). Insgesamt deuten diese Daten

daraufrin, dass im Vergleich zur Leber die Adipozyten für die Aufnahme von Triglyzerid-reichen Lipoproteinen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Diese Theorie konnte *in vivo* bereits in mehreren Studien bestätigt werden, in denen eine organspezifische Aufnahme der Lipoproteine untersucht wurde. Dabei wird ein Großteil der aufgenommenen Lipide in Leber und Milz aufgenommen, ein geringer Teil geht in Muskel, Knochen und Fettgewebe (Merkel et al., 2002b; Niemeier et al., 2008; Laatsch et al., 2009).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Insulin die Aufnahme von postprandialen Lipoproteinen über LRP1 in die Leber stimuliert (Laatsch et al., 2009). LRP1 wird unter katabolen Stoffwechselbedingungen primär in intrazellulären Endosomen detektiert, so dass LRP1 nicht als endozytotischer Rezeptor fungieren kann. Unter postprandialen Bedingungen wurde die Insulin-stimulierte Translokation von LRP1 an die Plasmamembran von Hepatozyten und die vermehrte LRP1-abhängige Endozytose von CR beobachtet. Auch in murinen 3T3-L1-Adipozyten wurde die Translokation von intrazellulärem LRP1 an die Plasmamembran als Antwort auf einen Insulin-Stimulus gezeigt (Corvera et al., 1989; Zhang et al., 2004a). Dieser Prozess wird durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase PI3K vermittelt (Ko et al., 2001). Eine Insulin-vermittelte gesteigerte Aufnahme von Lipoproteinen konnte bisher lediglich in primären Rattenadipozyten demonstriert werden (Descamps et al., 1993). Um den Einfluss von Insulin auf LRP1 in den hMSC-Tert Adipozyten zu testen, wurde die CR-Aufnahme nach Vorinkubation der Zellen mit Insulin gemessen. Dabei konnte keine Insulin-Abhängigkeit der Lipoproteinaufnahme festgestellt werden (Abb.3.22). Allerdings wurde bereits beschrieben, dass zwar eine Insulin-vermittelte Aktivierung des Akt-Signalweges jedoch keine Insulin-stimulierte Glukose-Aufnahme in den hMSC-Tert Adipozyten gemessen werden kann (Prawitt et al., 2008). Die an der LRP1-Translokation beteiligten Signalwege sind zwar noch nicht genau charakterisiert (Ko et al., 2001), aber möglicherweise ist die Translokation des LRP1 an die Zelloberfläche in den differenzierten hMSC-Tert Adipozyten beeinträchtigt und das Insulin-Signal wird nicht vollständig über die Signalkaskade weitergeleitet.

Durch Immunfluoreszenzaufnahmen mit markierten Chylomikronen-Remnants in die differenzierten hMSC-Tert Adipozyten konnte eine Aufnahme vornehmlich in den undifferenzierten Zellhintergrund der Präparate gezeigt werden (Abb.3.23, 3.24, 3.25). Wie eingangs bereits erwähnt, liegt immer eine heterogene Zellpopulation vor, in der sich Zellen in verschiedenen Stadien der Differenzierung befinden. Durch diese Heterogenität der Zellpopulation und den weiter proliferierenden Zellhintergrund liegen an Tag 7 und 14 ca. 20-30% mehr Zellen vor als an Tag 0, folglich müsste die Aufnahme in diesen Präparaten erhöht sein. Dass keine signifikanten Unterschiede in der Aufnahme zwischen den einzelnen Differenzierungsstadien gemessen wurden, kann durch die Immunfluoreszenzaufnahmen aufgeklärt werden. Die Aufnahme erfolgt in den Tag 7 und Tag 14 differenzierten Zellen, hauptsächlich in den nicht differenzierten Zellhintergrund. Die differenzierten Zellen nehmen keine oder nur sehr wenige Lipoproteinpartikel auf, so dass sich insgesamt die Menge der aufgenommenen

Partikel nicht oder nur unwesentlich von den undifferenzierten Zellen unterscheidet. Diese Daten weisen einerseits darauf hin, dass LRP1 im Adipozyten keine ausschließliche Versorgungsfunktion hat. Als Multiliganden-Rezeptor wird für LRP1 ferner eine Rolle in der Signaltransduktion diskutiert (Lillis et al., 2008). Andererseits kann dieses Ergebnis auch durch den hohen Lipidanteil der hMSC-Tert Adipozyten nach der Differenzierung (Tag 14) erklärt werden, der eine Aufnahme weiterer Lipide in größerem Umfang in die differenzierten Adipozyten verhindert. Die Aufnahme ganzer Lipoproteine als physiologischer Weg der Versorgung mit Nahrungsfetten ist im Adipozyten eher unwahrscheinlich, da der größte Teil der triglyzeridreichen Lipoproteine im Gefäßlumen durch die LpL hydrolysiert und die Fettsäuren in die Zelle aufgenommen werden (Large et al., 2004).

Für Adipozyten sind neben CD36 auch die *Fatty Acid*-Transport Proteine (FATP1-6) für eine spezifische Aufnahme von Fettsäuren in Adipozyten beschrieben worden (Hajri and Abumrad, 2002; Large et al., 2004). CD36 wurde zuerst als Makrophagen-Rezeptor für oxidierte LDL und als Adipozyten-Rezeptor für langkettige Fettsäuren mit dem Lipidstoffwechsel in Verbindung gebracht (Harmon and Abumrad, 1993). CD36 wurde durch die Bindung reaktiver Derivate langkettiger Fettsäuren als „Fettsäure-Rezeptor“ identifiziert, wobei durch eine Blockade von CD36 die Fettsäure-Aufnahme von Rattenadipozyten um ca. 70% reduziert werden konnte (Hamilton and Kamp, 1999). CD36-Knockout Mäuse zeigen eine massiv beeinträchtigte Fettsäureaufnahme in Herz, Skelettmuskel und Fettgewebe und erhöhte Plasma Triglyzerid- und Fettsäurewerte (Coburn et al., 2000). Die Tiere zeigen weiterhin durch die verringerte Fettsäure-Nutzung im Muskel eine gewebespezifisch erhöhte Insulin-Sensitivität und sind vor einer durch eine Hochfettdiät induzierten Adipositas geschützt (Hajri et al., 2002; Hajri et al., 2007).

Durch Transfektion in Mauszellen konnte für FATP1 eine stark erhöhte Aufnahme langkettiger und zu einem geringeren Anteil auch kurzkettiger Fettsäuren gezeigt werden (Schaffer and Lodish, 1994). Hirsch et al. konnten später die Zugehörigkeit von FATP1 zu einer großen Familie homologer Proteine beschreiben (Hirsch et al., 1998). Die Funktion der FAT-Proteine in der Fettsäure-Aufnahme wurde aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur *Long-Chain Fatty-Acid-Acyl-CoA Synthetase* zunächst in Frage gestellt (Uchiyama et al., 1996; Berger et al., 1998). Die *Long-Chain Fatty-Acid-Acyl-CoA Synthetase* verestert Fettsäuren zur Produktion von Acyl-CoA fördert möglicherweise die Aufnahme von Fettsäuren durch Verringerung der Konzentration an freien Fettsäuren im Cytosol und durch den Aufbau eines Konzentrationsgradienten zwischen intra- und extrazellulären Fettsäure-Pools. Demnach ist es möglich, dass die FAT-Proteine als membrangebundene CoA-Synthetasen fungieren und so die Aufnahme von Fettsäuren ermöglichen (Hajri and Abumrad, 2002). Bisher gibt es aber keine *in vivo* Daten, die eine physiologische Funktion der FAT-Proteine oder Veränderungen bedingt durch eine FATP-Defizienz oder durch Gen-Polymorphismen bestätigen.

Um eine Beteiligung der Fettsäuretransporter und deren spezifische Aufnahme in den hMSC-Tert Zellen zu untersuchen, müssten diese einzeln oder in Kombination gezielt ausgeschaltet werden. Wahrscheinlich ist, dass Fettsäuren nicht nur über einen Mechanismus in die Zellen aufgenommen werden, sondern dass auch wie bei den Lipoprotein-Rezeptoren mehrere Transporter an der Fettsäure-Aufnahme beteiligt sind.

4.4 BEDEUTUNG DES APOE FÜR DIE ADIPOZYTEN-FUNKTION

Um die Bedeutung des ApoE für die Adipozyten-Funktion im Hinblick auf deren Stoffwechsel und Differenzierung zu untersuchen, wurden lentivirale siRNA-basierende Knockdown-Konstrukte zur Depletion der ApoE-Expression verwendet. Die hMSC-Tert-Adipozyten, in denen ein siRNA-vermittelter ApoE-Knockdown vorliegt, zeigen morphologisch eine drastisch verringerte Triglyzeridakkumulation nach 14 Tagen adipozytärer Differenzierung (Abb.3.27). Die mRNA-Expressionsanalysen zeigten während des Differenzierungsverlaufs in den ApoE-depletierten Adipozyten eine reduzierte Expression von PPAR γ und dessen Target-Genen Adiponektin, aP2, GLUT4 und ApoE im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb.3.28). Demnach korreliert die verringerte Triglyzeridakkumulation in den ApoE-depletierten Adipozyten mit einer beeinträchtigten adipozytären Differenzierung. Auf Proteinebene konnte in den ApoE-Knockdown Zellen ein Verlust der adipozytenspezifischen PPAR γ 2-Isoform beobachtet werden (Abb.3.29). Die Aktivität der beiden PPAR γ -Isoformen werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Ren et al. konnten in PPAR γ -depletierten 3T3-L1 Zellen zeigen, dass eine ektopische Expression von PPAR γ 2 in der Adipogenese der Zellen resultiert, die Expression von PPAR γ 1 hingegen nicht (Ren et al., 2002). Mueller et al. haben dagegen gezeigt, dass beide Isoformen, PPAR γ 1 und PPAR γ 2, die adipozytäre Differenzierung in PPAR γ -defizienten Fibroblasten vorantreiben, wobei PPAR γ 2 einen etwas stärkeren Effekt auf die Adipogenese hat als PPAR γ 1 (Mueller et al., 2002). Diese Ergebnisse gehen einher mit den in dieser Arbeit generierten Ergebnissen, wobei es in den ApoE-Knockdown Zellen zu einem Verlust der PPAR γ 2-Isoform, gleichzeitig aber auch zu einer leicht verstärkten Expression von PPAR γ 1 kommt. Durch Supplementation der Zellen mit ApoE3-haltigem Zellkulturüberstand (vergl. Abb.3.30), konnte ein signifikanter Anstieg der Triglyzeridakkumulation sowohl in den ApoE-Knockdown Zellen als auch in den Kontrollzellen erreicht werden (Abb.3.31). Die Inkubation mit rekombinantem humanem ApoE3 führte nur zu einem geringeren Effekt. Die Ursache liegt vermutlich in unterschiedlicher Modifizierung (Glykosylierung, Sialysierung) des von Adipozyten sezernierten ApoE im Vergleich zu rekombinantem ApoE. Eine fehlende Lipidierung des ApoE kann hier ausgeschlossen werden, da gezeigt werden konnte, dass ApoE von den Adipozyten in lipidfreier Form sezerniert wird und erst im Zellkulturmedium mit Lipiden assoziiert (vergl. Kapitel 3.2.3). Möglicherweise wird das ApoE in Adipozyten aber auch zusammen mit anderen Molekülen sezerniert, die ebenfalls einen Einfluss auf die Differenzierung der Adipozyten nehmen. Die

Analyse der Expressionsmuster der adipozytären Marker nach der ApoE-Supplementation hat ergeben, dass durch die Supplementation zwar ein Anstieg der Triglyzerid-Akkumulation in den depletierten ApoE-Adipozyten erreicht werden konnte, dies allerdings keine Hochregulation auf die PPAR γ -Expression und dessen Target-Gene und somit die adipozytäre Differenzierung hat (Abb.3.32). Somit kommt dem endogenen ApoE in der adipozytären Differenzierung eine wichtige Bedeutung zu, die von exogenem ApoE nicht erfüllt werden kann. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Ergebnisse der Supplementation der ApoE-Knockdown Zellen mit ApoE-haltiger VLDL. Hierbei kommt es ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Akkumulation intrazellulärer Triglyzeride (Abb.3.33), aber nicht zu einer Rekonstitution der Transkription der adipozytären Marker-Gene (Abb.3.34). Diese Ergebnisse machen zwei unterschiedliche Funktionen für exogenes und von den Adipozyten endogen synthetisiertes ApoE wahrscheinlich. Um diese Hypothese zu aufzuklären, könnte eine ApoE-Reexpression in den depletierten ApoE-Zellen untersucht werden. Wie endogenes ApoE die adipozytäre Differenzierung beeinflussen könnte, ist bislang jedoch unklar. Interessanterweise konnte in einer Fütterungsstudie, die in unserem Institut in Wildtyp- und ApoE-defizienten Mäusen durchgeführt wurde, eine gegenläufige ApoE-abhängige Ausprägung der osteoblastären und adipozytären Entwicklung beschrieben (Bartelt et al., Manuskript in Vorbereitung). Die ApoE-Knockout Maus zeigt neben einem reduzierten Fettgewebe eine erhöhte osteoblastäre Aktivität, die mit einer höheren Knochenmasse korreliert. Die osteoblastäre Entwicklung wird durch den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert (Boland et al., 2004; Gregory et al., 2005; Liu et al., 2009). Dabei induzieren die Wnt-Moleküle eine Translokation des β -Catenins in den Nukleus, wo dies zur Inhibition der Transkriptionsfaktoren PPAR γ und C/EBP α und den adipozytären *Downstream*-Genen führt (Mulholland et al., 2005). Eine Inhibition der Wnt-Signalkaskade führt im Gegensatz zu einer spontanen Adipogenese in mesenchymalen Präkursorzellen (Ross et al., 2000). Dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg wird somit eine Schalterfunktion zugeschrieben, die falls aktiviert, die Adipogenese hemmt und die Osteogenese aktiviert (Zhou et al., 2008). Ein möglicher Mechanismus für die Rolle des ApoE in der adipozytären Differenzierung wäre eine Konkurrenz um die Bindung an den initialen LRP/*Frizzled*-Rezeptor-Komplex von ApoE und Wnt, was bei einer Bindung des ApoE einen Zerfall dieses Komplexes zur Folge hätte. Die Wnt-Signalkaskade würde somit nicht induziert, was in einer Phosphorylierung des β -Catenins und der Degradation des Proteins resultiert, und somit der *Default*-Weg der adipozytären Differenzierung aktiviert wird. Derzeit sind vor allem die Rezeptoren LRP5/6 für die Interaktion im Wnt-Signalweg beschrieben (He et al., 2004). Allerdings geben neuere Untersuchungen auch Hinweise auf eine mögliche Interaktion von LRP1 (Zilberberg et al., 2004). Für LRP1-defiziente Adipozyten konnte *in vivo* und *in vitro* ebenfalls eine beeinträchtigte Adipogenese gezeigt werden (Terrand et al., 2009). Diese Hypothese der Interaktion des ApoE, Wnt und möglicherweise LRP1 beruht derzeit allerdings ausschließlich auf

Ergebnissen für die osteoblastäre Differenzierung der hMSC-Tert Zellen und muss für die adipozytäre Differenzierung abschließend getestet werden.

Zusammenfassend konnte mit den in diesem Abschnitt generierten Daten eindeutig gezeigt werden, dass ApoE eine wichtige Funktion zum Einen für die Lipidaufnahme und zum Anderen für die Differenzierung von humanen Adipozyten innehat. Angesichts der zentralen Bedeutung des Fettgewebes für den Stoffwechsel ist die Aufklärung der regulatorischen Mechanismen wissenschaftlich von hohem Interesse, da eine Insulin-Resistenz und Folgeerkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ II mit einer hohen Fettgewebsmasse assoziiert sind. Könnten direkte Zusammenhänge zwischen der ApoE-Expression und Fettgewebsentwicklung beim Menschen gefunden werden, eröffnete dies möglicherweise therapeutische Ansätze für die Behandlung der Insulin-Resistenz.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite
Abb. 1.1 Übersicht über den Lipoproteinstoffwechsel	5
Abb. 1.2 Schematische Darstellung eines Lipoproteins	6
Abb. 1.3 Schematische Darstellung der primärstruktur der ApoE-Isoformen	13
Abb. 1.4 Transkriptionelle Regulation der adipozytären Differenzierung	17
Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Lipogenese und Lipolyse im Adipozyten	19
Abb. 2.1 Schematische Darstellung des TaqMan®-Prinzip	29
Abb. 3.1 Fettrotfärbung der hMSC-Tert Adipozyten im Differenzierungsverlauf	44
Abb. 3.2 mRNA-Expressionanalysen von adipozytären Markergenen in hMSC-Tert Adipozyten	46
Abb. 3.3 Proteinexpression von ApoE un aP2 in hMSC-Tert Adipozyten	47
Abb. 3.4 Fettrotfärbung von humanen Präadipozyten	48
Abb. 3.5 mRNA-Expressionsanalysen von adipozytären Markergenen in humanen Präadipozyten	49
Abb. 3.6 ApoE-Sekretion in den Zellkulturüberstand der hMSC-Tert Adipozyten	51
Abb. 3.7 Insulin- und Rosiglitazon stimulierte ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Adipozyten	52
Abb. 3.8 Liposomen-stimulierte ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Adipozyten	53
Abb. 3.9 ApoE-Sekretion nach Stimulation mit HDL und ApoAI	54
Abb. 3.10 ApoE-Sekretion nach Inhibition mit BFA, Cytochalasin D und Colchicin	55
Abb. 3.11 ApoE-Sekretion nach Inhibition mit BAPTA-AM und 2-APB	56
Abb. 3.12 ApoE-Sekretion nach Inhibition mit H89	56
Abb. 3.13 ApoE-Sekretion nach Inhibitor und zusätzlicher Stimulation durch ApoAI	57
Abb. 3.14 ApoE-Sekretion nach Inhibitor und zusätzlicher Stimulation durch ApoAI	58
Abb. 3.15 Adiponektin Sekretion in hMSC-Tert überständen	59
Abb. 3.16 ApoE-FPLC Profil	61
Abb. 3.17 Aufnahme von ³ H-Cholesteryloleyl ether markierten Liposomen	63
Abb. 3.18 Aufnahme von ¹⁴ C-Triolein markierten Liposomen	64
Abb. 3.19 Aufnahme von ³ H-Cholesteroleleyl ether markierten Liposomen nach Inhibition der Lipoproteinrezeptoren	66
Abb. 3.20 Aufnahme von ¹⁴ C-Triolein markierten Liposomen nach Inhibition der Lipoproteinrezeptoren	67
Abb. 3.21 Aufnahme von ¹²⁵ I-markierten Chylomikronen-Remnants in hMSC-Tert Adipozyten und HuH7-Leberzellen Zellen	69
Abb. 3.22 Aufnahme von ¹²⁵ I-markierten CR nach Insulin-Stimulation	70
Abb. 3.23 Immunfluoreszenz Aufnahme Cy5-markeierter CR	72
Abb. 3.24 Immunfluoreszenz Aufnahme Cy5-markeierter CR nach Inkubation mit LpL	73
Abb. 3.25 Immunfluoreszenz Aufnahme Cy5-markeierter CR und Nilrotfärbung	74
Abb.3.26A mRNA-Expressionsanalyse der siRNA-medierten Knockdown-Konstrukte	75
Abb.3.26B Proteinexpression von ApoE in siRNA-medierten Knockdown-Konstrukte	76

Abb.3.27 Fettrotfärbung der siRNA-medierten Knockdown-Konstrukte nach adipozytärer Differenzierung	77
Abb.3.28 mRNA-Expressionsanalysen von adipozytären Markergenen in siRNA-medierten Knockdown-Konstrukten	78
Abb.3.29 Proteinexpression von PPAR γ in siRNA-medierten Knockdown-Konstrukten	79
Abb.3.30 mRNA-Expression und Sekretion von ApoE der ApoE-überexprimierenden hMSC-Tert Zellen	80
Abb.3.31A Fettrotfärbung nach ApoE-Supplementation der siRNA-medierten Knockdown-Konstrukte	81
Abb.3.31B Quantifizierung der Fettrotfärbung	82
Abb.3.32 mRNA-Expressionanalyse adipozytärer Marker der siRNA-medierten Knockdown-Konstrukte nach ApoE-Supplementation	83
Abb.3.33 Fettrotfärbung der siRNA-medierten Knockdown-Konstrukte nach VLDL-Supplementation	84
Abb.3.34 mRNA-Expressionanalyse adipozytärer Marker der siRNA-medierten Knockdown-Konstrukte nach ApoE-Supplementation	85
Tabelle 1.1 Wichtige Lipoproteinklassen und ihre Eigenschaften	6
Tabelle 2.1 Verwendete Assays-On-Demand (TaqMan [®] -Sonden)	30
Tabelle 2.2 Verwendete Antikörper	33
Tabelle 3.1 Inkubation der hMSC-Tert Adipozyten mit ³ H-markierten Lipiden	60

LITERATUR

- Abumrad, N., Harmon, C., and Ibrahimi, A. (1998). Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J. Lipid Res.* *39*, 2309-2318.
- 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.
- Alihaud G. and Hauner H. (1998). Development of white adipose tissue. In *The Handbook of Obesity*, Bray G, Bouchard C, and James WPT, eds. (New York: Marcel Dekker), pp. 359-378.
- Altomonte, J., Richter, A., Harbaran, S., Suriawinata, J., Nakae, J., Thung, S.N., Meseck, M., Accili, D., and Dong, H. (2003). Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *285*, E718-E728.
- Amri, E.Z., Bertrand, B., Ailhaud, G., and Grimaldi, P. (1991). Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. *J. Lipid Res.* *32*, 1449-1456.
- Anant, S. and Davidson, N.O. (2001). Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing. *Curr. Opin. Lipidol.* *12*, 159-165.
- Arbones-Mainar, J.M., Johnson, L.A., Altenburg, M.K., and Maeda, N. (2008). Differential modulation of diet-induced obesity and adipocyte functionality by human apolipoprotein E3 and E4 in mice. *Int. J. Obes. (Lond)* *32*, 1595-1605.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 15718-15723.
- Barter, P.J., Brewer, H.B., Jr., Chapman, M.J., Hennekens, C.H., Rader, D.J., and Tall, A.R. (2003). Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *23*, 160-167.
- Barthel, A., Schmoll, D., and Unterman, T.G. (2005). FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab* *16*, 183-189.
- Beigneux, A.P., Davies, B.S., Gin, P., Weinstein, M.M., Farber, E., Qiao, X., Peale, F., Bunting, S., Walzem, R.L., Wong, J.S., Blaner, W.S., Ding, Z.M., Melford, K., Wongsirirot, N., Shu, X., de Sauvage, F., Ryan, R.O., Fong, L.G., Bensadoun, A., and Young, S.G. (2007). Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab* *5*, 279-291.
- Beisiegel, U., Ameis, D., Will, H., and Greten, H. (1995). [Hypertriglyceridemia and arteriosclerosis. Physiology and pathophysiology of chylomicron catabolism]. *Internist (Berl)* *36*, 357-361.
- Beisiegel, U. and Heeren, J. (1997). Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *Proc. Nutr. Soc.* *56*, 731-737.
- 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.
- Berger, J., Truppe, C., Neumann, H., and Forss-Petter, S. (1998). A novel relative of the very-long-chain acyl-CoA synthetase and fatty acid transporter protein genes with a distinct expression pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *247*, 255-260.
- Bickel, P.E., Tansey, J.T., and Welte, M.A. (2009). PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim. Biophys. Acta* *1791*, 419-440.
- Biggs, W.H., III, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 7421-7426.
- Bishop, J.R., Stanford, K.I., and Esko, J.D. (2008). Heparan sulfate proteoglycans and triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* *19*, 307-313.

- Boland,G.M., Perkins,G., Hall,D.J., and Tuan,R.S. (2004). Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J. Cell Biochem.* 93, 1210-1230.
- Boren,J., Graham,L., Wettsten,M., Scott,J., White,A., and Olofsson,S.O. (1992). The assembly and secretion of ApoB 100-containing lipoproteins in Hep G2 cells. ApoB 100 is cotranslationally integrated into lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 267, 9858-9867.
- Bradbury,P., Mann,C.J., Kochl,S., Anderson,T.A., Chester,S.A., Hancock,J.M., Ritchie,P.J., Amey,J., Harrison,G.B., Levitt,D.G., Banaszak,L.J., Scott,J., and Shoulders,C.C. (1999). A common binding site on the microsomal triglyceride transfer protein for apolipoprotein B and protein disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* 274, 3159-3164.
- 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.
- Briggs,M.R., Yokoyama,C., Wang,X., Brown,M.S., and Goldstein,J.L. (1993). Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* 268, 14490-14496.
- Brown,M.S. and Goldstein,J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
- Brown,M.S., Goldstein,J.L., Krieger,M., Ho,Y.K., and Anderson,R.G. (1979). Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J. Cell Biol.* 82, 597-613.
- Brown,S.S. and Spudich,J.A. (1981). Mechanism of action of cytochalasin: evidence that it binds to actin filament ends. *J. Cell Biol.* 88, 487-491.
- Bruce,C., Chouinard,R.A., Jr., and Tall,A.R. (1998). Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu. Rev. Nutr.* 18, 297-330.
- Brunet,A., Bonni,A., Zigmund,M.J., Lin,M.Z., Juo,P., Hu,L.S., Anderson,M.J., Arden,K.C., Blenis,J., and Greenberg,M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Chiba,T., Nakazawa,T., Yui,K., Kaneko,E., and Shimokado,K. (2003). VLDL induces adipocyte differentiation in ApoE-dependent manner. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1423-1429.
- Chuck,S.L., Yao,Z., Blackhart,B.D., McCarthy,B.J., and Lingappa,V.R. (1990). New variation on the translocation of proteins during early biogenesis of apolipoprotein B. *Nature* 346, 382-385.
- Coburn,C.T., Knapp,F.F., Jr., Febbraio,M., Beets,A.L., Silverstein,R.L., and Abumrad,N.A. (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275, 32523-32529.
- Corvera,S., Graver,D.F., and Smith,R.M. (1989). Insulin increases the cell surface concentration of alpha 2-macroglobulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. Altered transit of the receptor among intracellular endocytic compartments. *J. Biol. Chem.* 264, 10133-10138.
- Dalen,K.T., Dahl,T., Holter,E., Arntsen,B., Londos,C., Sztalryd,C., and Nebb,H.I. (2007). LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 210-227.
- Daniels,T.F., Killinger,K.M., Michal,J.J., Wright,R.W., Jr., and Jiang,Z. (2009). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 474-488.
- Darimont,C., Avanti,O., Zbinden,I., Leone-Vautravets,P., Mansourian,R., Giusti,V., and Mace,K. (2006). Liver X receptor preferentially activates de novo lipogenesis in human preadipocytes. *Biochimie* 88, 309-318.
- Davidson,N.O. and Shelness,G.S. (2000). APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 169-193.
- Davignon,J., Gregg,R.E., and Sing,C.F. (1988). Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 8, 1-21.
- de Faria,E., Fong,L.G., Komaromy,M., and Cooper,A.D. (1996). Relative roles of the LDL receptor, the LDL receptor-like protein, and hepatic lipase in chylomicron remnant removal by the liver. *J. Lipid Res.* 37, 197-209.
- Descamps,O., Bilheimer,D., and Herz,J. (1993). Insulin stimulates receptor-mediated uptake of apoE-enriched lipoproteins and activated alpha 2-macroglobulin in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 974-981.

- Donaldson,J.G., Kahn,R.A., Lippincott-Schwartz,J., and Klausner,R.D. (1991). Binding of ARF and beta-COP to Golgi membranes: possible regulation by a trimeric G protein. *Science* 254, 1197-1199.
- Dory,L. (1991). Regulation of apolipoprotein E secretion by high density lipoprotein 3 in mouse macrophages. *J. Lipid Res.* 32, 783-792.
- Dugail,I., Le Lay,S., Varret,M., Le,L., X, Dagher,G., and Ferre,P. (2003). New insights into how adipocytes sense their triglyceride stores. Is cholesterol a signal? *Horm. Metab Res.* 35, 204-210.
- Elbrecht,A., Chen,Y., Cullinan,C.A., Hayes,N., Leibowitz,M., Moller,D.E., and Berger,J. (1996). Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 431-437.
- Espiritu,D.J. and Mazzone,T. (2008). Oxidative stress regulates adipocyte apolipoprotein e and suppresses its expression in obesity. *Diabetes* 57, 2992-2998.
- Fajas,L., Schoonjans,K., Gelman,L., Kim,J.B., Najib,J., Martin,G., Fruchart,J.C., Briggs,M., Spiegelman,B.M., and Auwerx,J. (1999). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol. Cell Biol.* 19, 5495-5503.
- 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.
- Febbraio,M., Abumrad,N.A., Hajjar,D.P., Sharma,K., Cheng,W., Pearce,S.F., and Silverstein,R.L. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* 274, 19055-19062.
- Felts,J.M., Itakura,H., and Crane,R.T. (1975). The mechanism of assimilation of constituents of chylomicrons, very low density lipoproteins and remnants - a new theory. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1467-1475.
- Fisher,R.M., Thorne,A., Hamsten,A., and Arner,P. (2002). Fatty acid binding protein expression in different human adipose tissue depots in relation to rates of lipolysis and insulin concentration in obese individuals. *Mol. Cell Biochem.* 239, 95-100.
- Forman,B.M., Tontonoz,P., Chen,J., Brun,R.P., Spiegelman,B.M., and Evans,R.M. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83, 803-812.
- Frykman,P.K., Brown,M.S., Yamamoto,T., Goldstein,J.L., and Herz,J. (1995). Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 8453-8457.
- Furuhashi,M., Tuncman,G., Gorgun,C.Z., Makowski,L., Atsumi,G., Vaillancourt,E., Kono,K., Babaev,V.R., Fazio,S., Linton,M.F., Sulsky,R., Robl,J.A., Parker,R.A., and Hotamisligil,G.S. (2007). Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447, 959-965.
- Gafvels,M.E., Paavola,L.G., Boyd,C.O., Nolan,P.M., Wittmaack,F., Chawla,A., Lazar,M.A., Bucan,M., Angelin,B.O., and Strauss,J.F., III (1994). Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the murine homolog of the very low density lipoprotein/apolipoprotein-E receptor: expression pattern and assignment of the gene to mouse chromosome 19. *Endocrinology* 135, 387-394.
- Gao,J., Katagiri,H., Ishigaki,Y., Yamada,T., Ogihara,T., Imai,J., Uno,K., Hasegawa,Y., Kanzaki,M., Yamamoto,T.T., Ishibashi,S., and Oka,Y. (2007). Involvement of apolipoprotein E in excess fat accumulation and insulin resistance. *Diabetes* 56, 24-33.
- Gauthier,A., Vassiliou,G., Benoist,F., and McPherson,R. (2003). Adipocyte low density lipoprotein receptor-related protein gene expression and function is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* 278, 11945-11953.
- Gesta,S., Tseng,Y.H., and Kahn,C.R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242-256.
- Ghiselli,G., Beigel,Y., Soma,M., and Gotto,A.M., Jr. (1986). Plasma catabolism of human apolipoprotein E isoproteins: lack of conversion of the doubly sialylated form to the asialo form in plasma. *Metabolism* 35, 399-403.

- Gin, P., Yin, L., Davies, B.S., Weinstein, M.M., Ryan, R.O., Bensadoun, A., Fong, L.G., Young, S.G., and Beigneux, A.P. (2008). The acidic domain of GPIHBP1 is important for the binding of lipoprotein lipase and chylomicrons. *J. Biol. Chem.* *283*, 29554-29562.
- Goldberg, I.J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Lipid Res.* *37*, 693-707.
- Goldberg, I.J., Eckel, R.H., and Abumrad, N.A. (2009). Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S86-S90.
- Goldberg, I.J., Kandel, J.J., Blum, C.B., and Ginsberg, H.N. (1986). Association of plasma lipoproteins with postheparin lipase activities. *J. Clin. Invest* *78*, 1523-1528.
- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 333-337.
- Gordts, P.L., Reekmans, S., Lauwers, A., Van Dongen, A., Verbeek, L., and Roebroek, A.J. (2009). Inactivation of the LRP1 intracellular NPxYxxL motif in LDLR-deficient mice enhances postprandial dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 1258-1264.
- Goudriaan, J.R., Espirito Santo, S.M., Voshol, P.J., Teusink, B., van Dijk, K.W., van Vlijmen, B.J., Romijn, J.A., Havekes, L.M., and Rensen, P.C. (2004). The VLDL receptor plays a major role in chylomicron metabolism by enhancing LPL-mediated triglyceride hydrolysis. *J. Lipid Res.* *45*, 1475-1481.
- Goudriaan, J.R., Tacke, P.J., Dahlmans, V.E., Gijbels, M.J., van Dijk, K.W., Havekes, L.M., and Jong, M.C. (2001). Protection from obesity in mice lacking the VLDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *21*, 1488-1493.
- Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Moos, M.C., Jr., Londos, C., and Kimmel, A.R. (1993). Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 12035-12039.
- Gregory, C.A., Perry, A.S., Reyes, E., Conley, A., Gunn, W.G., and Prockop, D.J. (2005). Dkk-1-derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow. *J. Biol. Chem.* *280*, 2309-2323.
- Gursky, O. (2005). Apolipoprotein structure and dynamics. *Curr. Opin. Lipidol.* *16*, 287-294.
- Gusarova, V., Seo, J., Sullivan, M.L., Watkins, S.C., Brodsky, J.L., and Fisher, E.A. (2007). Golgi-associated maturation of very low density lipoproteins involves conformational changes in apolipoprotein B, but is not dependent on apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* *282*, 19453-19462.
- Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., Kratky, D., Wagner, E.F., Klingenspor, M., Hoefler, G., and Zechner, R. (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* *312*, 734-737.
- Hagan, D.L., Kienzle, B., Jamil, H., and Hariharan, N. (1994). Transcriptional regulation of human and hamster microsomal triglyceride transfer protein genes. Cell type-specific expression and response to metabolic regulators. *J. Biol. Chem.* *269*, 28737-28744.
- Hajri, T. and Abumrad, N.A. (2002). Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu. Rev. Nutr.* *22*, 383-415.
- Hajri, T., Hall, A.M., Jensen, D.R., Pietka, T.A., Drover, V.A., Tao, H., Eckel, R., and Abumrad, N.A. (2007). CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue. *Diabetes* *56*, 1872-1880.
- Hajri, T., Han, X.X., Bonen, A., and Abumrad, N.A. (2002). Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J. Clin. Invest* *109*, 1381-1389.
- Hamel, E. (1996). Antimitotic natural products and their interactions with tubulin. *Med. Res. Rev.* *16*, 207-231.
- Hamilton, J.A. and Kamp, F. (1999). How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* *48*, 2255-2269.
- Hamilton, R.L., Moorehouse, A., and Havel, R.J. (1991). Isolation and properties of nascent lipoproteins from highly purified rat hepatocytic Golgi fractions. *J. Lipid Res.* *32*, 529-543.

- Harmon,C.M. and Abumrad,N.A. (1993). Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. *J. Membr. Biol.* *133*, 43-49.
- 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.
- Havel RJ and Kane J.P. (2001). Introduction: Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins. In *The Metabolism & Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, ed. (New York: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D), pp. 2705-2716.
- He,X., Semenov,M., Tamai,K., and Zeng,X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* *131*, 1663-1677.
- 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.
- Henriksen,T., Mahoney,E.M., and Steinberg,D. (1981). Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *78*, 6499-6503.
- Hirsch,D., Stahl,A., and Lodish,H.F. (1998). A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 8625-8629.
- Hotamisligil,G.S., Johnson,R.S., Distel,R.J., Ellis,R., Papanioannou,V.E., and Spiegelman,B.M. (1996). Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* *274*, 1377-1379.
- Hu,E., Tontonoz,P., and Spiegelman,B.M. (1995). Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 9856-9860.
- Huang,Z.H., Gu,D., and Mazzone,T. (2009). Role of adipocyte-derived apoE in modulating adipocyte size, lipid metabolism, and gene expression in vivo. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *296*, E1110-E1119.
- Huang,Z.H., Luque,R.M., Kineman,R.D., and Mazzone,T. (2007). Nutritional regulation of adipose tissue apolipoprotein E expression. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *293*, E203-E209.
- Hussain,M.M., Maxfield,F.R., Mas-Oliva,J., Tabas,I., Ji,Z.S., Innerarity,T.L., and Mahley,R.W. (1991). Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J. Biol. Chem.* *266*, 13936-13940.
- 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.
- Innerarity,T.L., Boren,J., Yamanaka,S., and Olofsson,S.O. (1996). Biosynthesis of apolipoprotein B48-containing lipoproteins. Regulation by novel post-transcriptional mechanisms. *J. Biol. Chem.* *271*, 2353-2356.

- 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.
- Ishibashi,S., Perrey,S., Chen,Z., Osuga,J., Shimada,M., Ohashi,K., Harada,K., Yazaki,Y., and Yamada,N. (1996). Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J. Biol. Chem.* 271, 22422-22427.
- Jenkins-Kruchten,A.E., Bennaars-Eiden,A., Ross,J.R., Shen,W.J., Kraemer,F.B., and Bernlohr,D.A. (2003). Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. *J. Biol. Chem.* 278, 47636-47643.
- Ji,Y., Wang,N., Ramakrishnan,R., Sehayek,E., Huszar,D., Breslow,J.L., and Tall,A.R. (1999). Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J. Biol. Chem.* 274, 33398-33402.
- Karagiannides,I., Abdou,R., Tzortzopoulou,A., Voshol,P.J., and Kypreos,K.E. (2008). Apolipoprotein E predisposes to obesity and related metabolic dysfunctions in mice. *FEBS J.* 275, 4796-4809.
- Khan,M., Pelengaris,S., Cooper,M., Smith,C., Evan,G., and Betteridge,J. (2003). Oxidised lipoproteins may promote inflammation through the selective delay of engulfment but not binding of apoptotic cells by macrophages. *Atherosclerosis* 171, 21-29.
- Kim,J.B., Wright,H.M., Wright,M., and Spiegelman,B.M. (1998). ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 4333-4337.
- Kirchhausen,T. (2002). Clathrin adaptors really adapt. *Cell* 109, 413-416.
- Kishida,K., Kuriyama,H., Funahashi,T., Shimomura,I., Kihara,S., Ouchi,N., Nishida,M., Nishizawa,H., Matsuda,M., Takahashi,M., Hotta,K., Nakamura,T., Yamashita,S., Tochino,Y., and Matsuzawa,Y. (2000). Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 20896-20902.
- Kitamura,T., Kitamura,Y., Kuroda,S., Hino,Y., Ando,M., Kotani,K., Konishi,H., Matsuzaki,H., Kikkawa,U., Ogawa,W., and Kasuga,M. (1999). Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol. Cell Biol.* 19, 6286-6296.
- Kliwer,S.A., Lenhard,J.M., Willson,T.M., Patel,I., Morris,D.C., and Lehmann,J.M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83, 813-819.
- Ko,K.W., Avramoglu,R.K., McLeod,R.S., Vukmirica,J., and Yao,Z. (2001). The insulin-stimulated cell surface presentation of low density lipoprotein receptor-related protein in 3T3-L1 adipocytes is sensitive to phosphatidylinositide 3-kinase inhibition. *Biochemistry* 40, 752-759.
- Kockx,M., Guo,D.L., Huby,T., Lesnik,P., Kay,J., Sabaretnam,T., Jary,E., Hill,M., Gaus,K., Chapman,J., Stow,J.L., Jessup,W., and Kritharides,L. (2007). Secretion of apolipoprotein E from macrophages occurs via a protein kinase A and calcium-dependent pathway along the microtubule network. *Circ. Res.* 101, 607-616.
- Kockx,M., Jessup,W., and Kritharides,L. (2008). Regulation of endogenous apolipoprotein E secretion by macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1060-1067.
- Kockx,M., Rye,K.A., Gaus,K., Quinn,C.M., Wright,J., Sloane,T., Sviridov,D., Fu,Y., Sullivan,D., Burnett,J.R., Rust,S., Assmann,G., Anantharamaiah,G.M., Palgunachari,M.N., Katz,S.L., Phillips,M.C., Dean,R.T., Jessup,W., and Kritharides,L. (2004). Apolipoprotein A-I-stimulated apolipoprotein E secretion from human macrophages is independent of cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 279, 25966-25977.
- Kostner,G.M., Scharnagel,H., Kostner,K., and März,W. (2007). Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*, Schwandt p. and Parhofer K.G, eds. (Stuttgart: Schattauer), pp. 2-65.

- Kraemer,F.B. and Shen,W.J. (2002). Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J. Lipid Res.* 43, 1585-1594.
- Krieger,M. (2001). Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J. Clin. Invest* 108, 793-797.
- Kuipers,F., van Ree,J.M., Hofker,M.H., Wolters,H., In't,V.G., Havinga,R., Vonk,R.J., Princen,H.M., and Havekes,L.M. (1996). Altered lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice does not affect cholesterol balance across the liver. *Hepatology* 24, 241-247.
- Kuriyama,H., Yamashita,S., Shimomura,I., Funahashi,T., Ishigami,M., Aragane,K., Miyaoka,K., Nakamura,T., Takemura,K., Man,Z., Toide,K., Nakayama,N., Fukuda,Y., Lin,M.C., Wetterau,J.R., and Matsuzawa,Y. (1998). Enhanced expression of hepatic acyl-coenzyme A synthetase and microsomal triglyceride transfer protein messenger RNAs in the obese and hypertriglyceridemic rat with visceral fat accumulation. *Hepatology* 27, 557-562.
- 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.
- Laffitte,B.A., Repa,J.J., Joseph,S.B., Wilpitz,D.C., Kast,H.R., Mangelsdorf,D.J., and Tontonoz,P. (2001). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 507-512.
- Lafontan,M. and Langin,D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog. Lipid Res.* 48, 275-297.
- Large,V., Peroni,O., Letexier,D., Ray,H., and Beylot,M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30, 294-309.
- Lawn,R.M., Wade,D.P., Garvin,M.R., Wang,X., Schwartz,K., Porter,J.G., Seilhamer,J.J., Vaughan,A.M., and Oram,J.F. (1999). The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J. Clin. Invest* 104, R25-R31.
- Le Lay,S., Ferre,P., and Dugail,I. (2004). Adipocyte cholesterol balance in obesity. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 103-106.
- Lefebvre,A.M., Peinado-Onsurbe,J., Leitersdorf,I., Briggs,M.R., Paterniti,J.R., Fruchart,J.C., Fievet,C., Auwerx,J., and Staels,B. (1997). Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a distinct but complementary mechanism relative to fibrates. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1756-1764.
- Lefterova,M.I. and Lazar,M.A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab* 20, 107-114.
- Lehmann,J.M., Moore,L.B., Smith-Oliver,T.A., Wilkison,W.O., Willson,T.M., and Kliewer,S.A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* 270, 12953-12956.
- Lewis,G.F., Uffelman,K.D., Szeto,L.W., Weller,B., and Steiner,G. (1995). Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J. Clin. Invest* 95, 158-166.
- Li,A.C. and Glass,C.K. (2002). The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat. Med.* 8, 1235-1242.
- Li,Y., Marzolo,M.P., van Kerkhof,P., Strous,G.J., and Bu,G. (2000). The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 275, 17187-17194.
- Lillis,A.P., Van Duyn,L.B., Murphy-Ullrich,J.E., and Strickland,D.K. (2008). LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev.* 88, 887-918.
- Lin,F.T. and Lane,M.D. (1994). CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 8757-8761.
- Lindahl,U. and Li,J.P. (2009). Interactions between heparan sulfate and proteins-design and functional implications. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 276, 105-159.

- Lippincott-Schwartz,J., Donaldson,J.G., Schweizer,A., Berger,E.G., Hauri,H.P., Yuan,L.C., and Klausner,R.D. (1990). Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* 60, 821-836.
- Liu,G., Vijayakumar,S., Grumolato,L., Arroyave,R., Qiao,H., Akiri,G., and Aaronson,S.A. (2009). Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells. *J. Cell Biol.* 185, 67-75.
- Llera-Moya,M., Rothblat,G.H., Connelly,M.A., Kellner-Weibel,G., Sakr,S.W., Phillips,M.C., and Williams,D.L. (1999). Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J. Lipid Res.* 40, 575-580.
- Logan,C.Y. and Nusse,R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781-810.
- Lopez-Miranda,J., Perez-Martinez,P., Marin,C., Moreno,J.A., Gomez,P., and Perez-Jimenez,F. (2006). Postprandial lipoprotein metabolism, genes and risk of cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 17, 132-138.
- MacArthur,J.M., Bishop,J.R., Stanford,K.I., Wang,L., Bensadoun,A., Witztum,J.L., and Esko,J.D. (2007). Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J. Clin. Invest* 117, 153-164.
- Maeda,N., Takahashi,M., Funahashi,T., Kihara,S., Nishizawa,H., Kishida,K., Nagaretani,H., Matsuda,M., Komuro,R., Ouchi,N., Kuriyama,H., Hotta,K., Nakamura,T., Shimomura,I., and Matsuzawa,Y. (2001). PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50, 2094-2099.
- 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.
- Marcinkiewicz,A., Gauthier,D., Garcia,A., and Brasaemle,D.L. (2006). The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J. Biol. Chem.* 281, 11901-11909.
- Maruyama,T., Kanaji,T., Nakade,S., Kanno,T., and Mikoshiba,K. (1997). 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P3-induced Ca²⁺ release. *J. Biochem.* 122, 498-505.
- Masson,O., Chavey,C., Dray,C., Meulle,A., Daviaud,D., Quilliot,D., Muller,C., Valet,P., and Liaudet-Coopman,E. (2009). LRP1 receptor controls adipogenesis and is up-regulated in human and mouse obese adipose tissue. *PLoS. One.* 4, e7422.
- Matsunaga,T., Hiasa,Y., Yanagi,H., Maeda,T., Hattori,N., Yamakawa,K., Yamanouchi,Y., Tanaka,I., Obara,T., and Hamaguchi,H. (1991). Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of the apolipoprotein A-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 2793-2797.
- Mazzone,T., Gump,H., Diller,P., and Getz,G.S. (1987). Macrophage free cholesterol content regulates apolipoprotein E synthesis. *J. Biol. Chem.* 262, 11657-11662.
- Mazzone,T., Pustelnikas,L., and Reardon,C.A. (1992). Post-translational regulation of macrophage apoprotein E production. *J. Biol. Chem.* 267, 1081-1087.
- Merida,E., Delgado,E., Molina,L.M., Villanueva-Penacarrillo,M.L., and Valverde,I. (1993). Presence of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36)amide receptors in solubilized membranes of human adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 77, 1654-1657.
- Merkel,M., Eckel,R.H., and Goldberg,I.J. (2002a). Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* 43, 1997-2006.
- Merkel,M., Heeren,J., Dudeck,W., Rinninger,F., Radner,H., Breslow,J.L., Goldberg,I.J., Zechner,R., and Greten,H. (2002b). Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. *J. Biol. Chem.* 277, 7405-7411.
- Merkel,M., Kako,Y., Radner,H., Cho,I.S., Ramasamy,R., Brunzell,J.D., Goldberg,I.J., and Breslow,J.L. (1998). Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low

- density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 13841-13846.
- Merkel,M., Loeffler,B., Kluger,M., Fabig,N., Geppert,G., Pennacchio,L.A., Laatsch,A., and Heeren,J. (2005). Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 280, 21553-21560.
- Misra,U.K., Gawdi,G., Gonzalez-Gronow,M., and Pizzo,S.V. (1999). Coordinate regulation of the alpha(2)-macroglobulin signaling receptor and the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha(2)-macroglobulin receptor by insulin. *J. Biol. Chem.* 274, 25785-25791.
- Mueller,E., Drori,S., Aiyer,A., Yie,J., Sarraf,P., Chen,H., Hauser,S., Rosen,E.D., Ge,K., Roeder,R.G., and Spiegelman,B.M. (2002). Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J. Biol. Chem.* 277, 41925-41930.
- Mulholland,D.J., Dedhar,S., Coetzee,G.A., and Nelson,C.C. (2005). Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr. Rev.* 26, 898-915.
- Muniz,M., Alonso,M., Hidalgo,J., and Velasco,A. (1996). A regulatory role for cAMP-dependent protein kinase in protein traffic along the exocytic route. *J. Biol. Chem.* 271, 30935-30941.
- Nagy,L., Tontonoz,P., Alvarez,J.G., Chen,H., and Evans,R.M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93, 229-240.
- Nakae,J., Kitamura,T., Ogawa,W., Kasuga,M., and Accili,D. (2001). Insulin regulation of gene expression through the forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) requires kinases distinct from Akt. *Biochemistry* 40, 11768-11776.
- Neher,E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20, 389-399.
- Niemeier,A., Gafvels,M., Heeren,J., Meyer,N., Angelin,B., and Beisiegel,U. (1996). VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J. Lipid Res.* 37, 1733-1742.
- Niemeier,A., Niedzielska,D., Secer,R., Schilling,A., Merkel,M., Enrich,C., Rensen,P.C., and Heeren,J. (2008). Uptake of postprandial lipoproteins into bone in vivo: impact on osteoblast function. *Bone* 43, 230-237.
- Nonogaki,K. (2000). New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 43, 533-549.
- Olaisen,B., Teisberg,P., and Gedde-Dahl,T., Jr. (1982). The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. *Hum. Genet.* 62, 233-236.
- Olivecrona,G. and Beisiegel,U. (1997). Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1545-1549.
- Olofsson,S.O., Asp,L., and Boren,J. (1999). The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 10, 341-346.
- Oram,J.F. and Vaughan,A.M. (2000). ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 253-260.
- Pennacchio,L.A., Olivier,M., Hubacek,J.A., Cohen,J.C., Cox,D.R., Fruchart,J.C., Krauss,R.M., and Rubin,E.M. (2001). An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 294, 169-173.
- Phillips,C., Owens,D., Collins,P., and Tomkin,G.H. (2002). Microsomal triglyceride transfer protein: does insulin resistance play a role in the regulation of chylomicron assembly? *Atherosclerosis* 160, 355-360.
- Pouliot,M.C., Despres,J.P., Moorjani,S., Lupien,P.J., Tremblay,A., and Bouchard,C. (1990). Apolipoprotein E polymorphism alters the association between body fatness and plasma lipoproteins in women. *J. Lipid Res.* 31, 1023-1029.
- Powell,L.M., Wallis,S.C., Pease,R.J., Edwards,Y.H., Knott,T.J., and Scott,J. (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 50, 831-840.
- Prawitt,J., Niemeier,A., Kassem,M., Beisiegel,U., and Heeren,J. (2008). Characterization of lipid metabolism in insulin-sensitive adipocytes differentiated from immortalized human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 314, 814-824.

- Quarfordt,S.H., Michalopoulos,G., and Schirmer,B. (1982). The effect of human C apolipoproteins on the in vitro hepatic metabolism of triglyceride emulsions in the rat. *J. Biol. Chem.* 257, 14642-14647.
- Quinn,M.T., Parthasarathy,S., Fong,L.G., and Steinberg,D. (1987). Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 2995-2998.
- Ragozin,S., Niemeier,A., Laatsch,A., Loeffler,B., Merkel,M., Beisiegel,U., and Heeren,J. (2005). Knockdown of hepatic ABCA1 by RNA interference decreases plasma HDL cholesterol levels and influences postprandial lipemia in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1433-1438.
- Ren,D., Collingwood,T.N., Rebar,E.J., Wolffe,A.P., and Camp,H.S. (2002). PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev.* 16, 27-32.
- Rensen,P.C., Jong,M.C., van Vark,L.C., van der,B.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.
- 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.
- Rosen,E.D. (2002). The molecular control of adipogenesis, with special reference to lymphatic pathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 979, 143-158.
- Rosen,E.D., Hsu,C.H., Wang,X., Sakai,S., Freeman,M.W., Gonzalez,F.J., and Spiegelman,B.M. (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 16, 22-26.
- Rosen,E.D. and Spiegelman,B.M. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 145-171.
- Ross,S.E., Hemati,N., Longo,K.A., Bennett,C.N., Lucas,P.C., Erickson,R.L., and MacDougald,O.A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289, 950-953.
- Russell,D.W. and Setchell,K.D. (1992). Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31, 4737-4749.
- Rust,S., Rosier,M., Funke,H., Real,J., Amoura,Z., Piette,J.C., Deleuze,J.F., Brewer,H.B., Duverger,N., Deneffe,P., and Assmann,G. (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* 22, 352-355.
- Rustaeus,S., Stillemark,P., Lindberg,K., Gordon,D., and Olofsson,S.O. (1998). The microsomal triglyceride transfer protein catalyzes the post-translational assembly of apolipoprotein B-100 very low density lipoprotein in McA-RH7777 cells. *J. Biol. Chem.* 273, 5196-5203.
- Schaffer,J.E. and Lodish,H.F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79, 427-436.
- Scheja,L., Makowski,L., Uysal,K.T., Wiesbrock,S.M., Shimshek,D.R., Meyers,D.S., Morgan,M., Parker,R.A., and Hotamisligil,G.S. (1999). Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2-/- mice. *Diabetes* 48, 1987-1994.
- Sehayek,E. and Eisenberg,S. (1991). Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 266, 18259-18267.
- Seo,J.B., Moon,H.M., Kim,W.S., Lee,Y.S., Jeong,H.W., Yoo,E.J., Ham,J., Kang,H., Park,M.G., Steffensen,K.R., Stulnig,T.M., Gustafsson,J.A., Park,S.D., and Kim,J.B. (2004). Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol. Cell Biol.* 24, 3430-3444.
- Sharp,D., Blinderman,L., Combs,K.A., Kienzle,B., Ricci,B., Wager-Smith,K., Gil,C.M., Turck,C.W., Bouma,M.E., Rader,D.J., and . (1993). Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature* 365, 65-69.
- Shelburne,F., Hanks,J., Meyers,W., and Quarfordt,S. (1980). Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J. Clin. Invest* 65, 652-658.

- Shelness,G.S. and Sellers,J.A. (2001). Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 151-157.
- Shen,W.J., Liang,Y., Hong,R., Patel,S., Natu,V., Sridhar,K., Jenkins,A., Bernlohr,D.A., and Kraemer,F.B. (2001). Characterization of the functional interaction of adipocyte lipid-binding protein with hormone-sensitive lipase. *J. Biol. Chem.* **276**, 49443-49448.
- Shimano,H., Yahagi,N., Amemiya-Kudo,M., Hasty,A.H., Osuga,J., Tamura,Y., Shionoiri,F., Iizuka,Y., Ohashi,K., Harada,K., Gotoda,T., Ishibashi,S., and Yamada,N. (1999). Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* **274**, 35832-35839.
- Shimizu-gawa,T., Ando,Y., and Ono,M. (2004). [Angptl3(angiotensin-like 3)]. *Nippon Rinsho* **62**, 1170-1174.
- Shore,V.G. and Shore,B. (1973). Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* **12**, 502-507.
- Shoulders,C.C., Narcisi,T.M., Read,J., Chester,A., Brett,D.J., Scott,J., Anderson,T.A., Levitt,D.G., and Banaszak,L.J. (1994). The abetalipoproteinemia gene is a member of the vitellogenin family and encodes an alpha-helical domain. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 285-286.
- Simonsen,J.L., Rosada,C., Serakinci,N., Justesen,J., Stenderup,K., Rattan,S.I., Jensen,T.G., and Kassem,M. (2002). Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat. Biotechnol.* **20**, 592-596.
- Sparks,J.D. and Sparks,C.E. (1994). Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochim. Biophys. Acta* **1215**, 9-32.
- Spiegelman,B.M., Frank,M., and Green,H. (1983). Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *J. Biol. Chem.* **258**, 10083-10089.
- Spooner,P.M., Chernick,S.S., Garrison,M.M., and Scow,R.O. (1979). Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. Separation and dependence of hormonal effects on hexose metabolism and synthesis of RNA and protein. *J. Biol. Chem.* **254**, 10021-10029.
- Stillemark,P., Boren,J., Andersson,M., Larsson,T., Rustaeus,S., Karlsson,K.A., and Olofsson,S.O. (2000). The assembly and secretion of apolipoprotein B-48-containing very low density lipoproteins in McA-RH7777 cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 10506-10513.
- Stralfors,P. and Honnor,R.C. (1989). Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. Correlation with lipolysis and cAMP-dependent protein kinase activity. *Eur. J. Biochem.* **182**, 379-385.
- Strayer,D.S., Hoek,J.B., Thomas,A.P., and White,M.K. (1999). Cellular activation by Ca²⁺ release from stores in the endoplasmic reticulum but not by increased free Ca²⁺ in the cytosol. *Biochem. J.* **344 Pt 1**, 39-46.
- Swarnakar,S., Temel,R.E., Connelly,M.A., Azhar,S., and Williams,D.L. (1999). Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. *J. Biol. Chem.* **274**, 29733-29739.
- Takahashi,S., Sakai,J., Fujino,T., Hattori,H., Zenimaru,Y., Suzuki,J., Miyamori,I., and Yamamoto,T.T. (2004). The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J. Atheroscler. Thromb.* **11**, 200-208.
- Takazawa,T., Yamauchi,T., Tsuchida,A., Takata,M., Hada,Y., Iwabuchi,M., Okada-Iwabuchi,M., Ueki,K., and Kadowaki,T. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist rosiglitazone increases expression of very low density lipoprotein receptor gene in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **284**, 30049-30057.
- Tao,H., Aakula,S., Abumrad,N.N., and Hajri,T. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR{gamma}) regulates the expression and Function of very low density lipoprotein receptor. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.*
- Terrand,J., Bruban,V., Zhou,L., Gong,W., El Asmar,Z., May,P., Zurhove,K., Haffner,P., Philippe,C., Woldt,E., Matz,R.L., Gracia,C., Metzger,D., Auwerx,J., Herz,J., and Boucher,P. (2009). LRP1 controls intracellular cholesterol storage and fatty acid synthesis through modulation of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **284**, 381-388.

- Tontonoz,P., Hu,E., Graves,R.A., Budavari,A.I., and Spiegelman,B.M. (1994). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8, 1224-1234.
- Tontonoz,P. and Spiegelman,B.M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 289-312.
- Tran,K., Thorne-Tjomslund,G., DeLong,C.J., Cui,Z., Shan,J., Burton,L., Jamieson,J.C., and Yao,Z. (2002). Intracellular assembly of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B100 in rat hepatoma McA-RH7777 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 31187-31200.
- Tsien,R.Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19, 2396-2404.
- Tuncman,G., Erbay,E., Hom,X., De,V., I, Campos,H., Rimm,E.B., and Hotamisligil,G.S. (2006). A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 6970-6975.
- Tzotzas,T., Desrumaux,C., and Lagrost,L. (2009). Plasma phospholipid transfer protein (PLTP): review of an emerging cardiometabolic risk factor. *Obes. Rev.* 10, 403-411.
- Uchiyama,A., Aoyama,T., Kamijo,K., Uchida,Y., Kondo,N., Orii,T., and Hashimoto,T. (1996). Molecular cloning of cDNA encoding rat very long-chain acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* 271, 30360-30365.
- Utermann,G. (1987). Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am. Heart J.* 113, 433-440.
- van't Hoof,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.
- Vassiliou,G. and McPherson,R. (2004a). A novel efflux-recapture process underlies the mechanism of high-density lipoprotein cholesteryl ester-selective uptake mediated by the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1669-1675.
- Vassiliou,G. and McPherson,R. (2004b). Role of cholesteryl ester transfer protein in selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by adipocytes. *J. Lipid Res.* 45, 1683-1693.
- Veniant,M.M., Zlot,C.H., Walzem,R.L., Pierotti,V., Driscoll,R., Dichek,D., Herz,J., and Young,S.G. (1998). Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice. *J. Clin. Invest* 102, 1559-1568.
- Vilella,E., Joven,J., Fernandez,M., Vilaro,S., Brunzell,J.D., Olivecrona,T., and Bengtsson-Olivecrona,G. (1993). Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins. *J. Lipid Res.* 34, 1555-1564.
- Von Eckardstein,A., Langer,C., Engel,T., Schaukal,I., Cignarella,A., Reinhardt,J., Lorkowski,S., Li,Z., Zhou,X., Cullen,P., and Assmann,G. (2001). ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages. *FASEB J.* 15, 1555-1561.
- Voshol,P.J., Rensen,P.C., van Dijk,K.W., Romijn,J.A., and Havekes,L.M. (2009). Effect of plasma triglyceride metabolism on lipid storage in adipose tissue: studies using genetically engineered mouse models. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 479-485.
- Wang,C.S., McConathy,W.J., Kloer,H.U., and Alaupovic,P. (1985). Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J. Clin. Invest* 75, 384-390.
- Weisgraber,K.H. (1990). Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J. Lipid Res.* 31, 1503-1511.
- Weisgraber,K.H., Innerarity,T.L., Rall,S.C., Jr., and Mahley,R.W. (1985). Apolipoprotein E: receptor binding properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 183, 159-171.
- 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.
- Wernette-Hammond,M.E., Lauer,S.J., Corsini,A., Walker,D., Taylor,J.M., and Rall,S.C., Jr. (1989). Glycosylation of human apolipoprotein E. The carbohydrate attachment site is threonine 194. *J. Biol. Chem.* 264, 9094-9101.
- Williamson,R., Lee,D., Hagaman,J., and Maeda,N. (1992). Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 7134-7138.

- 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.
- Windler,E., Chao,Y., and Havel,R.J. (1980). Determinants of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants in the rat. *J. Biol. Chem.* 255, 5475-5480.
- Windler,E. and Havel,R.J. (1985). Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J. Lipid Res.* 26, 556-565.
- Witters,L.A. and Kemp,B.E. (1992). Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 267, 2864-2867.
- Wolins,N.E., Quaynor,B.K., Skinner,J.R., Tzekov,A., Croce,M.A., Gropler,M.C., Varma,V., Yao-Borengasser,A., Rasouli,N., Kern,P.A., Finck,B.N., and Bickel,P.E. (2006). OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes* 55, 3418-3428.
- Wu,X., Zhou,M., Huang,L.S., Wetterau,J., and Ginsberg,H.N. (1996a). Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of ApoB-containing lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 271, 10277-10281.
- Wu,Z., Bucher,N.L., and Farmer,S.R. (1996b). Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol. Cell Biol.* 16, 4128-4136.
- Yagyu,H., Lutz,E.P., Kako,Y., Marks,S., Hu,Y., Choi,S.Y., Bensadoun,A., and Goldberg,I.J. (2002). Very low density lipoprotein (VLDL) receptor-deficient mice have reduced lipoprotein lipase activity. Possible causes of hypertriglyceridemia and reduced body mass with VLDL receptor deficiency. *J. Biol. Chem.* 277, 10037-10043.
- Ye,S.Q., Olson,L.M., Reardon,C.A., and Getz,G.S. (1992). Human plasma lipoproteins regulate apolipoprotein E secretion from a post-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* 267, 21961-21966.
- Young,S.G. and Fielding,C.J. (1999). The ABCs of cholesterol efflux. *Nat. Genet.* 22, 316-318.
- Yu,K.C. and Cooper,A.D. (2001). Postprandial lipoproteins and atherosclerosis. *Front Biosci.* 6, D332-D354.
- Yue,L. and Mazzone,T. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor {gamma} stimulation of adipocyte ApoE gene transcription mediated by the liver receptor X pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 10453-10461.
- Yue,L., Rasouli,N., Ranganathan,G., Kern,P.A., and Mazzone,T. (2004). Divergent effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists and tumor necrosis factor alpha on adipocyte ApoE expression. *J. Biol. Chem.* 279, 47626-47632.
- Zambon,A., Schmidt,I., Beisiegel,U., and Brunzell,J.D. (1996). Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins. *J. Lipid Res.* 37, 2394-2404.
- Zannis,V.I., Chroni,A., and Krieger,M. (2006). Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J. Mol. Med.* 84, 276-294.
- Zechner,R., Moser,R., Newman,T.C., Fried,S.K., and Breslow,J.L. (1991). Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content. *J. Biol. Chem.* 266, 10583-10588.
- Zhang,H., Links,P.H., Ngsee,J.K., Tran,K., Cui,Z., Ko,K.W., and Yao,Z. (2004a). Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment. *J. Biol. Chem.* 279, 2221-2230.
- Zhang,J.W., Klemm,D.J., Vinson,C., and Lane,M.D. (2004b). Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 279, 4471-4478.
- Zhou,H., Mak,W., Zheng,Y., Dunstan,C.R., and Seibel,M.J. (2008). Osteoblasts directly control lineage commitment of mesenchymal progenitor cells through Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 1936-1945.
- Zilberberg,A., Yaniv,A., and Gazit,A. (2004). The low density lipoprotein receptor-1, LRP1, interacts with the human frizzled-1 (HFz1) and down-regulates the canonical Wnt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 17535-17542.

Zimmermann,R., Strauss,J.G., Haemmerle,G., Schoiswohl,G., Birner-Gruenberger,R., Riederer,M., Lass,A., Neuberger,G., Eisenhaber,F., Hermetter,A., and Zechner,R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383-1386.

ANHANG

APOE-SEKRETION

Exp.	Tag 0	Tag 7	Tag 14
1	2,95	56,45	97,71
1	3,25	58,92	95,24
1	3,19	69,16	89,88
2	8,37	32,13	76,68
2	7,62	28,51	69,75
2	9,11	28,07	81,68
3	3,05	12,87	26,87
3	2,81	12,10	26,45
3	2,88	12,92	28,44

Anhang Tabelle 1. ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Adipozyten in den Zellkulturüberstand während des Differenzierungsverlaufs. Die ApoE-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und ist in ng/mg Zellprotein angegeben. Die ApoE-Konzentration variiert zwischen den einzelnen Experimenten trotz Normierung auf das Zellprotein durch unterschiedliche Differenzierungszustände der Adipozyten in den einzelnen Passagen und mit der Größe des gewählten Gebindes.

APOE-SEKRETION NACH INKUBATION MIT INSULIN UND ROSIGLITAZON

Exp.	Kontrolle	Insulin	Rosiglitazon
1	18,73	13,36	21,21
1	11,88	12,71	16,95
2	14,61	13,48	20,65
2	28,8	15,9	19,81

Anhang Tabelle 2. ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Adipozyten in den Zellkulturüberstand nach Inkubation mit 50 nM/mL Insulin und 1µg/mL Rosiglitazon. Die ApoE-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und ist in ng/mg Zellprotein angegeben.

APOE-SEKRETION NACH INKUBATION MIT LIPOSOMEN UND LPL

Exp.	Kontrolle	Insulin	Rosiglitazon
1	4,32	13,15	14,02
1	4,45	12,22	12,64
2	4,35	13,55	12,4
2	3,81	12,8	13,2

Anhang Tabelle 3. ApoE-Sekretion der hMSC-Tert Adipozyten in den Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Liposomen oder Liposomen zusammen mit aktiver Lpl. Die ApoE-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und ist in ng/mg Zellprotein angegeben.

APOE-SEKRETION NACH INHIBITION

Exp.	BFA	Colchicin	Cytochalasin D	BAPTA-AM	2-APB	H89
1	2,90	5,72	3,25	3,25	2,81	3,11
1	3,58	5,07	4,31	3,15	3,53	2,94
1	4,78	7,34	3,78	3,61	2,84	2,79
1	5,17	8,35	7,77	4,09	2,49	2,98
2	5,16	3,53	7,27	2,40	3,86	2,31
2	5,10	3,47	7,12	2,43	4,26	2,26
2	6,62	3,44	7,56	3,97	4,30	3,24
2	6,51	3,15	4,36	3,47	4,15	3,07
3	2,68	2,94	2,25	3,34	4,15	4,13
3	1,75	3,30	2,39	3,16	6,52	3,02
3	1,60	5,25	2,68	4,67	4,33	6,11
3	1,81	4,89	2,56	6,01	4,30	6,15

Anhang Tabelle 4. ApoE-Sekretion in den Zellkulturüberstand differenzierter hMSC-Tert Adipozyten nach 4 Stunden Inkubation mit den Inhibitoren BFA, Colchicin, Cytochalasin D, BAPTA-AM, 2-APB und H89. ApoE-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und ist in ng/mL angegeben.

APOE-SEKRETION NACH STIMULATION DURCH HDL UND APOAI

Exp.	Kontrolle	HDL	ApoAI
1	5,06	5,02	6,66
1	5,35	5,90	6,18
1	5,04	5,86	6,11
1	4,09	5,77	7,14
2	4,55	5,86	7,00
2	4,57	6,11	6,18
2	3,69	2,93	4,86
2	3,91	3,45	6,08
3	4,01	2,89	5,72
3	3,35	2,95	4,50
3	4,45	4,79	7,31
3	4,39	3,25	6,65

Anhang Tabelle 5. ApoE-Sekretion in den Zellkulturüberstand differenzierter hMSC-Tert Adipozyten nach 4 Stunden Inkubation mit 10 µg HDL und 10 µg ApoAI. ApoE-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und ist in ng/mL angegeben.

APOE-SEKRETION NACH INHIBITION UND STIMULATION DURCH APOAI

Exp.	BFA + ApoAI	Colchicin + ApoAI	BAPTA-AM + ApoAI	2-APB + ApoAI	H89 + ApoAI
1	3,89	3,43	5,44	4,04	4,16
1	3,30	4,06	5,58	4,82	3,72
2	3,05	3,98	5,20	6,37	4,83
2	3,24	4,40	5,26	6,75	3,93

Anhang Tabelle 6. ApoE-Sekretion in den Zellkulturüberstand differenzierter hMSC-Tert Adipozyten nach Inkubation mit 10 µg BFA, 100 µg Colchicin, 100 µg BAPTA-AM, 100 µg 2-APB und 100µg H89 und anschließender Stimulation der Sekretion durch 10 µg ApoAI. Nach 30 min Vorinkubation der Inhibitoren wurde das ApoAI hinzugefügt und die Zellen für weitere 4 Stunden inkubiert. ApoE-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und ist in ng/mL angegeben.

ADIPONEKTION-SEKRETION

Kontrolle	BFA	BAPTA-AM	H89
6,89	2,87	5,10	3,79
9,12	2,10	6,73	2,01

Anhang Tabelle 7. Adiponektin-Sekretion in den Zellkulturüberstand differenzierter hMSC-Tert Adipozyten nach 4 Stunden und nach Inhibition durch 10µg BFA, 100 µg BAPTA-AM und 100 µg H89. Die Adiponektin-Konzentraion wurde mittels ELISA bestimmt und ist in ng/mL angegeben.

Kontrolle + ApoAI	BFA + ApoAI	BAPTA-AM + ApoAI	H89 + ApoAI
10,04	2,39	7,71	1,98
8,61	2,10	5,20	1,63

Anhang Tabelle 8. Adiponektin-Sekretion in den Zellkulturüberstand differenzierter hMSC-Tert Adipozyten nach Inhibition durch 10µg BFA, 100 µg BAPTA-AM und 100 µg H89 und anschließender Stimulation der Sekretion durch 10µg ApoAI. Nach 30 min Vorinkubation der Inhibitoren wurden 10µg ApoAI hinzugefügt und für weitere 4 Stunden inkubiert. Die Adiponektin- Konzentraion wurde mittels ELISA bestimmt und ist in ng/mL angegeben.

DANKSAGUNG

Mein ganz herzlicher Dank geht an Frau Professor Ulrike Beisiegel und Herrn PD Dr. Jörg Heeren für die freundliche und persönliche Betreuung dieser Dissertation, für ihr stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit, vor allem aber für ihre Unterstützung und die Ermutigungen in den letzten Jahren. Herrn Professor Hans-Peter Mühlbach danke ich für die Übernahme des schriftlichen Zweitgutachtens.

Ein weiterer ganz herzlicher Dank geht an Sandra, Birgit und Dorte für ihre Hilfe bei den alltäglichen kleinen und großen Katastrophen und eine nie langweilige und immer fröhliche gemeinsame Zeit in unserer Mädchenbox. Ein großer Dank geht auch an meine Mitdoktoranden Olli, Alex, Karo und Britta für ihre stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die nette gemeinsame Zeit.

Außerdem vielen Dank an Matina, Rukiye, Netti und alle anderen aktuellen und ehemaligen Mitglieder des IBMII für die tolle Kollegialität und die nette Atmosphäre, in der das Arbeiten wirklich Spaß gemacht hat!

Ein besonderer Dank geht auch an meinen Freund Stefan, für seine Unterstützung, die Geduld und die vielen Ermutigungen, ohne die ich manchmal sicher verzweifelt wäre!