

Aus dem Institut für Molekulare Zellbiologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol., Dr. h.c. U. Beisiegel

**Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Stoffwechselwege
von Chylomikronen in Abhängigkeit der
unterschiedlichen Apo E Isoformen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Wolf Benjamin Kratzert

aus Lübeck

Hamburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 27. September 2004

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Frau Prof. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Herr Prof. Seedorf

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Herr Prof. Amling

*Für meine Familie
und
insbesondere für meine Schwester*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1-21
1.1. Der Lipoproteinstoffwechsel	1
1.1.1. Stoffwechsel der exogenen Lipide	2
1.1.2. Stoffwechsel der endogenen Lipide	4
1.2. Rezeptoren des Lipoproteinstoffwechsels.	7
1.2.1. LDL-Rezeptor Familie	8
1.2.2. Heparansulfat-Proteoglykane	11
1.3. Apolipoprotein E.	12
1.4. High Density Lipoprotein	17
1.5. Aufnahme und intrazelluläre Stoffwechselwege von Lipoproteinen	17
1.6. Ziel der Arbeit.	21
2. Material und Methoden	22-36
2.1. Geräte	22
2.2. Zellkultur.	23
2.3. Isolierung und Charakterisierung der Liganden.	24
2.3.1. VLDL-Isolierung.	24
2.3.2. HDL-Isolierung.	25
2.3.3. CM-Isolierung.	25
2.3.4. Proteinbestimmung	26
2.3.5. Cholesterin- und Triglyzeridbestimmung.	26
2.3.6. Markierung der Chylomikronen für Radioaktive Pulse-Chase Experimente	27
2.3.7. SDS-PAGE	27
2.4. Isolierung, Aufreinigung und Charakterisierung von Apolipoprotein E.	29
2.4.1. Isolierung und Aufreinigung von Apo E.	29
2.4.2. Apo E Isoformbestimmung.	31
2.5. Herstellung und Charakterisierung von Apo E isoformspezifischen CM.	33

2.6. Aufnahmeexperimente	33
2.6.1. IMF-Aufnahmeexperimente	33
2.7. Pulse-Chase Experimente zur Darstellung intrazellulärer Stoffwechselwege	35
2.7.1. Radioaktive Pulse-Chase Experimente	35
2.7.2. IMF Pulse-Chase Experimente	36

3. Ergebnisse **37-67**

3.1. Charakterisierung der verwendeten Liganden	38
3.1.1. Zusammensetzung der CM	38
3.1.2. Zusammensetzung der HDL	39
3.1.3. Herstellung von Apo E isoformspezifischen CM	41
3.2. Aufreinigung und Charakterisierung von Apolipoprotein E	43
3.2.1. Isoelektrische Fokussierung von Humanplasma	43
3.2.2. Aufreinigung von Apo E	44
3.3. Aufnahme von CM in Abhängigkeit der Apo E Isoformen	45
3.3.1. Immunfluoreszenz-Aufnahmeexperimente	45
3.4. Intrazelluläre Stoffwechselwege von CM in Abhängigkeit der Apo E Isoform	52
3.4.1. Radioaktive Pulse-Chase Experimente	52
3.4.2. IMF Pulse-Chase Experimente	60
3.5. HDL induziertes Recycling in Tangier-Fibroblasten	64
3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse	66

4. Diskussion **68-80**

4.1. Biochemische Charakteristika von Chylomikronen und Apolipoprotein E	68
4.2. Experimentelles System	70
4.3. Aufnahme und intrazelluläre Stoffwechselwege von Chylomikronen	72
4.4. HDL als extrazellulärer Akzeptor für recycelte Apolipoproteine und die Rolle des ABC-1 Transporters	75
4.5. Isoformspezifische Unterschiede des Apo E Recycling	78

5. Zusammenfassung	81-82
6. Literaturverzeichnis	83-102
7. Abkürzungsverzeichnis	103-104
8. Abbildungsverzeichnis	105-106
9. Danksagung	107
10. Lebenslauf	108
11. Erklärung	109

1. Einleitung

Einer der wichtigsten Bestandteile für den Menschen zum Überleben ist die tägliche Zuführung von Energie durch Nahrungsaufnahme. Die in der Nahrung enthaltenen Proteine, Kohlenhydrate und Lipide versorgen den Organismus mit aller benötigten Energie, um die vielfältigen physiologischen Funktionen aufrecht erhalten zu können.

Damit diese Nährstoffe biochemisch verwertet werden können, müssen sie über das Blutssystem den einzelnen Organen zugeführt werden.

1.1. Der Lipoproteinstoffwechsel

Durch ihre hydrophoben Eigenschaften müssen Cholesterin, Triglyzeride und andere Lipide zusammen mit speziellen Transportvehikeln, den sogenannten Lipoproteinen, durch das wässrige Milieu des Blutkreislaufes befördert werden, um dann an ihren Zielorganen Funktionen der Energiespeicherung, Wärmeisolation, Steroidhormonproduktion oder die als Zellmembranbausteine erfüllen zu können.

Lipoproteine sind sphärische Partikel in dessen hydrophoben Kern sich Cholesterinester und Triglyzeride befinden, welche von einer polaren Hülle aus Phospholipiden und freiem Cholesterin umgeben sind. Während die geladenen Phosphatgruppen der Phospholipide und die Hydroxylgruppen der Cholesterin-Moleküle mit dem sie umgebenden wässrigen Milieu interagieren können, orientieren sich die apolaren Fettsäuren der Phospholipide sowie die Sterolringe des Cholesterins zum Kern hin (Miller and Small, 1987). Mit der polaren Lipoproteinhülle assoziiert finden sich noch amphipathische Proteine, sogenannte Apolipoproteine, welche die physikochemischen Eigenschaften der Lipoproteine mit bestimmen.

Lipoproteine lassen sich in fünf verschiedene Klassen unterteilen, welche sich in ihrer Größe, Dichte, elektrischer Ladung sowie dem Gehalt und der Zusammensetzung in Bezug auf Lipid- und Proteinanteil unterscheiden (Gotto et al., 1986). Die moderne Unterteilung der Lipoproteine geschieht anhand ihrer Auftrennung in einem Kaliumbromid-Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation (Havel et al., 1955). Die größten Partikel mit der geringsten Dichte stellen die Chylomikronen (CM) dar, die als Transporter für exogen zugeführte Lipide fungieren. Ihnen folgen die Lipoproteine sehr geringer Dichte (Very

Low Density Lipoproteins, VLDL) für den endogenen Lipidtransfer, die Lipoproteine intermediärer Dichte (Intermediate Density Lipoproteins, IDL) und geringer Dichte (Low Density Lipoproteins, LDL), welche durch intravaskulär geschehende Modifikation von VLDL entstehen, und zuletzt die Lipoproteine hoher Dichte (High Density Lipoproteins, HDL), denen als zuständiges Lipoprotein für den Reversen Cholesterintransport aus der Peripherie zurück zur Leber eine physiologisch sehr entscheidende Aufgabe zukommt.

	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte (g/ml)	<0,96	0,96-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21
Durchmesser (nm)	80-1200	30-80	25-35	18-25	5-12
Molekulargewicht (kDa)	5-1000 x10 ³	10-80 x10 ³	5-10 x10 ³	2-3 x10 ³	65-386
Elektrophorese	keine Wanderung	pre-β	slow pre-β	β	α
Zusammensetzung (% der Masse)					
Triglyceride	86	55	23	6	4
Phospholipide	7	18	19	22	34
Cholesterin	5	19	38	50	18
Proteine	1-2	6-10	11	21	45-55
Apolipoproteine (Apo)	Apo A I, II, IV Apo B ₄₈ Apo C I, II, III Apo E	Apo B ₁₀₀ Apo C I, II, III Apo E	Apo B ₁₀₀ Apo C III Apo E	Apo B ₁₀₀	Apo A I, II Apo C I, II, III Apo E
Syntheseort	Darm	Leber	VLDL	VLDL	Darm/Leber

Tabelle 1: Physikalische Eigenschaften und Zusammensetzung der Lipoproteine

Die Daten zu den physikalischen Eigenschaften und Zusammensetzung der Lipide und Apolipoproteine von Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL und HDL sind der Literatur entnommen (Havel et al., 1955; Gotto et al., 1986; Kane et al., 1996). Die Mobilitäten sind entsprechend denen der Plasma α- und β-Globuline nach elektrophoretischer Auftrennung in einem nativen Agarosegel angegeben.

1.1.1. Stoffwechsel der exogenen Lipide

Nach Aufnahme mit der Nahrung werden bereits im Mund langkettige Triglyceride durch die pharyngeale Lipase hydrolytisch abgespalten. Im Magen geschieht dann die Abspaltung mittel- und kurzkettiger Fettsäuren von den Triglyceriden größtenteils durch die hierfür zuständige Magenlipase. Nach Assoziation mit Gallensäuren entstehen im oberen Pankreaslumen Emulsionen kleinerer Lipidtröpfchen, welche von der durch Gallensäure aktivierten Pankreaslipase schließlich in Di- und Monoglyzeride sowie freie Fettsäuren zerlegt werden (Dolphin, 1992). Zusammen mit Cholesterin und

Phospholipiden werden die 2-Monoglyzeride und die freien Fettsäuren in Form kleiner Mizellen zusammen gelagert, welche im Jejunum nach Dissoziation und Rückführung der Gallensäuren zur Leber (Enterohepatischer Kreislauf) über einen energieunabhängigen Prozess von den Enterozyten resorbiert und intrazellulär schnell wieder zu Triglyzeriden zusammengesetzt werden. Diese sofortige Reveresterung hält den Diffusionsgradienten aufrecht, der für einen energieunabhängigen Aufnahmeprozess notwendig ist (Tso and Balint, 1986).

Der in der Nahrung befindliche geringe Anteil veresterten Cholesterins wird hydrolytisch durch die pankreatische Cholesterinesterase in nicht verestertes Cholesterin umgewandelt und vermutlich über ein membranständiges Protein der Enterozyten in die Zelle transportiert (Thurnhofer et al., 1991).

Um nun unter Umgehung der Leber über den Ductus Thoracicus in den Blutkreislauf zu gelangen, werden die resynthetisierten Triglyzeride, das in den Enterozyten durch die Acyl-CoenzymA Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) reveresterte Cholesterin und Phospholipide zusammen mit den Apolipoproteinen Apo A-I, A-II, A-III und Apo B₄₈ zu Chylomikronen zusammengesetzt. Die individuelle Zusammensetzung variiert je nach aufgenommener Nahrung und als weitere Bestandteile finden sich noch fettlösliche Vitamine in den Partikeln. Apo B₄₈, das durch das ausschließlich in den Enterozyten exprimierte Enzym Cytosindeaminase prozessiert wird und somit exklusiv in den Chylomikronen vorhanden ist, stellt 48% des aminoterminalen Endes von Apo B₁₀₀ dar, welches in der Leber synthetisiert wird (Davidson et al.; 1995). Nachdem Apo B₄₈ im Lumen des endoplasmatischen Retikulums partiell lipidiert wurde, erfolgt eine Fusionierung mit triglyzeridreichen Lipidtropfen, katalysiert durch einen Enzymkomplex aus dem Triglyzerid-Transportprotein und der Proteindisulfid-Isomerase (Wetterau et al., 1992). Zuletzt erfolgt nun die Assoziation von Apo AI, A-II, A-III und Phospholipiden an diesen Komplex in den Golgi Zisternen, bevor die Chylomikronen durch Exocytose aus den Enterozyten in das Lymphsystem gelangen (Hussain et al., 1996; Kane, 1996).

Unmittelbar nach dem Eintritt in den Blutkreislauf verändert sich die Struktur der Chylomikronen zu Chylomikronen Remnants (CR) und somit auch deren physikochemischen Eigenschaften. Hierbei assoziieren Apo C-I, C-II, C-III und Apo E aus HDL mit den Chylomikronen und Apo A-I, A-II, A-IV und die Phospholipide werden an HDL abgegeben (Mahley and Hussain, 1991). Außer Apo C-II, welches als essentieller Kofaktor für die Lipoprotein-Lipase (LpL) fungiert, inhibieren alle C-Apolipoproteine die zelluläre Aufnahme von Lipoproteinen. Apo E dagegen steigert die Affinität der

Chylomikronen Remnants gegenüber den Lipoprotein-Rezeptoren der Leber (Beisiegel, 1995). Als weitere Modifikation kommt es zur Spaltung der in den Chylomikronen enthaltenen Triglyzeriden mittels der an den Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) gebundenen Lipoprotein-Lipase (LpL) (Eisenberg et al., 1992). Die hierbei freigesetzten Fettsäuren dienen zum einen der Reserve in Adipozyten und werden zum anderen direkt der β -Oxidation in der Herz- und Skelettmuskulatur zugefügt (Olivecrona et al., 1990). Die durch die erhöhte Konzentration freier Fettsäuren im Blut von den HSPG des fettsäureverwertendem Gewebes abgelöste LpL verbleibt dagegen nach dem hydrolytischen Prozess an den Chylomikronen-Remnants. Nach Anreicherung von CR an den Hepatozyten durch Bindung der LpL über leberzellassoziierte HSPG findet nun die abschließende Prozessierung durch die sich auch an HSPG gebundene Hepatische Lipase (HL) statt. Zusätzlich werden die CR mit aus den Hepatozyten frei sezernierten Apo E weiter angereichert. Über rezeptorvermittelte Endozytose können nun die Chylomikronen-Remnants von der Leber aufgenommen werden. Hierbei bindet das Apo E der CR an die hierfür verantwortlichen Rezeptoren, den LDL-Rezeptor und das LDL-Rezeptor-Related-Protein (LRP) (Beisiegel et al., 1989; Kowal et al., 1989; Willnow et al., 1994; Beisiegel, 1995), wobei LpL und die HL über Wechselwirkungen mit dem LRP unterstützend auf diesen Prozess einwirken.

1.1.2. Stoffwechsel der endogenen Lipide

Neben den von außen zugeführten Lipiden versorgt sich der menschliche Organismus zusätzlich über endogene Synthese von Triglyzeriden und Cholesterin. Für den Transport aus der Leber und die Versorgung des peripheren Gewebes besteht ein endogener Transportkreislauf, in dem vor allem die VLDL, als Analogon zu den für die exogenen Lipide verantwortlichen Chylomikronen, eine Hauptfunktion spielen. Sie werden von der Leber produziert und sekretiert und ähneln in der Synthese und Zusammensetzung sehr den Chylomikronen, außer dass sie an Stelle von Apo B₄₈ das Apolipoprotein Apo B₁₀₀ besitzen (Ginsberg, 1995). Während der intravaskulären Passage zwischen peripherem Gewebe und Leber werden die VLDL von der gleichen LpL hydrolysiert, welche für die Lipolyse der Chylomikronen verantwortlich ist. Hierbei entstehen aus den größeren VLDL 1-Partikeln zunächst kleinere VLDL 2-Partikel und letztlich die IDL (Griffin and Packard, 1994). Die VLDL 2-Partikel und die IDL werden größtenteils über Bindung des Apo E an LDL Rezeptoren und LRP in die Leber aufgenommen (Havel and Hamilton, 1988). Für die weitere Metabolisierung von IDL, die nicht in die Leber aufgenommen wurden, ist

hauptsächlich die HL und nur noch zu einem geringen Anteil die LpL verantwortlich (Rubinstein et al., 1985). Hierbei werden alle Apolipoproteine außer Apo B₁₀₀ abgegeben und Cholesterin-Ester vornehmlich aus HDL angereichert und es entsteht LDL. Der intravaskuläre Transfer Cholesterin-Ester von HDL auf LDL wird enzymatisch durch das Cholesterin-Ester-Transfer-Protein (CETP) gesteuert (Kunitake et al., 1992). Zirkulierendes LDL wird mit einer Halbwertszeit von zweieinhalb Tagen von hepatischen und nicht-hepatischen Geweben über rezeptorvermittelte Endozytose durch Erkennung des Apolipoprotein Apo B₁₀₀ von zelloberflächengebundenen LDL-Rezeptoren aus dem Blutkreislauf eliminiert (Brown and Goldstein, 1986). So erhält das Gewebe neben der geringen Eigensynthese genügend Cholesterin, um es als Hauptbestandteil von Membranen oder als Vorstufe zur Synthese von Steroidhormonen verwenden zu können (Kovanen et al., 1979). Um zu hohe intrazelluläre Cholesterinkonzentrationen zu vermeiden, wird die de novo Synthese und die rezeptorvermittelte Aufnahme durch Sterol-regulierte Bindungsproteine von den Zellen gesteuert (Brown and Goldstein, 1986).

Da die Zellen des menschlichen Organismus aber selbst nicht in der Lage sind Cholesterin abzubauen, besteht der einzige Weg zur Eliminierung in der Rückführung zur Leber und dortigen Ausscheidung über die Gallensäuren. Dieser umgekehrte Cholesterintransport geschieht, indem Zellen freies Cholesterin an die HDL abgeben, welche unter Vermittlung ihres oberflächenassoziierten Apolipoprotein A-I als Kofaktor von dem Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) intravasal erkannt und modifiziert werden (Kane, 1996; Ishida et al., 1990). Die von der LCAT synthetisierten Cholesterin-Ester können nun wieder über das oben erwähnte Enzym CETP auf andere Lipoproteine übertragen werden (Barter et al., 1982), oder sie werden im Kern der HDL zur Leber transportiert und dort über den hierfür zuständigen Scavenger-Rezeptor B1 (SR-B1) aufgenommen und dem enterohepatischen Kreislauf zugeführt (Acton et al., 1996).

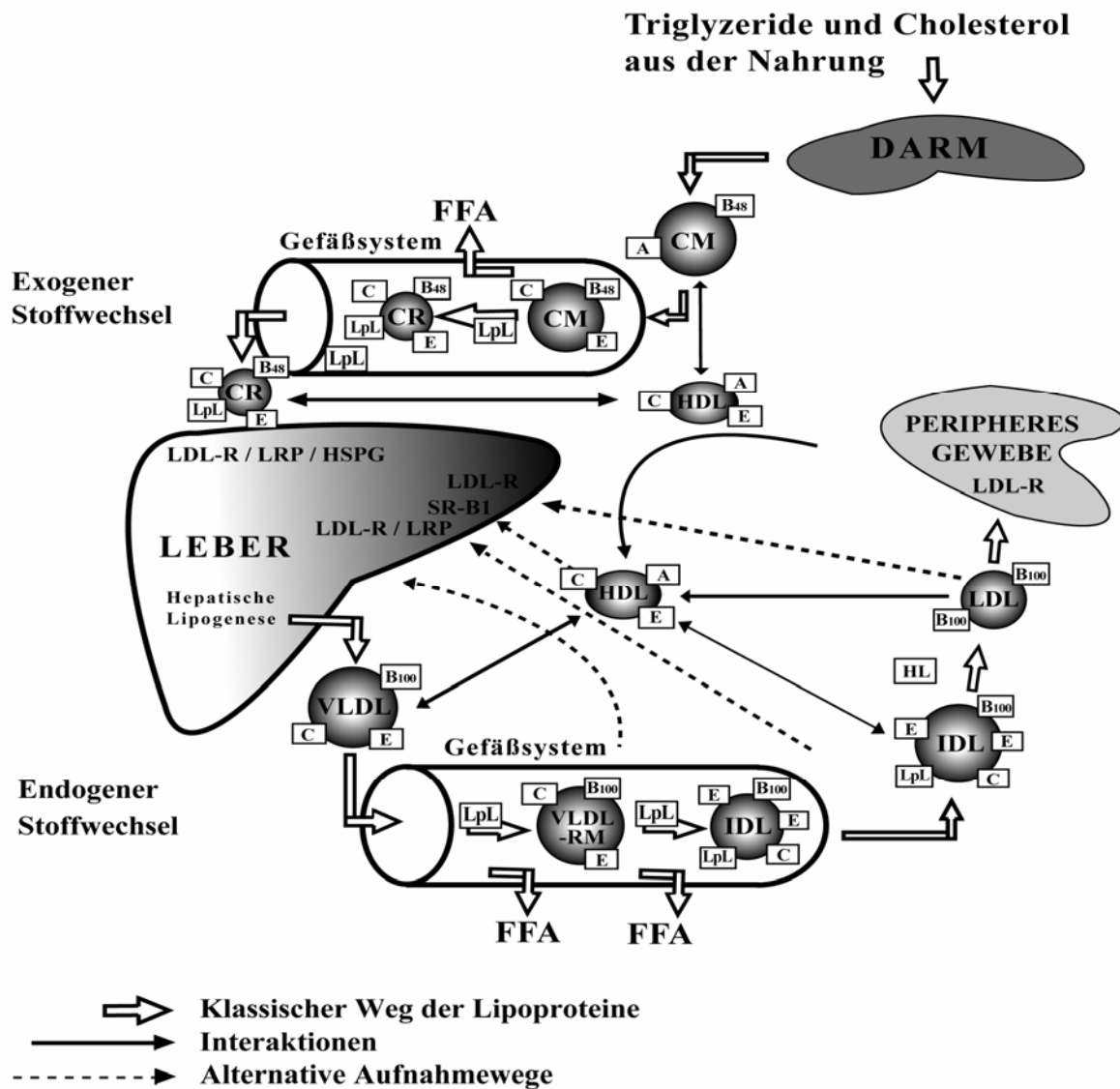


Abbildung 1: Exogener und endogener Stoffwechsel triglyzeridreicher Lipoproteine

Exogen zugeführte Lipide, werden nach Aufnahme in den Enterozyten mit Apo B₄₈ und Apo A-I zu Chylomikronen (CM) zusammengesetzt. Im Gefäßsystem erfolgt durch Apolipoproteinaustausch mit HDL und hydrolytischer Spaltung durch die endotelständige LpL die Modifizierung der Partikel zu Chylomikronen-Remnants (CR). Hierbei werden abgespaltene freie Fettsäuren (FFA) von fettsäureverwertendem Gewebe aufgenommen und zur gleichen Zeit erhalten die CM Apo C und Apo E von der HDL. Die so entstandenen CR können nun durch das LRP und den LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen werden. In der Leber synthetisierte VLDL, als Transporter des endogenen Lipoproteinstoffwechsel, enthalten neben Apo C und Apo E das Apo B₁₀₀. Durch LpL-Hydrolyse entstehen in der Blutbahn aus den VLDL, VLDL-Remnants und IDL, die durch LRP und den LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen werden oder durch die HL weiter zu LDL hydrolysiert werden. Bei diesem Prozess kommt es ständig zum Apolipoproteinaustausch zwischen den Remnant-Partikeln und der HDL und freie Fettsäuren werden aus den Lipoproteinen freigesetzt und ans umliegende Gewebe abgegeben. Die LDL werden schließlich entweder von peripherem Gewebe über LDL-Rezeptoren aufgenommen und versorgen es so mit benötigtem Cholesterin, oder sie können von der Leber internalisiert werden. Cholesterin des peripheren Gewebes gelangt nach Reveresterung mit der HDL über den Reversen Cholesterintransport zurück zur Leber, wo es durch den SR-B1-Rezeptor aufgenommen wird und im Anschluss über die Gallensalze aus dem Körper abgegeben werden kann. Als Alternative kommt es bei Cholesterinbedarf zur Übertragung dieses Cholesterins aus der HDL wieder auf Andere Lipoproteine.

1.2. Rezeptoren des Lipoproteinstoffwechsels

Um den zellulären Lipidbedarf zu regulieren und durch endozytotische Prozesse zu decken, bedarf es gut regulierter Wechselwirkungen zwischen den Zellen fettverwertenden Gewebes und den zirkulierenden Lipoproteinen. Für diese Prozesse sind hochaffine, an den Zelloberflächen befindliche Lipoprotein-Rezeptoren verantwortlich, von denen aus der Familie der LDL-Rezeptoren derzeit 7 Mitglieder bekannt sind. Der LDL-Rezeptor (Goldstein and Brown, 1974), das LRP (Herz et al., 1988), GP330 (Raychowdhury et al., 1989; Saito et al., 1994), der VLDL-Rezeptor (Takahashi et al., 1992), LR11 (Yamazaki et al., 1996) und LR8B (Novak et al., 1996) und der Apo E-Rezeptor 2 (Kim et al., 1996), welcher spezifisch im Gehirn exprimiert wird. Alle diese Rezeptoren besitzen als gleiche Grundstruktur 5 verschiedene Domänen. Sie gehören zu den single-pass-Transmembran-Glykoproteinen, die durch ein extrazelluläres aminoterminalen Ende und ein intrazellulär gelegenes Carboxyende definiert sind, welche über ein einzelnes Transmembransegment miteinander verbunden sind. Vom aminoterminalen Ende ausgehend, das für die Ligandenbindung verantwortlich ist (Russell et al., 1989), stellt sich die Struktur wie folgt dar: Die Sequenz der ersten 40 Aminosäuren (AS) ist reich an durch intramolekulare Disulfidbrücken verbundene Cysteine zwischen denen negativ geladene AS-Reste mit der hoch konservierten Sequenz Ser-Asp-Glu liegen. Diese werden aufgrund ihrer starken Ähnlichkeit mit einigen Komplementfaktoren auch als „complement type repeat“ bezeichnet.

Die sich anschließende als „EGF precursor homology domain“ bezeichnete zweite Domäne besteht aus einer wiederum cysteinreichen Sequenz, welche aufgrund ihrer Homologie zur Vorstufe des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), „growth factor repeats“ genannt wird. Diese werden durch Spacerregionen getrennt, die jeweils 5 Wiederholungen der AS-Sequenz Try-Trp-Thr-Asp (YWTD) enthalten. Der gesamten Region schreibt man heutzutage eine Beteiligung an der pH-abhängigen intrazellulären Dissoziation des Liganden zu (Davis et al., 1987).

Als dritte Domäne lässt sich eine AS-Sequenz von 18 Threonin- bzw. Serinresten zeigen, die O-glykosidisch gebundene Zuckerreste tragen („O-linked sugar domain“) und der eine Stützfunktion des Rezeptors innerhalb der Membran zugesprochen wird.

Das transmembranöse Segment, bestehend aus 22 hydrophoben AS, stellt die vierte Domäne dar. Sie verankert den Rezeptor in der Zellmembran.

Auf der Zytoplasma Seite gelegen befindet sich die fünfte Domäne, welche vom carboxyterminalen Ende des Rezeptormoleküls gebildet wird. Die sie bildenden 50 AS beinhalten die Sequenz Asp-Pro-Val-Tyr (NPXY), welche zum einen der Bindung des Rezeptors in sogenannten „coated pits (Stachelsaumgrübchen) dient und zum anderen am Recycling des Rezeptors beteiligt ist (Chen et al., 1990).

Trotz gemeinsamer Grundstruktur der Rezeptoren, lassen sich klare Unterschiede in der Zusammensetzung der Domänen, ihrer Ligandenspezifität und ihrer Verteilung im Gewebe zeigen.

Bevor genauer auf die einzelnen Rezeptoren der LDL-Familie eingegangen wird, sind noch die Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) zu erwähnen, die zwar nicht der LDL-Rezeptor Familie zugezählt werden und keine direkte Funktion der endozytotischen Aufnahme vermitteln, jedoch als essentieller Kofaktor hierfür eine wichtige Rolle spielen und somit auch als Rezeptor des Lipidstoffwechsels genannt werden müssen.

1.2.1. LDL-Rezeptor-Familie

LDL-Rezeptor (LDL-R)

Der am besten charakterisierte Rezeptor der Familie, zuständig für die Aufnahme und den Abbau von LDL, nimmt eine zentrale Position bei der Cholesterinhomöostase ein (Brown and Goldstein, 1986). Die Wichtigkeit wird verdeutlicht durch die Tatsache, dass unterschiedliche Mutationen im LDL-Rezeptor Gen, Ursache für die dominant vererbte familiäre Hypercholesterinämie (FH) sind (Hobbs et al., 1992). Bei dieser Fettstoffwechselerkrankung kommt es durch Akkumulation von Apo B₁₀₀-enthaltenden Lipoproteinen im Blut und deren Phagozytose durch Gewebsmakrophagen zunächst zur Bildung von Schaumzellen und nachfolgend zu atherosklerotischen Läsionen, die bis zum koronaren Herztod führen können (Brown and Goldstein, 1986).

An der Zelloberfläche fast aller Gewebe konzentrieren sich die LDL-Rezeptoren in von Clathrin umsäumten Bereichen der Plasmamembran, den sogenannten „Clathrin Stachelsaum-Grübchen“ (Anderson et al., 1977). Das aminoterminal Ende des Rezeptors besteht aus 7 Wiederholungen der Cystein-reichen „complement type repeat“-Domäne, in der gelegene Regionen negativer Ladung die Ligandenbindungsstelle für positiv geladene AS-Cluster von Apo B₁₀₀ und Apo E bilden. Hierbei besitzen Apo E-Moleküle aufgrund von Größen- und Strukturunterschieden eine höhere Affinität zum Rezeptor als Apo B₁₀₀ (Innerarity and Mahley, 1978).

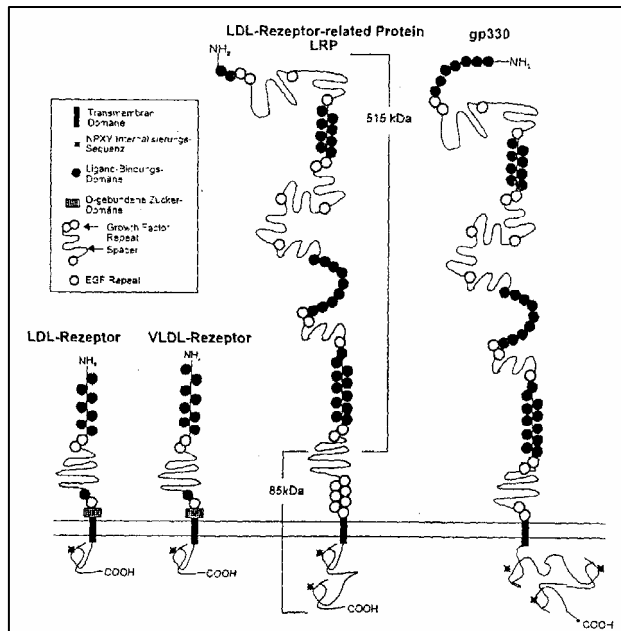
Neben bedeutenden Interaktion mit LDL spielt der LDL-Rezeptor auch eine Rolle für die Aufnahme von Chylomikronen und VLDL. In Tiermodellen mit LDL-Rezeptor-negativen-Mäusen (Yamada et al., 1988) oder LDL-Rezeptor-defizienten Kaninchen (Kita et al., 1981; 1982) konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von VLDL und CR deutlich verlangsamt ist. Hierbei kommt es jedoch nicht zur Akkumulation dieser Partikel im Blut, was auf einen weiteren Aufnahmemechanismus in der Leber spricht.

LDL-Rezeptor-Related-Protein (LRP)

Das LDL-Rezeptor-Related-Protein zeichnet sich im Gegensatz zum LDL-R durch eine größere Anzahl von Ligandenbindungsdomänen aus. Im Bereich der „complement type repeat“-Domäne lassen sich 31 Wiederholungen finden, welche in 4 Abschnitte organisiert sind. Des weiteren besitzt das LRP ein mit 100 AS doppelt so langes zytoplasmatisches Ende, das über zwei „NPXY“-Sequenzen in den coated pits lokalisiert ist. Die „O-linked sugar domain“ wird, anders als beim LDL-R, durch 6 EGF-ähnliche Wiederholungen ersetzt (Krieger and Herz, 1994).

LRP wird primär in den Parenchymzellen der Leber (Herz et al., 1988), Neuronalzellen des ZNS (Wolf et al., 1992) und Syncytiotrophoblasten der Plazenta (Jensen et al., 1988) exprimiert. Zusätzlich konnte die Synthese von LRP bei der Monozytendifferenzierung zu Makrophagen nachgewiesen werden, was Rückschlüsse auf eine pathophysiologische Rolle bei atherosklerotischen Läsionen zulässt (Watanabe et al., 1994; St Clair and Beisiegel, 1997). Im Lipoproteinstoffwechsel interagieren vor allem Apo E (Beisiegel et al., 1989), mit Apo E angereicherte VLDL (Chapell et al., 1994) bzw. β -VLDL (Kowal et al., 1989), LpL (Beisiegel et al., 1991; Chapell et al., 1992; Nykjaer et al., 1993; Krapp et al., 1995) und die hepatische Lipase (Nykjaer et al., 1993; Shafi et al., 1994; Ji et al., 1994; Krapp et al., 1996) mit dem LRP. Als multifunktionaler Rezeptor kann das LRP aber auch noch weitere Proteine binden. Hierzu gehören Proteasen (Bu et al., 1992), Proteasekomplexe (Moestrup and Gliemann, 1989; Ashcom et al., 1990), Thrombospondin-1 (Godyna et al., 1995), Laktoferrin (Willnow et al., 1992; Meilinger et al., 1995), Pseudomonas-Exotoxin A (Kounnas et al., 1992) und einige Rhinoviren (Hofer et al., 1994).

Die zentrale Rolle von LRP bei der Chylomikronen-Remnant Aufnahme der Leber in vivo konnte anhand von tierexperimentellen Versuchen mit Mäusen bestätigt werden. Durch leberspezifische Inaktivierung des LRP kam es zur Akkumulation von CR was als beweisend für die Funktion des LRP als Chylomikronen-Remnant-Rezeptor gilt



(Rohlmann et al., 1998).

Abbildung 2: Schematische Darstellung der LDL-Rezeptor-Gen Familie

Gezeigt sind die funktionellen Domänen des LDL-Rezeptors, des VLDL-Rezeptor, des LRP und des gp330/Megalin.

VLDL-Rezeptor (VLDL-R)

Dem LDL-R in Struktur und Sequenz sehr ähnlich, zeichnet sich der VLDL-Rezeptor durch eine zusätzliche Ligandenbindungsstelle aus. Diese 8 Wiederholungen der „complement type repeat“-Domäne binden aus dem Lipoproteinstoffwechsel vor allem VLDL, β -VLDL und IDL (Takahashi et al., 1992; Takahashi et al., 1995), aber auch CR (Niemeier et al., 1996) und LpL (Argraves et al., 1995), nicht aber LDL. Zusätzlich binden sie, wie auch das LRP, Proteasekomplexe (Argraves et al., 1995; Heegaard et al., 1995) und Thrombospondin-1 (Mikhailenko et al., 1997). Lokalisiert ist der VLDL-R vor allem auf Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Fettgewebe (Grafvels et al., 1993). Aufgrund der Ligandenspezifität und Gewebsverteilung lässt sich annehmen, dass der VLDL-R vor allem an dem Prozess der Energiespeicherung, vermittelt durch Bindung von triglyzeridreichen Lipoproteinen beteiligt ist (Yamamoto et al., 1995). Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass bei VLDL-R-defizienten Mäusen eine 15-20%ige Reduktion der Körpermasse, verursacht durch eine 50%ige Reduktion des Fettgewebes, beobachtet wurde (Frykman et al., 1995). In Leber und Dünndarm wird der VLDL-R

hingegen nur in geringen Mengen exprämiert, was eine Beteiligung an dem schnellen Entzug von Remnant-Lipoproteinen aus dem Blutkreislauf ausschließt.

Weitere Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie

Wie schon erwähnt, spielen noch weitere Rezeptoren eine Rolle im Lipoproteinstoffwechsel. Hierzu gehören unter anderem das Glykoprotein 330 (GP330), das dem LRP sehr ähnlich ist, zusätzlich aber noch Apo B₁₀₀ bindet (Stefansson et al., 1995). Exprimiert wird es vor allem in den proximalen Tubuli der Niere, wo es über Vermittlung der Aufnahme des Vitamin B₁₂-Transkobalamin Komplexes zur Vitamin B₁₂ Homöostase und Speicherung beiträgt, und im zentralen Nervensystem (Willnow et al., 1992). Des weiteren findet sich im Gehirn, der Plazenta und den Hoden noch ein Apo E Rezeptor 2 (Apo E-R2) und nur im Gehirn LR11, die beide als einzige bisher bekannten Liganden die Apo E-haltigen Lipoproteine binden.

1.2.2. Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG)

Ebenfalls essentiell für die Aufnahme von Lipoprotein-Remnants sind anionische, polymere Proteoglykane, welche auf der Oberfläche von Zellen lokalisiert sind und aufgrund ihrer Kernproteine als Heparansulfat-Proteoglykane bezeichnet werden (Ji et al., 1993; Mahley et al., 1994; Beisiegel and Heeren, 1997; Cooper et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Apo E (Ji et al., 1993; Ji et al., 1994) als auch LpL und HL die Bindung an HSPG vermitteln (Eisenberg et al., 1992; Ji et al., 1994). Zur Erklärung des physiologischen Mechanismus der Chylomikronen-Remnant Aufnahme wurde das sogenannte „Secretion-Recapture“-Modell entwickelt (Ji et al., 1994): Zuerst binden die auf der Leberzelloberfläche in den Disse-Raum hineinragenden HSPG die LpL-assoziierten Chylomikronen-Remnants aus dem Blutkreislauf. Während der Hydrolyse durch die HL werden die CR mit hepatozellulär-sekretiertem Apo E angereichert und anschließend mit Hilfe des LDL-R bzw. LRP von den Hepatozyten endozytiert.

Neben diesem Modell wurde in vitro noch ein Lipoprotein Rezeptor-unabhängiger Weg der CR-Aufnahme gezeigt (Fernandez-Borja et al., 1996; Sehayek et al., 1996). Dieser, anhand direkter Internalisierung vom CR durch HSPG verlaufende Prozess trägt aber aufgrund seiner geringen Geschwindigkeit nur in geringem Maße zur Gesamt-Aufnahme bei.

1.3. Apolipoprotein E (Apo E)

Das für die Homöostase triglyzeridreicher Partikel eine wichtige Rolle spielende Apolipoprotein E wurde zum ersten Mal 1973 als ein Apolipoprotein mit hohem Anteil von Arginin-Resten beschrieben (Shore and Shore, 1973).

Rolle im Lipidstoffwechsel

Als ein zentraler Ligand von CR, VLDL, VLDL-Remnants und IDL spielt Apo E eine entscheidende Rolle bei der Bindung dieser Partikel an Lipoprotein-Rezeptoren und der hierdurch vermittelten Internalisierung in die Zelle. Dies kann auf bisher drei bekannten Wegen geschehen. Der „klassische Weg“ besteht in der direkten Interaktion von Apo E mit dem LDL-Rezeptor und hieraus folgender endozytotischen Aufnahme (Brown and Goldstein, 1986; Mahley and Rall, 1995). Alternativ kann Apo E an das zelloberflächenassoziierte HSPG binden (Ji et al., 1993; 1994). So gebundene Remnants werden final durch die HL prozessiert und mit sekretierten Apo E angereichert, um anschließend über das LRP allein oder als LRP-HSPG-Komplex in die Hepatozyten aufgenommen zu werden. Die dritte Möglichkeit der Lipoproteinaufnahme der Leber besteht in der Apo E-vermittelten eigenständigen Aufnahme von Lipoproteinen durch HSPG (Fuki et al., 1997; Ji et al., 1998; Mahley et al., 1999).

Genlokus und Synthese von Apo E

Neun Jahre nach der erstmaligen Beschreibung von Apolipoprotein E gelang es das Protein zu sequenzieren (Rall et al., 1982) und kurze Zeit später als Nukleotidsequenz dessen zu bestätigen (Mc Lean et al., 1984). Vor allem in den Chylomikronen, VLDL und HDL vorhanden, liegt der Apo E Plasmaspiegel eines gesunden Menschen zwischen 30-50 µg/ml. Mit 90% der Apo E-Gesamtbildung stellt die Leber den Hauptsyntheseort für Apo E dar. Zusätzlich konnte noch in Astrozyten des Gehirns (Elshourbay et al., 1985), den Makrophagen (Basu et al., 1992) und in der Niere und Nebenniere (Zannis et al., 1981) eine Apo E-Synthese nachgewiesen werden, was für weitere Funktionen außerhalb des Lipoproteinstoffwechsels spricht.

Molekularbiologisch ließ sich das Apo E Gen auf Chromosom 19 lokalisieren, wo es sich in einem Cluster zusammen mit Apo C-I, Apo C-II und Pseudo-Apo C-I befindet (Olaisen et al., 1982; Lauer et al., 1989).

Die endogene Synthese in den Ribosomen erfolgt aus dem sogenannten „pre-Apo E“, einer primären Sequenz von 317 AS. Hieraus entsteht an der luminalen Seite des rER nach Abspaltung einer 18 AS langen Signalsequenz vom N-terminalen Ende das 299 AS lange und 34 kDa schwere Protein, welches folgend noch mit Neuramsäure modifiziert wird (Jain et al., 1979; Zannis et al., 1984). Über Exozytose aus den Hepatozyten und Assoziation des sekretierten Apo E mit CR, VLDL-R oder HDL/HDL-Vorstufen im Disse-Raum gelangt das Protein in den Lipoproteinstoffwechsel. Während die Synthese von Apo E in Vitro durch verschiedene Elemente an der Promoterregion induziert werden konnte (Smith et al., 1989), stimulieren β -VLDL und Cholesterin (Basu et al., 1982; Pullinger et al., 1989) neben Wachstums- und Schilddrüsenhormonen (Oscarsson et al., 1994; Vandenbrouck et al., 1994; Sjöberg et al., 1994) die Sekretion in den Hepatozyten und Makrophagen.

Biochemische Struktur des Apo E

Strukturell wie auch funktional lässt sich das Apo E Molekül in zwei Domänen unterteilen, ein aminoterminales und ein carboxyterminales Ende, die über eine sogenannte „hingeregion“ miteinander verbunden sind (Wetterau et al., 1988). Das aminoterminal Ende mit 191 AS (Residuen 1-191) enthält die Rezeptorbindungsregion in Form von 4 α -Helices (Wilson et al., 1991), welche eine positive Ladung besitzen und mit der „complement type“-Domäne des LDL-Rezeptors interagieren können (Weisgraber et al., 1987; Aggerbeck et al., 1988; Mahley, 1988). Bestätigt wurde die Funktion dieser Region durch

Versuche, in denen gezeigt werden konnte, dass negativ geladene Moleküle wie z.B. Heparin (Weisgraber et al., 1987) oder positiv geladene Substanzen (Brown et al., 1978) und Acetylierungen bestimmter AS-Reste (Mahley, 1983) zu einer Unterdrückung der Bindung von Apolipoproteinen an den LDL-R führte. Des weiteren konnte auch eine Interaktion von Apo E mit LRP bestätigt werden (Beisiegel et al., 1989).

Die Bindung des Apo E an die Lipoproteine wird über amphipathische Strukturen in dem aus 83 AS (Residuen 216-299) bestehenden carboxyterminalen Ende vermittelt. Diese Region ist auch für die Heparinbindung zuständig (Weisgraber et al., 1990).

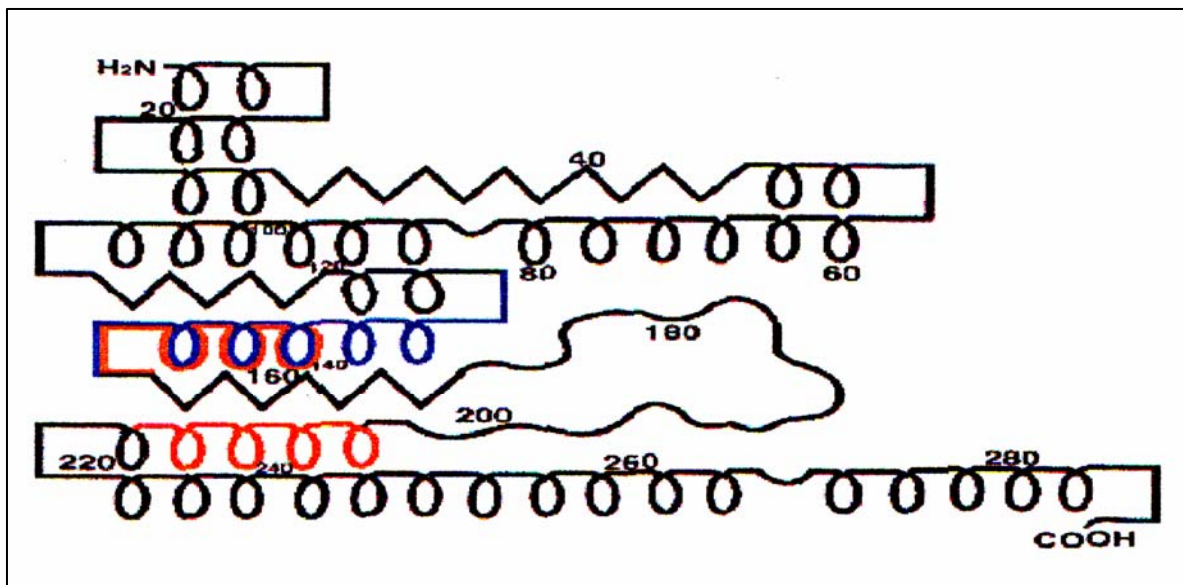


Abbildung 3: Sekundärstruktur des Apo E nach Mahley (Mahley et al., 1989)

Gezeigt ist die Sekundärstruktur des Apo E im zweidimensionalen Modell mit den Bindungsstellen für den LDL-Rezeptor (Blau) und für Heparin (Rot).

Apo E Isoformen

Durch isoelektrische Fokussierung sind drei Apo E-Isoformen im Western Blot nachweisbar (Utermann et al., 1977). Es lassen sich die 3 Hauptformen Apo E2, Apo E3 und Apo E4 unterscheiden, welche durch genetisch determinierten Polymorphismus (Innerarity and Mahley 1978; Innerarity et al., 1984) aus den drei unabhängigen Allelen $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ gebildet werden. Die Allelfrequenz in der Bevölkerung ist unterschiedlich verteilt; so tritt $\epsilon 3$ mit einer Häufigkeit von 70-85%, $\epsilon 4$ mit einer von 12-18% und $\epsilon 2$ mit einer von 3-12% auf (Zannis et al., 1982). Entsprechend dieser Verteilung spricht man von $\epsilon 3$ als Normalform, während $\epsilon 2$ und $\epsilon 4$ zu den Varianten gehören. Entsprechend genetischer Regeln existieren neben den drei homozygoten Formen ($E_{2/2}$, $E_{3/3}$, $E_{4/4}$) drei heterozygote Phänotypen ($E_{2/3}$, $E_{2/4}$, $E_{3/4}$). Auf molekularer Ebene unterscheiden sich die

Isoformen durch Austausch einer AS. Während beim Wildtyp E_{3/3} als normale AS-Sequenz an der Position 112 die AS Cystein und an Position 158 Argigin vorkommt (Cys¹¹²; Arg¹⁵⁸), weist Apo E_{2/2} einen Austausch der AS Arg an Position 158 durch Cys (Cys¹¹²; Cys¹⁵⁸) und Apo E_{4/4} einen der AS Cys an Position 112 durch Arg (Arg¹¹²; Arg¹⁵⁸) auf (Zannis et al., 1982; Beisiegel et al., 1992).

Dieser Austausch von AS hat pathophysiologisch einen entscheidenden Einfluss auf den Lipidstoffwechsel. So weisen Patienten mit Dysbetalipoproteinämie als homozygote Apo E2 Träger eine erhöhte VLDL- und Chylomikronen-Remnant Plasmakonzentration auf bei gleichzeitig stark erniedrigtem Serumcholesterin- und LDL-Spiegel. Verursacht werden diese Veränderungen durch eine deutlich verringerte Affinität des Apo E2 zum LDL-R und zum LRP aufgrund Konformationsveränderungen in der Bindungsdomäne des Proteins (Havel et al., 1980). Dadurch werden CR des exogenen und VLDL-Remnants des endogenen Stoffwechselweges in geringerem Maße in die Hepatozyten aufgenommen, womit die Konzentration dieser Partikel im Plasma steigt und die Patienten einen erhöhten Serum-Fettsäure-Spiegel der oben genannten triglyzeridreichen Lipoproteine aufweisen. Als Ursache der verringerten LDL-Konzentration diskutiert man derzeit zwei mögliche Prozesse. Zum einen kommt es durch hohe Apo E-Oberflächenkonzentrationen der Partikel und stark verringerten Apo C-II Anteilen zu einer verringerten Aktivität der LpL und somit auch zur verringerten Hydrolyse von VLDL zu IDL (Huang et al., 1998). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Apo E2 Patienten eine verringerte Stimulation der HL besitzen (Mahley et al., 1999), wodurch der hydrolytische Schritt von IDL zu LDL eingeschränkt ist und es zu einem Absinken der LDL-Konzentration bei gleichzeitigem Anstieg der VLDL-Konzentration kommt. Auf die verringerte LDL-Konzentration reagiert die Leberzelle mit der Hochregulation der LDL-R-Expression, wodurch noch mehr LDL dem Kreislauf entzogen wird. Dieser Mechanismus ist auch der Grund, weshalb dem Apo E2-Allel ein kardioprotektiver Effekt zugeschrieben wird. Allerdings entwickeln 5% der Patienten mit homozygoten Apo E2-Allel eine Typ-III-Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson, was vermutlich auf eine residuale Bindungsaktivität des Apo E2 zum LDL-R bzw. LRP oder auf eine nicht verminderte Heparinbindung zurückzuführen ist (Beisiegel, 1992; Mahley, 1996) und die zu einer massiven Erhöhung von VLDL und IDL im Plasma führen. Da diese Partikel hohe Atherogenität besitzen, entwickeln diese Patienten eine vorzeitige Atherosklerose der Koronargefäße und peripheren Gefäße (Havel et al., 1982; Brewer et al., 1983).

Das homozygote Apo E4-Allel dagegen ist mit hohen LDL-Cholesterinspiegeln und somit der Hypercholesterinämie assoziiert (Davignon et al., 1988; Hallman et al., 1991). Als Ursache hierfür wird angenommen, dass das Apo E4 aufgrund seiner veränderten Konformation eine stärkere Affinität zu VLDL besitzt als Apo E2 und Apo E3, die vornehmlich mit HDL interagieren. Die hierdurch verursachte erhöhte Konzentration des zelloberflächenassoziierten Apolipoprotein steigert einerseits die Aufnahme der VLDL-Remnants in die Leberzellen andererseits aber auch den Abbau zu IDL/LDL. Erhöhte LDL-Spiegel führen letztlich zu einer down-regulation der LDL-R und somit zur weiteren Erhöhung des LDL-Cholesterins, was letztlich auch als Prädisposition atherosklerotischer Veränderungen gilt.

Weitere Funktionen

Eine weitere wichtige Bedeutung kann dem Apo E auf neurobiologischer Ebene nachgewiesen werden. Neben der zentralen Rolle Apo E-haltiger Lipoproteinen bei der Lipidverteilung im Gehirn (Pitas et al., 1987) zeigen Versuche mit Ganglion-Neuronen in vitro eine Beteiligung des Apo E an den Wachstumseigenschaften und Geschwindigkeit dieser Zellen (Handelsmann et al., 1992; Mahley and Pitas, 1995). Hierbei nahm nach Verletzung der peripheren Nervenendigungen die Apo E-Konzentration in den Neuronen initial drastisch zu, so dass eine Beteiligung des Apo E an neuronalen Regenerationsprozessen als wahrscheinlich angenommen wird (Müller et al., 1985; Ignatus et al., 1986). Des weiteren wurde eine Beteiligung des homozygoten Apo E-4-Allel an neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer (AD) und der Creutzfeld-Jakob Krankheit nachgewiesen (Namba et al., 1991). Dabei zeigen Studien, dass die Frequenz des homozygoten Apo E-4-Allels bei Alzheimer-Patienten gegenüber der Normalbevölkerung dreifach erhöht ist (Stritmatter et al., 1993; Corder et al., 1993). Eine spezifische Assoziation wurde zur familiären „late-onset“ und der sporadischen Alzheimer Erkrankung gefunden (Saunders et al., 1993; Corder et al., 1993), bei denen Apo E_{4/4} mit der Pathogenese der beiden hierfür charakteristischen neuropathologischen Strukturen, den extrazellulären β -Amyloid-Plaques und den intrazellulär Mikrotubulus-assoziierten Proteins „Tau“, in Zusammenhang gebracht werden konnte (Weisgraber et al., 1994).

1.4. High Density Lipoprotein (HDL)

Wie oben erwähnt nimmt die HDL eine Schlüsselposition im Reversen Cholesterintransport ein und trägt in diesem Rahmen auch zu Austausch- und Übertragungsprozessen von Apolipoproteinen innerhalb der Lipoproteinklassen bei.

Es lassen sich drei wichtige Untergruppen der HDL benennen (HDL_E , HDL_2 , HDL_3), die sich neben Lipid- und Apolipoproteinmuster auch in ihrer Funktion voneinander unterscheiden. Hierbei stellt HDL_E eine mit Apolipoprotein E angereicherte Form der HDL dar, die über LDL-R oder spezielle HDL-R in die Leber aufgenommen werden kann.

Als sogenannte naszierte HDL entstehen diskoidale Vorläufer-Partikel im Dünndarm und der Leber. Im Gegensatz zu den intestinal gebildeten naszierten HDL, die vor allem aus Apo A-I und Apo A-VI bestehen, enthalten die in der Leber synthetisierten Vorläufer-HDL Apo A-I, Apo A-II und Apo E. Nach Absorption von Cholesterin aus Membranen der peripheren Zellen oder dessen Übertragung aus anderen Lipoproteinen und nachfolgender Veresterung durch die LCAT entstehen schließlich die größeren sphärischen HDL-Partikel. Diese transportieren die Cholesterinester aufgrund deren hydrophoben Eigenschaften im Kern und akzeptieren im weiteren Verlauf des Stoffwechsels Apolipoproteine auf ihrer Oberfläche, die entweder bei der rezeptorvermittelten Aufnahme in die Leber eine Rolle spielen oder im Rahmen des ständigen Apolipoproteinflusses wieder auf andere Lipoproteinfraktionen übertragen werden können.

1.5. Aufnahme und intrazelluläre Stoffwechselwege von Lipoproteinen

Zur weiteren Verstoffwechselung der im Kern enthaltenen Lipide müssen Lipoproteine von den jeweiligen lipidverwertenden Zellen über rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert werden. Dieser Prozess findet in hierfür spezialisierten Bereichen der Zelloberfläche statt, den coated pits (Stachelsaumgrübchen). In diesen Regionen liegen einige Rezeptoren, wie z.B. der LDL-R, in besonders hohen Konzentrationen vor (Anderson et al., 1977) und es kann so ein kontrollierter Transport der Ligand-Rezeptor-Komplex enthaltenen, abgeschnürten Membranvesikel stattfinden. Da dem zytoplasmatischen Anteil der coated pits über Adaptive Clathrin-Einheiten assoziiert sind, entstehen bei der Einstülpung der Membran Clathrin umhüllte Vesikel sogenannte

„Clathrin coated vesicles“. Der Prozess des Abschnürens erfordert Energie in Form von ATP und wird von der GTPase Dynamin katalysiert (Schmid and Carter, 1990; Hinshaw and Schmid, 1995).

Intrazellulär kommt es zunächst über ein spezielles, ATP-abhängiges „Uncoating Enzym“ zur Dissoziation des Clathrinmantels (Rothman and Schmid, 1986) und anschließender Fusionierung des Vesikel mit einem größeren Sortierungs-Endosomen (Helenius et al., 1983). Die von hier aus folgenden partikelspezifischen, intrazellulären Stoffwechselwege der Ligandenbestandteile werden durch ihre jeweiligen strukturellen Eigenschaften bestimmt. Basis hierfür ist die differente Ansäuerung der verschiedenen endosomalen Kompartimente durch ATP-abhängige Protonenpumpen (Nelson, 1992). Während der klassisch beschriebene Abbauweg von endozytierten Komplexen in der Weiterleitung zu Lysosomen und dortigen hydrolytischen Degradierung besteht (De Duve and Wattiaux, 1966), werden in den meisten Systemen die Rezeptoren jedoch auf Recycling-Wegen zur Plasmamembran zurücktransportiert (Mukherjee et al., 1997). Diese Systeme lassen sich anhand des gut beschriebenen Endozytoseweges der LDL verdeutlichen (Goldstein et al., 1985). Hierbei induziert der erniedrigte pH-Wert, wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung in der „EGF-type-domain“ des LDL-Rezeptors (Davis et al., 1987), eine Dissoziation des LDL vom Rezeptor, weshalb das sortierende Endosom auch als „compartment of uncoupling receptor and ligand“ (CURL) bezeichnet wird. Während die Rezeptoren sich in tubulären Auswüchsen des Endosomen sammeln, um kurz darauf durch Abschnürung von Vesikeln zur Oberfläche zurück transportiert zu werden (Brown et al., 1983), nehmen die LDL den Weg der intrazellulären Degradation. Durch weitere pH Absenkung entstehen aus den sortierenden Endosomen prälysosomale Endosomen die folgend mit Lysosomen verschmelzen (Stoorvogel et al, 1991; Dunn and Maxfield, 1992), in denen dann der Protein- und der Lipidanteil hydrolytisch gespalten wird. So werden Amino- und Fettsäuren dem Intermediärstoffwechsel zugeführt (Goldstein and Brown, 1974), während freiwerdendes Cholesterin entweder in Membranen eingebaut (Tabas, 1995) oder in cytosolischen Lipidtröpfchen gespeichert werden können (Brown et al., 1975).

Es wurde jedoch auch beobachtet, dass einige Lipoproteinpartikel in einem weiteren, als Retroendozytose bezeichneten Prozess, verstoffwechselt werden können (Greenspan and St Clair, 1984; Alam et al., 1989; Kambouris et al., 1990). Bei diesem für LDL- und HDL-Partikel beschriebenen Prozess erfolgt keine Trennung der Lipoproteinpartikel vom Rezeptor im CURL, sondern sie erscheinen als weitgehend intakte Lipoproteine wieder an

der Oberfläche der Zelle. Welche intrazelluläre Kompartimente hierfür eine Rolle spielen, konnte noch nicht ausreichend geklärt werden.

Ähnliche Wege konnten kürzlich auch für Apolipoproteine tryglizeridreicher Partikel beschrieben werden. So zeigten Versuche mit tryglizeridreichen Lipoproteinen in Hepatomazellen, dass 60% der aufgenommenen Partikel nach gewisser Zeit wieder an spezielle Akzeptoren im Medium (HDL) abgegeben wurden (Heeren, 1999). Bei den sezernierten Apolipoproteinen handelte es sich vor allem um Apo C und Apo E.

Es wird angenommen, dass Apo E durch seine unterschiedlichen und komplexen Bindungsmöglichkeiten nur teilweise in den Sortierungs-Endosomen vom Lipoprotein-Rezeptor dissoziiert. Somit gelangt Apo E zusammen mit Apo C und der LpL über die oben beschriebenen tubulären Abschnürungen über peripher lokalisierte endosomale Kompartimente zurück an die Oberfläche, um dort wieder in den Lipoproteinstoffwechsel funktional einzugreifen.

Andere Apolipoproteinanteile der tryglizeridreichen Lipoproteine, so das Apo B_{48/100}, werden wahrscheinlich ähnlich den Lipidanteilen über den Weg der lysosomalen Spaltung abgebaut (Heeren, 1999).

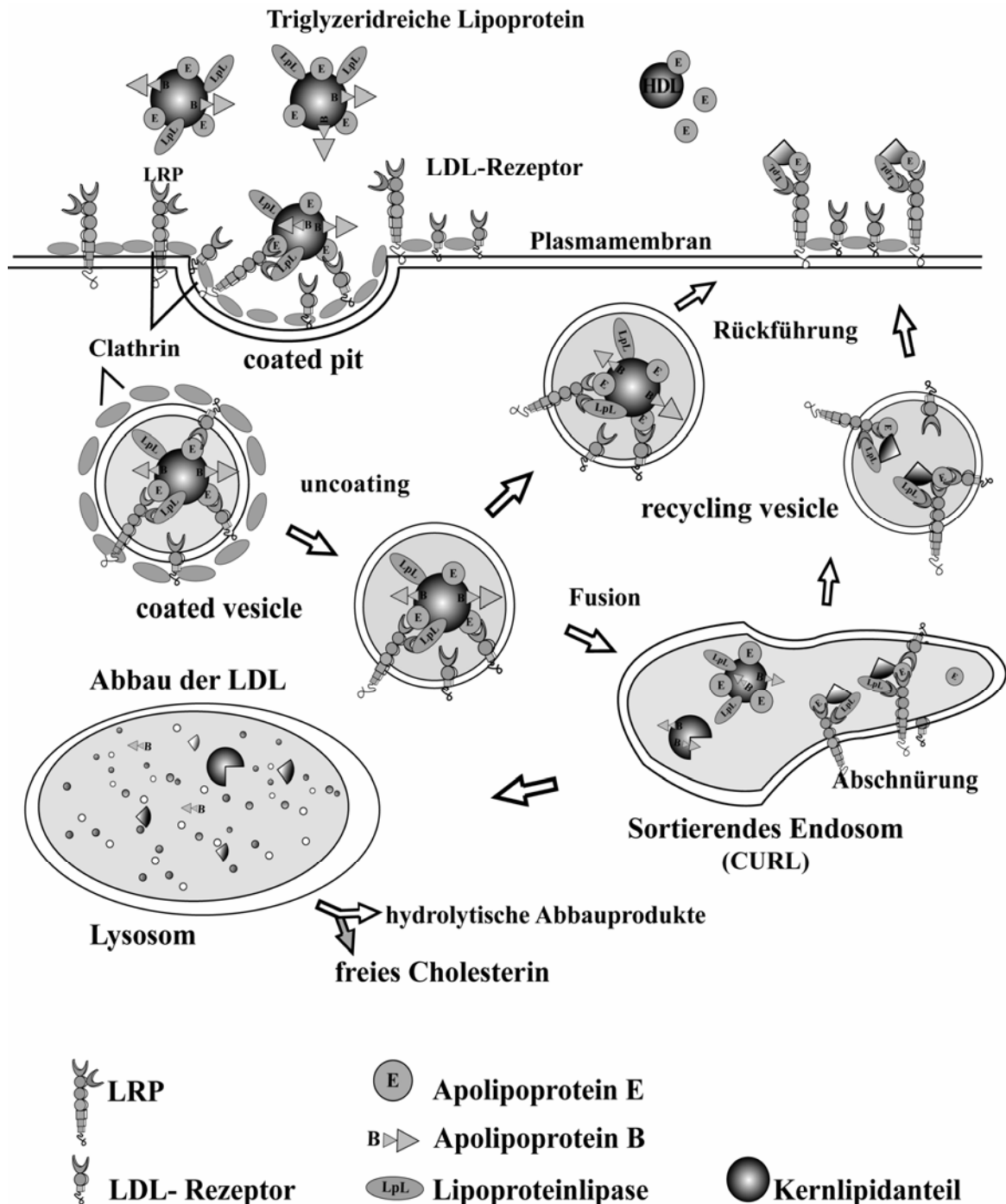


Abbildung 4: Intrazellulärer Metabolismus von triglyzeridreichen Lipoproteinen

Durch Bindung des Apo E und der LpL der Triglyzeridreichen Lipoproteine an das LRP bzw. den LDL-Rezeptor können diese über rezeptorvermittelte Endozytoseprozesse in die Leber aufgenommen werden. Nach Fusion mit sortierenden Endosomen kommt es durch pH-Wert-Erniedrigung zur Dissoziation von Apolipoprotein-Rezeptor-Komplexen von Apo B-assoziierten Kernlipidkomplexen. Hierbei werden die Apo B-Lipid-Komplexe in perinukleären Lysosomen vollständig degradiert und die Abbauprodukte erneut in den Stoffwechsel eingeschleust oder als Zellbestandteile verwertet. Der LDL-Rezeptor gelangt dagegen im Komplex mit LRP und Apo E in sogenannten Recycling-Endosomen zurück in die Zellperipherie, wo sie durch tubuläre Abschnürungen wieder an die Zelloberfläche transportiert werden. Dort wird Apo E durch Assoziation mit HDL erneut in den Lipoproteinstoffwechsel eingeschleust, während die Rezeptoren wieder zur Endozytose von Remnant-Partikeln zur Verfügung stehen (Nach Heeren, 1998)

1.6. Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren ist die zentrale Position des Apolipoprotein E im Lipoproteinstoffwechsel immer deutlicher geworden. Neben der Funktion bei der Aufnahme triglyzeridreicher Partikel konnte gezeigt werden, dass genetisch bedingte Abweichungen in der AS-Sequenz mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert sind. So korreliert die Isoform Apo E_{2/2} positiv mit dem Auftreten der Hyperlipoproteinämie Typ III nach Fredrickson und mit Gefäßerkrankungen, was pathophysiologisch auf veränderte Bindungsaffinitäten zu den Rezeptoren zurückgeführt wird. Apo E_{4/4} dagegen lässt sich mit der Hypercholesterinämie und der zerebralen Alzheimer Krankheit in Verbindung bringen. Es wird angenommen, dass dies durch veränderten intrazellulären Metabolismus verursacht wird.

Genaue Untersuchungen zum Apo E Stoffwechsel und Recycling wurden in Hepatomazellen in vitro und vivo durchgeführt (Heeren, 1999; Fazio et al., 1999).

Vermutliche intrazelluläre Akkumulation der Apo E Isoformen konnten kürzlich in Immunfluoreszenz (IMF) Versuchen mit Apo E angereicherten VLDL in Hepatomazellen beschrieben werden (Steinwälder, 2002). Hierbei zeigte sich, dass in abnehmender Reihenfolge Apo E_{4/4}, E_{3/3} und E_{2/2} in der Zellperipherie angereichert wird.

Diese intrazelluläre Akkumulation in Abhängigkeit der Isoformen Apo E_{2/2}, E_{3/3} und E_{4/4} soll nun anhand von Aufnahme- und Recycling-Versuchen mit Apo E angereicherten Chylomikronen in Hepatomazellen der Zellreihe HUH7 und in humanen Hautfibroblasten weiter untersucht werden. Des weiteren soll untersucht werden, welchen Einfluss das cholesterinreiche Lipoprotein HDL als extrazellulärer Akzeptor auf das Recycling von Apo E nimmt.

Nach genauer Charakterisierung der CM als Liganden und der HDL als Akzeptor und Isolierung und Aufreinigung von homozygoten Apo E Isoformen werden zunächst IMF-Aufnahme-Experimente durchgeführt. Anschließend sollen zur Untersuchung des Recyclings quantitative und qualitative Aussagen mittels radioaktiver Pulse-Chase- und IMF Pulse-Chase-Experimente folgen, bei denen als extrazellulärer Akzeptor HDL eingesetzt wird.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

- Zellkultur Brutschrank (Heraeus)
- Ultrazentrifuge Beckman I7-55 mit Swing out Rotor SW 41
- Ultrazentrifuge Sorval OTD65B mit Swing out Rotor und Festwinkelrotor
- Rollenmischgerät RM5 (Assistant Deutschland)
- Laser-Scanning-Mikroskop Leica TCS mit Argon-Krypton Laser auf DMIRBE Mikroskop
- Lichtmikroskop Olympus
- Mikroskop Axiovert 100 mit Fluoreszenzeinrichtung (Zeiss, Deutschland)
- Spektralphotometer (Hitachi)
- Elektrophoresekammer (Desaga)
- Gammacounter (Canberra-Packard, Deutschland)
- Laborzentrifuge Labofuge (Heraeus)
- Laborzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus)
- Laborzentrifuge Rotanta RP (Hettich)
- Eppendorfszentrifuge (Eppendorf)
- Blotting-Kammer (Biorad)
- Ellutionskammer (Schleicher and Schuell)
- Liophyle (Lyovac GT2, Heraeus)
- Thermomixer (Eppendorf)

2.2. Zellkultur

Material:

- a) Verwendete Zelllinien:
 - HUH7: humane Hepatomazellen (UKE, Hamburg)
 - humane Hautfibroblasten (UKE, Hamburg)
 - Tangier Fibroblasten
- b) Kulturmedium:
 - Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), (Gibco)
 - 10% Fötale-Kälber-Serum (FCS), (Gibco)
 - 1% Streptomycin/Penicillin
- c) PBS (Phosphate Buffered Saline), (Gibco)
 - 2,7mM KCl, 1,5mM KH_2PO_4 , 137mM NaCl, 8,1mM Na_2HPO_4 , pH 7,4
- d) Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco): 0,05% Trypsin, 0,53mM EDTA
- e) 10x Trypanblaulösung (Gibco)
- f) Zellkulturplatten und Flaschen der Firma Nunc

Methode:

Aufgrund der hohen Sensibilität der Zellen erfordern die Arbeiten in der Zellkultur sorgfältige Handhabung im Umgang mit den jeweiligen Kulturen und den verwendeten Materialien. So muss unter sterilen Bedingungen unter einer speziellen Werkbank (Hood) gearbeitet werden. Die in flüssigen Stickstoff eingelagerten Zellen mussten zunächst bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in ein 15ml Röhrchen zusammen mit 10ml Medium überführt werden. Für 5min wurde nun die Suspension bei 400 xg zentrifugiert und das sich absetzende Zellpellet in 5ml Medium gelöst und in eine 225ml Zellkulturflasche, welche bereits 5ml Medium enthielt, überführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 bis zur Konfluenz kultiviert.

Zur weiteren Proliferation mussten die konfluenten Zellen auf weitere Zellkulturflaschen oder für Versuche auf Zellkulturplatten passagiert werden. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen kurz mit 10ml PBS gewaschen und anschließend mit 5ml Trypsinlösung bei 37°C für 3min abgelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle des vollständigen Ablösens wurde die Trypsin-Zell-Suspension in ein mit 8ml Medium gefülltes 15ml Röhrchen überführt und wie oben bereits beschrieben zentrifugiert und anschließend in weitere Zellkulturflaschen überführt. Im Falle der Proliferation für Versuchszwecke wurde das Zellpellet nach Zentrifugation in 5ml Medium aufgefüllt und ein Aliquot von 50µl zur Zellzählung abgenommen. Zur Erkennung toter Zellen wurde eine 1:2 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau hergestellt. Tote Zellen ließen sich in der Neubauer-Zählkammer neben den gezählten lebenden durch ihre Blaufärbung erkennen. Anhand der Formel: *Mittelwert der Zellzahl der 4 Großquadrate x Verdünnung*

$\times 10^4$ konnte nun die Zellzahl/ml errechnet und eine Zellsuspension mit definierter Zellzahl zur Aussaat hergestellt werden. Diese wurde auf „6-oder 12-well“- Zellkulturplatten gleichmäßig verteilt und bei 37°C je nach Zelllinie für 24h oder 48h bis zur Subkonfluenz inkubiert.

2.3. Isolierung und Charakterisierung der Liganden

2.3.1. VLDL-Isolierung

Material:

- a) Plasma von Patienten mit stark erhöhten Triglyzeridwerten
- b) PBS (Gibco)
- c) Kaliumbromid (KBr): $\delta = 1,006; 1,019; 1,063; 1,21\text{g/ml}$
 - 0,9% NaCl
 - 10mM Tris-HCl (Roth)

Methode:

Um eine hohe Ausbeute an VLDL-Lipoproteinen und somit auch an Apolipoprotein E zu haben, wurde das Plasma von Patienten mit stark erhöhten Triglyzeridwerten genommen. Zunächst wurde das Plasma mit KBr auf eine Dichte von 1,21g/ml eingestellt und für 20h bei 38000rpm und 4°C ultrazentrifugiert. Die oben flotierenden Lipoproteine wurden abgenommen und gut resuspendiert. Nun erfolgte eine Unterschichtung in einem Dichtegradienten des Dichtebereiches von 1,21 bis 1,006g/ml. 2ml einer 1,006g/ml Dichtelösung wurden mit je 3ml einer 1,019 und 1,063g/ml Lösung unterschichtet und anschließend ihrerseits mit der schon auf 1,21g/ml eingestellten Lipoproteinsuspension unterlegt. Es erfolgte eine weitere Ultrazentrifugation bei 38000rpm und 4°C für 20h in einem Swing-out Rotor.

Anschließend konnte die an der Oberfläche im Bereich von 1,21g/ml flotierende VLDL abgenommen und resuspendiert werden, um folgend für die Apolipoprotein E-Gewinnung zur Verfügung zu stehen.

2.3.2. HDL-Isolierung

Material:

- a) Plasma von Patienten mit stark erhöhten Triglyzeridwerten
- b) PBS (Gibco)
- c) Kaliumbromid (KBr): $\delta = 1,006; 1,019; 1,063; 1,21\text{g/ml}$
 - 0,9% NaCl
 - 10mM Tris-HCl (Roth)
- a) Dialysepuffer: 10% PBS (Gibco)

Methode:

Die ersten Schritte bis zur Isolierung der einzelnen Lipoproteinfraktionen mittels Dichtegradienten erfolgte wie oben beschrieben. Die HDL konnten nun im Dichtebereich zwischen 1,21 und 1,063g/ml abgenommen werden und nach Resuspension über Nacht im Dialyseschlauch gegen einen Dialysepuffer vom KBr gereinigt werden.

2.3.3. CM-Isolierung

Material:

- b) Plasma von Patienten Apo C-II defizienten Patienten
- c) PBS (Gibco)
- d) 60% Sucrose-Lösung
- e) Protease-Inhibitor-Lösung (PIC):
 - 1mM Pepstatin (Calbiochem)
 - 10mM Chymostatin (Calbiochem)
 - 10mM Leupeptin (Calbiochem)
 - 10mM Antipain (Calbiochem)

Methode:

Aufgrund ihrer Kurzlebigkeit im Blut gesunder Menschen wurde zur Isolierung von Chylomikronen Plasma von Apo C-II defizienten Patienten verwendet. Aufgrund eines genetischen Defektes sind diese nicht in der Lage CM abzubauen und es kommt somit zur Akkumulation von Chylomikronen im Plasma.

Nach 45min Ultrazentrifugation in einem Swing-out Rotor bei 38000rpm und 4°C konnten die flotierenden Chylomikronen abgenommen, resuspendiert und mit Sucrose beschwert werden (Sucrose-Endkonzentration 10%).

Unterschichtet unter PBS erfolgte nun unter gleichen Bedingungen eine weitere Ultrazentrifugation.

2.3.4. Proteinbestimmung

Material:

- a) Lowry: Lösung A : 2% Na_2CO_3
0,02% Kaliumnatriumtartrat in 0,1N NaOH
- Lösung B : 0,5% CuCO_4
5% SDS in 0,1N NaOH
- Lösung C : Lösung A und Lösung B im Verhältnis 50:1
- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck)
- Albuminstandart (BSA) (Serva): 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625mg/ml in 0,1N NaOH

Methode:

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der verwendeten Liganden wurde die Methode nach Lowry (Lowry et al., 1951) verwendet.

Jeweils 20µl der Probe wurden in 80µl NaOH pipettiert und vermischt mit 1ml der Lösung C für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde je 100µl Folin-Reagenz/Aqua bidest (Verhältnis 1:2) hinzugefügt und nach erneuter Durchmischung für 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der sich zu der Proteinkonzentration proportional verhaltene blaue Farbstoff konnte nun photometrisch bei einer Wellenlänge von 760nm gemessen werden. Als Referenzwert wurde eine BSA-Standardreihe im Bereich von 2 – 0,0625mg/ml verwendet.

2.3.5. Cholesterin- und Triglyzeridbestimmung

Material:

- a) Cholesterinbestimmungskit MPR2 CHOD-PAP (Boehringer, Mannheim)
- b) Triglyzeridbestimmungskit MPR2 GPO-PAP (Boehringer, Mannheim)

Methode:

Die Bestimmung des Cholesterin- und Triglyzeridgehaltes der Proben erfolgte mit Hilfe eines enzymatischen Farbtastes der Firma Boehringer (Testkit).

Je 10µl der Proben wurden mit 1ml Cholesterin- bzw. Triglyzeridreagenz gemischt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 546nm. Mit Hilfe der im Testkit enthaltenen Standards konnten die Konzentrationen errechnet werden.

2.3.6. Markierung der Chylomikronen für Radioaktive Pulse-Chase Experimente

Material:

- a) ^{125}I od (Amersham)
- b) Reaktionslösung: 3,3mM Icl
2M NaCl in 0,1N HCl
- c) 1M Glycerinlösung, pH 10
- d) PD-10 Säulen (Sephadex G25)
- e) Chloroform-Methanol-Lösung im Verhältnis 8:5
- f) PBS (Gibco)
- g) Albuminstandart (BSA) (Serva): 2mg/ml

Methode:

Aus Sicherheitsgründen erfolgte die radioaktive Markierung der Chylomikronen durch den Wissenschaftler Dr. Jörg Heeren. Nach der Methode nach Mc Farlane (Mc Farlane, 1958) wurde 1ml der Ligandenlösung mit 37MBq ^{125}I od, 50 μl Reaktionslösung und 1ml Glycerinlösung versetzt und für 3min auf Eis inkubiert. Mittels zweier PD-10 Säulen wurde das nicht gebundene ^{125}I od entfernt.

Da sowohl Protein- als auch Lipidanteile der CM markiert wurden und zusätzlich ein gewisser Anteil des ^{125}I od frei in der Ligandensuspension verblieb, erfolgte zur genauen Charakterisierung und Gewährleistung der radioaktiven Markierung eine Bestimmung der Aktivitätsverteilung. Hierbei wurden 10 μl der Ligandensuspension mit 10 μl BSA-Standard (2mg/ml) versetzt und anschließend mit 1ml Chloroform-Methanol-Gemisch (8:5) für 15min geschüttelt. Nach folgender 15minütiger Zentrifugation bei 13000rpm wurde dem Überstand 200 μl PBS zupipettiert und ein weiteres Mal für 15min geschüttelt. Somit erhielt man eine Auftrennung in Pellet (Proteinanteil), organische Phase (Lipidanteil) und wässrige Phase (freies ^{125}I od). Durch Bestimmung der jeweiligen Radioaktivität im Gamma-Counter ließ sich nun die Verteilung in den einzelnen Fraktionen errechnen. Zur Gesamtaktivitäts-Bestimmung wurden 10 μl der Ligandensuspension 1ml PBS zugesetzt und nach Durchmischung im Gamma-Counter die Radioaktivität gemessen.

2.3.7. SDS-PAGE

Material:

- a) Trenngel aus je 10ml:
 - 1. untere Acrylamidlösung ($Y\% \times 4 = Xg$) :
 - Xg Acrylamid (M=71,08; Roth)
 - 0,4g Bisacrylamid (M=154,2; Serva) ad 100ml Aqua bidest

2. Untergelpuffer :
1,7M Tris-HCl (Roth), pH 9,18 mit 18%iger HCl
3. Temedlösung :
0,6ml Tetramethylethyldiamin (TEMED; Serva)
4. AP-Lösung :
200mg Ammoniumpersulfat ad 100ml Aqua bidest
- b) Sammelgel aus:
 1. 5ml obere Acrylamidlösung :
12g Acrylamid (Roth)
0,8g Bisacrylamid (M=154,2; Serva) ad 100ml Aqua bidest
 2. 5ml Obergelpuffer :
0,2M Tris-HCl (Roth), pH 6,14 mit 1N H₂SO₄
 3. 2ml AP-Lösung :
200mg Ammoniumpersulfat ad 100ml Aqua bidest
 4. 8ml Aqua bidest
 5. 20µl unverdünntes TEMED
- c) unterer Elektrodenpuffer:
0,24M Tris-HCl (Roth) mit 18%iger HCl, pH 9,5
- d) oberer Elektrodenpuffer:
0,04M Borsäure (Roth)
0,04M Tris-HCl (Roth)
0.1% SDS (Serva), pH 8,64
- e) Probenpuffer:
5% SDS in 50mM Tris-HCl (Roth)
- f) β-Mercaptoethanol (Serva)
- g) Glycerin-Bromphenolblau-Lösung:
Bromphenolblau Spatelspitze in Aqua bidest lösen
87%iges Glycerin mit Bromphenolblaulösung auf 80% verdünnen
- h) Unspezifische Färbung:
 1. Coomassie-Lösung :
0,1% Coomassie in Methanol/Eisenessig/Aqua bidest (50:10:40)
- i) Entfärberlösung:
Methanol/Eisenessig/Aqua bidest im gleichen Verhältnis wie oben (50:10:40)
- j) Spezifische Detektion:
 1. Röntgenfilm (Kodak)

Methode:

Für die gelelektrophoretische Darstellung der Liganden, der Auftrennung der mit ¹²⁵Iod markierten Lipoproteine und für das Western-Blotting (siehe unten) wurde die Methode der diskontinuierlichen Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) nach Neville (Neville, 1971) genutzt. Je nach benötigter Auftrennungsgenauigkeit wurde mit einem 10, 12, oder 15%igem Trenngel gearbeitet, das die Dicke von 1,5mm besaß. Zur genauen Darstellung der Proteine wurde eine definierte Menge der Probe 2 mal mit 1ml Methanol-Chloroform (8:5) delipidiert (Delipidierungsprozess siehe unten). Zum Lösen der entstandenen Pellets wurde nun 10%ige SDS-Lösung zugesetzt (Endkonzentration 1%) und anschließend mit Bromphenolblau und β-Mercaptoethanol zu einer 10%igen Finalkonzentration vermischt. Zur Reduktion wurden die Proben vor dem Auftragen bei 95°C für 10min gekocht. Für die

Darstellung der heißen Liganden wurde als Auftragskriterium 10000cpm gewählt, während von den kalten Proben je nach Proteinkonzentration eine Menge entsprechend 10µg Protein gewählt wurde. Um das Molekulargewicht später bestimmen zu können, wurde parallel ein Proteinstandard aufgetragen. Nach zwei- bis vierständiger Elektrophorese bei konstanten 30mA wurde das Gel mit unspezifischer Proteinfärbung (Coomassie) für 20min gefärbt und anschließend mit Entfärberlösung über Nacht entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden sichtbar waren. Bei aufgetragenen heißen Liganden wurde das Gel nach der Coomassie-Färbung getrocknet und für 20h bei -80°C in einer speziellen Kassette zur autoradiographischen Darstellung auf einem Röntgenfilm belichtet.

2.4. Isolierung, Aufreinigung und Charakterisierung von Apolipoprotein E

2.4.1. Isolierung und Aufreinigung von Apo E

Material:

- a) Alle Materialien der VLDL-Isolierung (siehe 2.3.1.)
- b) Chloroform-Methanol-Lösung im Verhältnis 8:5
- c) Probenpuffer:
 - 5% SDS in 50mM Tris-HCl (Roth)
- d) Alle Materialien für ein SDS-PAGE (siehe 2.3.7)
- e) Natriumacetat-Lösung:
 - 272,16g 4M Natriumacetattrihydrat ad 500ml Aqua bidest, pH 13
- f) Ellutionspuffer:
 - 9,08g Tris (Roth)
 - 43,2g Glycin
 - 0,75g SDS (Serva)
 - ad 3000ml Aqua bidest
- g) Dialysepuffer:
 - 1,976g 5mM Amoniumbikarbonat ad 5000ml Aqua bidest, pH 8

Methode:

I. Präparation der Plasmaproben

Aus humanem Plasma mit homozygoten Apo E-Formen wurden nach der oben beschriebenen Methode triglyzeridreiche Lipoproteine isoliert (siehe 2.3.1.). Diesen vor allem aus VLDL und nur sehr geringen Anteil aus CM bestehenden Lipoproteinen wurde zur weiteren Isolierung der Apolipoproteine in einem Prozess der Delipidierung die Lipidanteile entzogen. Je 100 µl der Ligandensuspension wurden mit 1ml Chloroform-

Methanol-Gemisch (8:5) versetzt und nach 10minütigen Rütteln für weitere 5min bei 13000rpm zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde dieser Prozess mehrmals wiederholt, bis keine Trübung der Suspension durch Fettanteile mehr sichtbar war und die Pellets im Anschluss zur restlichen Entfernung des Chloroform-Methanol-Gemisch unter dem Abzug getrocknet.

II. Präparative SDS-PAGE nach Neville

Nach Lösung der Proteinpellets im Probenpuffer, Zugabe von Bromphenolblau und β -Mercaptoethanol und Aufkochen bei 95°C konnten die Proben zur Auftrennung der einzelnen Fraktionen auf ein präparatives 12%iges Gel aufgetragen werden (siehe 2.3.7.). Zur späteren Benennung der Proteinbanden wurde gleichzeitig 15 μ l der Proben neben einem Molekularmarker auf ein Mini-SDS-PAGE aufgetragen und für 1-2h bei 12mA laufen gelassen. Das präparative Gel dagegen lief über Nacht bei 20mA. In einer 4M Natriumacetatlösung liegend konnten nach 10-15min anhand des Minigels die einzelnen Proteinbanden identifiziert und exakt herausgeschnitten werden.

III. Elution des reinen Proteins

Nach Zerteilung der herausgeschnittenen Gelbanden in kleine Würfel konnte bei konstanten 100V das Apolipoprotein E in einer speziellen Elutionskammer über 12h eluiert werden. Durch kurze Umpolung für 40sec konnte das Protein von den Elutionsmembranen abgelöst und mitsamt geringen Anteilen des Puffers entnommen werden. Zur weiteren Gewinnung wurde eine zweite Elution bei 200V für 8h durchgeführt.

IV. Protein-Masse Messung

Um die Masse des eluierten Apolipoprotein E zu bestimmen, wurden die Proben photometrisch bei 280nm (Messung der Apo E-Extinktion) und 340nm (Messung der Extinktion von Verunreinigungen) gegen den Elutionspuffer gemessen. Anhand der Formel $E_{280nm} - E_{340nm} / 1,296 = \mu g/\mu l$ konnte nun die Apo E-Masse für die weitere Bearbeitung errechnet werden.

V. Dialyse der Apo E-Lösung

Zur Reinigung der durch geringe Mengen Elutionspuffer verunreinigten Proben wurde über Nacht eine Dialyse bei 4°C durchgeführt.

VI. Liophylisierung der Apo E-Lösung

Die Lagerung des Apo E erfolgte bei 4°C in Form von Aliquots mit genau berechneten Mengen. Hierfür wurde die Apo E-Lösung in Epi-Tubes nach Masse verteilt, bei -80°C eingefroren und anschließend für 24-48h liophylisiert, bis dem Protein alle Flüssigkeit entzogen war.

2.4.2. Charakterisierung und Isoformbestimmung von Apo E

Material:

- a) Alle Materialien für ein SDS-PAGE (siehe 2.3.7.)
- b) 0.2% Ponceau ad 3% Trichloressigsäure (Serva)
- c) Substratlösung:
 - 30mg Tablette 4-Chlor-1 Naphtol (Sigma) in 10ml Methanol gelöst
 - ad 50ml PBS, alles auf pH 7,4 eingestellt
 - 20µl 30%ige H₂O₂-Lösung (Merck)
- d) PBS, (Gibco)
- e) Western-Blot-Analyse:
 - 1. Elektroblothingpuffer :
 - 20mM Tris-HCl (Roth)
 - 150mM Glycin (Serva)
 - 20% Methanol
 - 2. Blockingpuffer :
 - 5% BSA (Serva) in Waschpuffer A
 - 3. Waschpuffer A :
 - 10mM Tris-HCl (Roth)
 - 86mM NaCl
 - 0,1% Tween 20, alles auf pH 7,4 eingestellt
 - 4. Waschpuffer A :
 - 10mM Tris-HCl (Roth)
 - 86mM NaCl
 - 0,1% Tween 20
 - 0,3mM SDS (Serva)
 - 6mM Natriumdesoxycholat, alles auf pH 7,4 eingestellt
 - 5. Antikörper (AK) :
 - Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (Anti Apo E, Dako)
 - Goat-Anti-Rabbit-Immunglobuline gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (GAR-PO)
 - 6. Western-Blotting-Detektion-Reagenz :
 - Lösung A + Lösung B (Verhältnis 1:2)
 - 7. Röntgenfilm (Kodak)
- f) Isoelektrische Fokussierung (IEF):
 - 1. Probenpuffer :
 - 0,1M Tris (Roth)
 - 6M Harnstoff
 - 1% Decylsulfat ad 50ml Aqua bidest
 - 2. IEF-Gel :
 - 3,75g Acrylamid (27,5%)
 - 0,1g Bisacrylamid
 - 24g Harnstoff ad 45ml Aqua bidest (M=8)
 - 1,5ml Apholine 4-6
 - 1,5ml Apholine 5-7

- auf 50ml auffüllen
- 60µl AP-Lösung (0,18g Amoniumpersulfat ad 1000ml Aqua bidest)
- 50µl TEMED
- 3. untere Elektrodenlösung :
0,01M H_3PO_4 (4,9g Ortho-Phosphorsäure ad 5000ml Aqua bidest)
- 4. obere Elektrodenlösung :
0,02M NaOH (50ml 2M NaOH ad 5000ml Aqua bidest)
- 5. alle Materialien des Western-Blot
- 6. Antikörper :
Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (Anti Apo E, Dako)
GAR-PO

Methode:

I. Nachweis von Apolipoprotein E

Um nach der Isolierung und Aufreinigung von Apo E aus Humanplasma sicherzustellen, dass die für nachfolgende Experimente verwendeten Proben auch Apo E enthielten, wurde je Isoform 5µg Apo E auf ein SDS-Page aufgetragen und anschließend mittels Western-Blot detektiert. Hierbei wurde nach Vollendung des SDS-PAGE (siehe 2.3.7.) das Gel anstatt einer Coomassiefärbung durch Elektroblothing über 4-6h bei 250mA auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach unspezifischer Färbung der Proteine mit Panceau-Lösung erfolgte die Imundetektion nach Beisiegel (Beisiegel et al., 1982) mit Antikörper gegen Apo E. Dazu wurde die Nitrozellulose zunächst mit PBS von Panceau entfärbt und für 1h in Blockingpuffer blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Anti-Apo E als 1. AK in einer Verdünnung von 1:5000 über Nacht bei 4°C. Die Blots wurden nun für 1min in Waschpuffer A, zweimal 10min in Waschpuffer B und nochmals 1min in Waschpuffer A gewaschen. Die Inkubation mit dem 2. AK, gekoppelt mit Peroxidase, (Verdünnung 1:5000) folgte für eine weitere Stunde. Nach Wiederholung des oben beschriebenen Waschvorganges erfolgte zunächst die Detektion der AK mittels Western-Blot-Detektion-Reagenz auf einem Röntgenfilm und im Anschluss noch mit Hilfe einer Chlornaphtol-Färbung.

II. Apo E-Isoformbestimmung

Da die Fragestellung der Arbeit eine Gewinnung und Verwendung der homozygoten Apo E Isoformen voraussetzte, musste eine genaue Bestimmung der verwendeten Proben erfolgen. Da sich die Isoformbestimmung der reinen Apolipoproteine aber als schwierig erweist, wurden alternativ die Plasmaproben vor Isolierung des Apo E auf mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung bestimmt. Bei dieser Methode wurden die Proteine nicht nach Molekulargewicht aufgetrennt, sondern nach dem isoelektrischen Punkt der Moleküle. Das IEF-Gel lief nach Auftragen der Proben über Nacht bei 250V und wurde

am Folgemorgen für weitere 2h auf 500V gestellt, so dass es insgesamt bei 4800V lief. Danach erfolgte Blotting, Färbung und Immundetektion wie oben beim Western-Blot beschrieben.

2.5. Herstellung und Charakterisierung von Apo E-isoformspezifischen CM

Material:

- a) Chylomikronenlösung
- b) Isolierte Apolipoprotein E-Isoformen
- c) 60% Sucrose-Lösung
- d) PBS (Gibco)
- e) Alle Materialien für eine Isoelektrische Fokussierung (siehe 2.4.2.)

Methode:

Für die Herstellung von Chylomikronen homozygot in Bezug auf ihre Apo E Isoform wurden zunächst 100µl isolierte heterozygoten Chylomikronen mit 25µg reinem Apo E der jeweiligen Isoform bei 37°C für 60min inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit je 20µl 60%iger Sucrose beschwert und nach Unterschichtung unter 1ml PBS in einem MiniGradienten bei 13000rpm für 20min zentrifugiert. Die oben flotierenden gebundenen Apo E-isoformspezifischen Chylomikronen konnten abgenommen und für die Auftrennung mittels IEF in kleinen Mengen delipidiert werden. Die Apo E-Isoformbestimmung erfolgte wie oben beschrieben mit Hilfe isoelektrischer Fokussierung.

2.6. Aufnahmeexperimente

2.6.1. Immunfluoreszenz-Aufnahmeexperimente

Material:

- a) Verwendete Zelllinien:
 - HUH7: humane Hepatomazellen (UKE, Hamburg)
 - humane Hautfibroblasten (UKE, Hamburg)
- b) Apolipoprotein E-Isoformen Apo E_{2/2}, E_{3/3}, E_{4/4}
- c) Assay-Puffer:
 - 2,5% BSA (Sigma)
 - DMEN

- d) DMEN
- e) PBS
- f) 4% PFA-Lösung (8% PFA-Stammlösung in PBS im Verhältnis 1:2)
- g) 10% Methanol
- h) 0,5% PBS-Glycin-Puffer (2,5g Glycin ad 500ml PBS)
- i) Blocklösung:
10% BSA und PBS-Glycin-Puffer im Verhältnis 1:5
- j) Antikörper:
Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (Anti Apo E, Dako)
DTAF-konjugierter Antikörper gegen Immunoglobuline des Kaninchen aus Esel (Dianova, Hamburg)
- k) Kernfärbung: DAPI (Hoechst)
- l) Mowiol (Sigma)

Methode:

Zur Darstellung der zellulären Aufnahme wurde die jeweilige Zellreihe über zwei Tage bei 37°C auf Deckgläschen (cover slips, CS) bis zur Subkonfluenz kultiviert und vor der Inkubation mit den entsprechenden Ansätzen nach kurzem Waschen mit DMEN für 60min bei 37°C mit gleichem Medium ausgehungert. Die Inkubation mit dem im Assay-Puffer gelösten Apo E erfolgte je nach Fragestellung mit unterschiedlich definierten Konzentrationen Apo E und unterschiedlich langen Aufnahmezeiten. Nach anschließendem kurzem zweimaligen Waschen in PBS wurden die CS für 10min in 4% PFA fixiert und weitere 5min in eiskalten MeOH bei -20°C inkubiert. Im folgenden Schritt wurden bei Raumtemperatur die CS 5 x 5min mit jeweils frischem PBS und im Anschluss nochmals 5min in PBS-Glycin-Puffer gewaschen. Vor der Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte zunächst zur Blockierung von unspezifischen Bindungen eine Inkubation in Blocklösung für 30min. Die Blocklösung und der 1. AK, Anti Apo E (Dako) wurden im Verhältnis 1:500 verdünnt und auf jedes CS pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 60min bei 37°C im Brutschrank. Nach weiterem zweimaligen kurzen Waschen mit PBS und zweimaligen 5minütigen Waschen mit PBS-Glycin-Puffer wurde der 2. AK, Anti-Rabbit DTAF im Verhältnis 1:200 mit Blocklösung, aufgetragen und für 45min bei 37°C inkubiert. Um IMF-Artefakte durch ungebundene AK oder Kernfärbung zu vermeiden, wurden die CS im Anschluss 2x kurz und 3x 5min in jeweils frischen PBS und nach 5minütiger Kernfärbung mit DAPI-PBS-Lösung (Verhältnis 1:1.000.000) nochmals 3x 5min mit jeweils frischen PBS gewaschen. Zum Abschluss erfolgte die Konservierung der Strukturen durch Eindeckelung der CS mit Mowiol und Trocknung über Nacht bei 4°C.

2.7. Experimente zu den intrazellulären Stoffwechselwegen

2.7.1. Radioaktive Pulse-Chase Experimente

Material:

- a) Verwendete Zelllinien:
 HUH7: humane Hepatomazellen (UKE, Hamburg)
- b) Apolipoprotein E-Isoformen Apo E_{2/2}, E_{3/3}, E_{4/4}
- c) Assay-Puffer:
 2,5% BSA (Sigma)
 DMEN
- d) DMEN
- e) PBS
- f) Blocklösung:
 Heparin-PBS-Lösung (110U/ ml PBS)
- g) Chase-Medium:
 10% HDL
 0,1% BSA/DMEN
- h) 10% Triton X 100-Lösung
- i) 50% Trichloressigsäure (TCA-Lösung)
- j) 0.1N Natronlauge (NaOH)

Methode:

HUH7 Zellen wurden für die folgenden Versuche in vorgegebener Zellzahl gleichmäßig auf 6-well-Platten ausgesetzt und für 24h bis zur Subkonfluenz kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit DMEN erfolgte das Aushungern der Zellen bei 37°C für 1h im gleichen Medium. Radioaktiv markierte CM wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Apo E inkubiert und anschließend mit dem Assay-Puffer vermischt. Nach der Aufnahme für 60min bei 37°C im Brutschrank erfolgte zunächst ein einmaliges kurzes und zweimaliges 5minütiges Waschen mit PBS. Um spezifische Bindungen zu blockieren, wurden die Zellen für 15min bei leichter Bewegung in Heparin-PBS-Lösung inkubiert und im Anschluss zwei weitere Male für 5min mit PBS gewaschen. Zur Schonung der Zellen erfolgten alle Waschvorgänge bei 4°C auf Eis. Nun wurden die Zellen für weitere 90min mit vorgewärmtem Chase-Medium bei 37°C inkubiert. Zur Trennung von resekretierten Proteinen und der in der Zelle verbliebenen Produkte wurden nach Abnahme die im Medium enthaltenen Proteine mit Hilfe von 10% Triton X-Lösung und 50% TCA-Lösung gefällt und die verbliebenen Zellen mit NaOH lysiert. Dazu wurde dem Chase-Medium auf Eis je 150µl eiskalte Triton X-Lösung für 15min und je 350µl 50% TCA-Lösung für 10min zugegeben. Nach 15minütiger Zentrifugation konnte die jeweils verbliebene Restradioaktivität des Überstands und des Pellets im γ -counter für

1min bestimmt werden. Zur Bestimmung der in den Zellen verbliebenen Restradioaktivität erfolgte die Messung der zuvor für 20min in NaOH lysierten Zellen im γ -counter. Somit konnte die Radioaktivität drei verschiedener Stoffwechselprozesse, der Aufnahme, des Recyclings und des Abbaus, gemessen werden.

2.7.1. IMF-Pulse-Chase Experimente

Material:

- a) Verwendete Zelllinien:
 - HUH7: humane Hepatomazellen (UKE, Hamburg)
 - humane Hautfibroblasten (UKE, Hamburg)
 - Tangier Fibroblasten
- b) Apolipoprotein E-Isoformen Apo E_{2/2}, E_{3/3}, E_{4/4}
- c) Assay-Puffer:
 - 2,5% BSA (Sigma)
 - DMEN
- d) Chase-Medium:
 - 10% HDL
 - 0,1% BSA/DMEN
- e) DMEN
- f) PBS
- g) 4% PFA-Lösung (8% PFA-Stammlösung in PBS im Verhältnis 1:2)
- h) 10% Methanol
- i) 0,5% PBS-Glycin-Puffer (2,5g Glycin ad 500ml PBS)
- j) Blocklösung:
 - 10% BSA und PBS-Glycin-Puffer im Verhältnis 1:5
- k) Antikörper:
 - Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (Anti Apo E, Dako)
 - DTAF-konjugierter Antikörper gegen Immunoglobuline des Kaninchens aus Esel (Dianova, Hamburg)
- l) Kernfärbung: DAPI (Hoechst)
- m) Mowiol (Sigma)

Methode:

Zur Darstellung der intrazellulären Stoffwechselwege wurde die jeweilige Zellreihe in 12-well-Platten gleichmäßig auf Deckgläschen (cover slips, CS) ausgesetzt und über zwei Tage bei 37°C bis zur Subkonfluenz kultiviert. Nach kurzem Waschen mit DMEN wurden die Zellen für 60min bei 37°C mit Gleichem ausgehungert. Die zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Apo E-Isoformen inkubierten CM wurden mit dem Assay-Puffer vermischt, auf die cover-slips verteilt und im Brutschrank für 60min inkubiert. Nach zweimaligen kurzem Waschen mit PBS erfolgten eine weitere Inkubation für 60min mit dem Chase-Medium. Die anschließenden Fixations-, Wasch- und Detektionsvorgänge wurden entsprechend denen der IMF-Aufnahmeexperimente durchgeführt (siehe 2.6.1.).

3. Ergebnisse

Zur Darstellung der Aufnahme von Chylomikronen in Abhängigkeit unterschiedlicher Apolipoprotein E Isoformen und der intrazellulären Stoffwechselwege des Apolipoprotein E wurde die Arbeit in drei aufeinander aufbauende Themenbereiche unterteilt.

Zunächst wurden die für alle folgenden Experimente verwendeten Chylomikronen aus Plasma von Apo C-II defizienten Patienten isoliert und mittels Gelelektrophorese und Cholesterin-, Triglyzerid- und Proteinbestimmung charakterisiert. Für die Pulse-Chase Experimente zum intrazellulären Recycling von Apo E wurde HDL isoliert und vom Apolipoprotein E gereinigt, um als externer Akzeptor fungieren zu können. Auch sie wurde mit oben beschriebenen Methoden charakterisiert. Die Gewinnung des Apo E erfolgte in mehreren Schritten, ausgehend von triglyzeridreichem Plasma der jeweiligen homozygoten Apo E Isoform.

Mit den so gewonnenen Liganden konnten nun zunächst Experimente zur Aufnahme von Chylomikronen in Abhängigkeit der Apo E Isoform durchgeführt werden. Hierzu erfolgten IMF-Aufnahme Experimente auf Hepatomazellen und Fibroblasten mit Detektion der Fluoreszenz-markierten Apo E-Partikel.

Im dritten Teil der Arbeit wurden Pulse-Chase Experimente auf Hepatomazellen, Fibroblasten und Tangier-Fibroblasten durchgeführt zur Darstellung des intrazellulären Recyclings von Apolipoprotein E. Hierfür wurde zunächst mit radioaktiv-markierten Chylomikronen auf Hepatomazellen gearbeitet, um Aufnahme, Recycling und intrazellulären Abbau in Bezug auf die jeweilige Apo E Isoform und unterschiedliche Apo E Konzentrationen untersuchen zu können. Anschließend folgten Experimente mit Fluoreszenz-markierten Apo E Partikeln zur genauen Untersuchung des intrazellulären Recyclings. Um der Frage nach der Rolle des HDL als extrazellulärer Akzeptor und der des Recycling-Mechanismus weiter nachzugehen, wurden abschließend IMF-Pulse-Chase Experimente auf Tangier-Fibroblasten durchgeführt und nach Apo E detektiert.

3.1. Charakterisierung der verwendeten Liganden

3.1.1. Zusammensetzung der Chylomikronen

Zur Charakterisierung der aus dem Plasma von Apo CII defizienten Patienten isolierten Chylomikronen wurde zunächst die Cholesterin-, Triglyzerid- und Proteinkonzentration photometrisch gemessen. In Tabelle 2 sind die Konzentrationen in mg/ml und die prozentuale Zusammensetzung von zwei unterschiedlichen CM-Präparationen angegeben, welche in den nachfolgenden Experimenten als Liganden fungierten. Hierbei ist ersichtlich, dass die verwendeten CM in ihrer Zusammensetzung nur durch minimale physiologische Schwankungen von den in der Literatur beschriebenen Werten abweichen (Gotto et al., 1986; Kane, 1996; Havel et al., 1955). Die für die Vergleichbarkeit der Experimente notwendige Übereinstimmung der zwei Präparationen ist anhand der nahezu identischen prozentualen Zusammensetzung gegeben.

	Cholesterin	Triglyzeride	Protein
Konzentration (mg/ml)	8,2 / 10,3	151 / 136	0,8 / 1,18
Verteilung (%)	5,1 / 7,0	94,4 / 92,2	0,5 / 0,8

Tabelle 2: Zusammensetzung humaner Chylomikronen

Die Tabelle zeigt die Cholesterin-, Triglyzerid- und Proteinkonzentrationen in mg/ml und deren prozentuale Verteilung zweier unterschiedlicher aus Apo-CII defizienten Patientenplasma isolierten Chylomikronen.

Zur Darstellung des Apolipoproteinmusters der Chylomikronen wurden die Lipoproteine mit ^{125}I radioaktiv markiert und auf einem 15% Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die einzelnen Apolipoproteinbanden autoradiographisch auf einem Film detektiert. Abbildung 5 zeigt das Apolipoproteinmuster der Chylomikronen, wobei die für sie charakteristische Zusammensetzung deutlich zu erkennen ist.

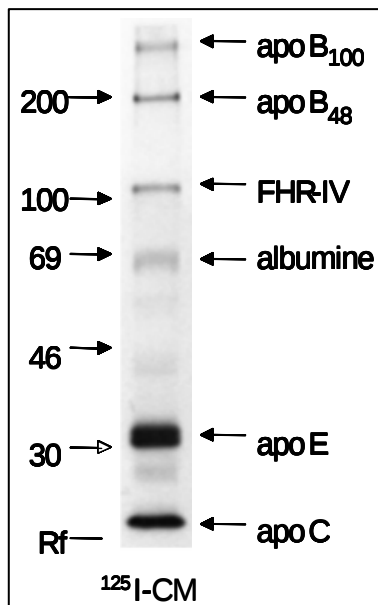


Abbildung 5: Apolipoproteinmuster von ¹²⁵I-CM

Die radioaktiv markierten CM wurden zur Charakterisierung auf ein 15% SDS-PAGE aufgetragen und unter reduzierten Bedingungen aufgetrennt. Durch Exposition des getrockneten Gels mit Hilfe eines Kodak-Filmes für 24h bei -80 Grad C wurden die Apolipoproteinmuster sichtbar gemacht. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte des Proteinmarkers in kDa angegeben und rechts die detektierten Apolipoproteine.

Es stellt sich stark die Bande des Apo E im 34kDa-Bereich und die des Apo CI+III im Bereich 6,5kDa und 8,9kDa dar, die sich aufgrund ihres geringen Molekulargewichtunterschiedes im 15%igen SDS-PAGE nicht getrennt zeigen. Des Weiteren lassen sich auch deutlich die Banden des Apolipoproteinbanden von Apo B₄₈ und B₁₀₀ erkennen.

3.1.2. Zusammensetzung der HDL

Das als Akzeptor für recyceltes Apolipoprotein E fungierende HDL wurde, wie die CM mit Hilfe von photometrischer Cholesterin-, Triglyzerid- und Proteinmessung und SDS-PAGE charakterisiert. Hierzu wurden die HDL zunächst durch Ultrazentrifugation aus humanem Plasma isoliert. Anschließend erfolgte die Reinigung der HDL vom Apo E, so dass die daraus entstehende HDL_{NON BINDING} (HDL_{NB}) gut als extrazellulärer Akzeptor des recycelten Apo E wirken konnte und der Prozess des Recyclings nicht durch eine Sättigungskinetik des Akzeptors beeinflusst wurde. Die Extrahierung des Apo E aus der HDL erfolgte mittels Heparinsäule nach der Methode nach Mahley und Weisgraber (Mahley and Weisgraber, 1980) und anschließender Equilibrierung gegen PBS.

In Tabelle 3 ist die Cholesterin-, Triglyzerid- und Proteinkonzentration in mg/ml und die prozentuale Verteilung von den zwei für die Experimente verwendeten HDL_{NB} angegeben. Es wird deutlich, dass, wie bei allen Lipoproteinen, starke physiologische Schwankungen der Konzentration bestehen, die in ihrer prozentuale Verteilung aber bis auf die leicht erhöhten Proteinwerte den in der Literatur angegebenen Werten entsprechen. Auch bei der

HDL zeigt sich wieder die für die Experimente wichtige Vergleichbarkeit der zwei unterschiedlichen Präparationen.

	Cholesterin	Triglyzeride	Protein
Konzentration (mg/ml)	2,1 / 0,97	0,28 / 0,13	8,9 / 3,25
Verteilung (%)	18,6 / 22,3	2,5 / 3,0	78,9 / 74,7

Tabelle 3: Zusammensetzung HDL_{NON BINDING}

Die Tabelle zeigt die Cholesterin-, Triglyzerid- und Proteinkonzentrationen in mg/ml und deren prozentuale Verteilung zweier unterschiedlicher aus humanem Plasma durch Ultrazentrifugation isolierten und anschließend von Apo E mittels einer Heparin Säule gereinigten non-binding-HDL, zur Verfügung gestellt von Christiane Becker nach Equilibrierung über eine PD10 Säule gegen PBS-Puffer 1:10.

Das Apolipoproteinmuster der HDL ist in Abbildung 6 dargestellt. Die isolierte Non-Binding-HDL wurde auf ein 15% Gel aufgetragen und unter reduzierten Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Während auf der linken Seite das HDL mit enthaltendem Apolipoprotein E aufgetragen ist, zeigt die rechte Lane das Apolipoproteinmuster von Non-Binding-HDL. Neben dem für die HDL charakteristischen Apolipoprotein Apo AI mit einem Molekulargewicht von 28,5kDa ist bei der HDL_E deutlich die 34kDa-Bande des Apo E zu sehen, während bei der HDL_{NB} diese nicht vorhanden ist. Die bei beiden Lanes zu erkennbare Bande im 66kDa-Bereich lässt auf eine geringe Verunreinigung durch Albumin schließen.

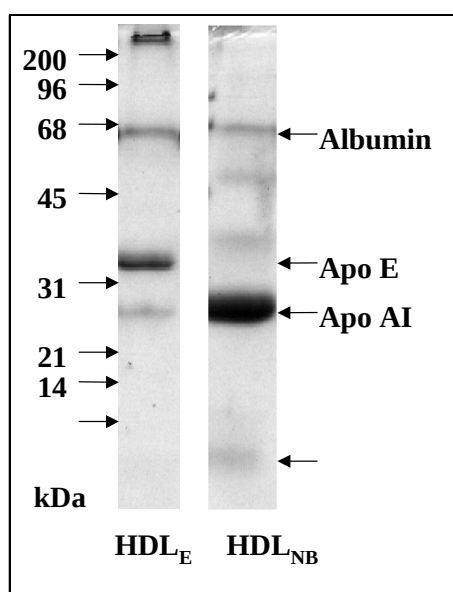


Abbildung 6: Apolipoproteinmuster von HDL_E und HDL_{NB}

Die aus humanem Plasma isolierten HDL wurden nach Reinigung von Apo E mittels einer Heparinsäule und anschließender Equilibrierung gegen PBS-Puffer zur Charakterisierung auf ein 15% SDS-PAGE aufgetragen und unter reduzierten Bedingungen aufgetrennt. Durch unspezifische Detektion mit Coomassie-Färbung wurden die Apolipoproteinmuster sichtbar gemacht. Im Gegensatz zu der HDL_E, auf der linken Seite gezeigt, ist bei HDL_{NB} auf der rechten Seite durch den Entzug des Apolipoprotein E die entsprechende Bande bei 34kDa nicht mehr sichtbar. Am linken Rand sind die Molekulargewichte des Proteinmarkers in kDa angegeben und rechts die detektierten Apolipoproteine.

3.1.3. Herstellung von Apo E Isoformspezifischen Chylomikronen

Da sich, wie erwähnt, die Gewinnung von in Bezug auf ihr Apolipoprotein E homozygoten Chylomikronen durch ihre kurze Verweildauer im menschlichen Blutkreislauf und die selten vorkommenden Allelfrequenzen von homozygoten Apo E Isoformen in der Bevölkerung (Apo E_{2/2} = 3-12%, Apo E_{3/3} = 70-85% und Apo E_{4/4} = 12-18%) als schwierig erweist, wurde versucht, Apo E_{2/2}, E_{3/3} und E_{4/4} isoformspezifische Chylomikronen durch Inkubation mit der jeweiligen Apo E-Isoform herzustellen. Hierzu wurde den aus Apo CII-defizienten Patienten gewonnenen Chylomikronen, welche die heterozygote Apo E-Isoform E_{2/3} besaßen, homozygotes Apolipoprotein E der jeweiligen Isoform E_{2/2}, E_{3/3} und E_{4/4} im Überschuß zugegeben und für 60min im Brutschrank inkubiert. Nach anschließender Abzentrifugation des nicht gebundenen Apo E wurden die jeweiligen isoformspezifischen Chylomikronen auf ein IEF Gel aufgetragen und zur Detektion ihrer Apo E-Banden nach isoelektrischem Punkt aufgetrennt und mit Hilfe von WesternBlot und Chlornaphtol sichtbar gemacht. Während sich bei der Auftrennung von Apolipoprotein E nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE keine genaue Aussage über die Isoform machen lässt, können bei der Auftrennung nach ihrem isoelektrischen Punkt die einzelnen Apo E-Banden gut dargestellt werden. Durch den Austausch der AS an den Positionen 112 bei E_{2/2} bzw. 158 bei E_{4/4} (siehe 1.3.) und den damit veränderten Ladungen der Moleküle kommt es zu veränderten Laufeigenschaften im IEF-Gel. So sind die Apo E-Banden auf dem Gel in der Höhe unterschiedlich lokalisiert.

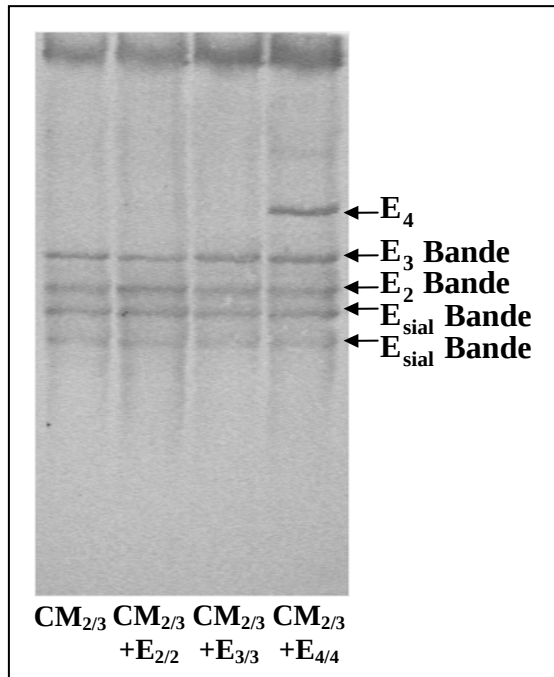


Abbildung 7: Apolipoprotein E Isoformmuster der transformierten CM

Zur Herstellung von Apo E isoformspezifischen CM wurden die $CM_{2/3}$ jeweils mit $25\mu g$ der Apo E Isoformen für 60min bei $37^\circ C$ inkubiert und folgend mit Sucrose 60% beschwert und abzentrifugiert. Zum Auftragen auf das IEF Gel wurden die gewonnenen Liposomen vorher delipidiert. Nach der Auftrennung wurden die Apo E Isoformmuster mit Hilfe von WesternBlot und Chlornaphtol sichtbar gemacht. Auf der rechten Seite sind die Apo E Isoformbanden angegeben. Esial sind die syalisierten Apo E Banden.

Wie in Abbildung 7 zu sehen, zeigen sich die Apo E-Banden von oben nach unten in der Reihenfolge Apo E4, Apo E3 und Apo E2. Die syalisierten Apo E Banden stellen hierbei die im Rahmen des Isoformpolymorphismus auftretenden, zusätzlichen ans Protein angehängten Syalinreste (Zuckerreste) dar, welche sich durch ihre negative Ladung unterhalb der Apo E2 Bande erkennbar sind.

Bei den reinen CM ohne Zusatz von Apo E zeigen sich die Apo E-Banden E2 und E3 entsprechend dem Genotyp des Spenders. Bei den CM, welche mit Apo E2 bzw. Apo E3 inkubiert wurden, zeigt sich eine jeweilige, minimal stärkere Ausprägung der Bande. Die mit Apo E4 inkubierten CM weisen eine zusätzliche Bande im Bereich des Apo E4 auf, zeigen aber wie bei den beiden anderen transformierten CM immer noch deutlich die genetisch ursprünglichen Banden des Apo E2 und Apo E3.

3.2. Aufreinigung und Charakterisierung von Apolipoprotein E

3.2.1. Isoelektrische Fokussierung von Humanplasma

Bevor das Apolipoprotein E isoliert und aufgereinigt werden kann, muss zur Bestimmung des Apo E Isoformtyps eine isoelektrische Fokussierung des jeweiligen Plasmas durchgeführt werden (siehe 2.4.). In Abbildung 8 ist das Apo E-Isoformmuster von Humanplasma mit den homozygoten Apo E Isoformen $E_{2/2}$, $E_{3/3}$ und $E_{4/4}$ dargestellt.

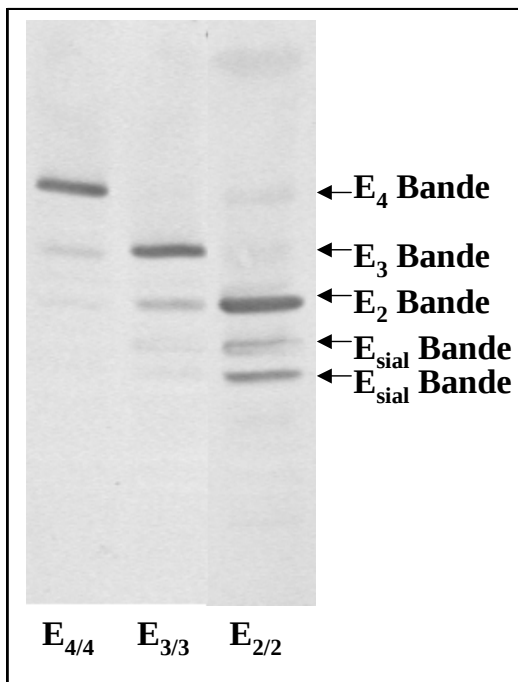


Abbildung 8: Apolipoprotein E Isoformmuster von Humanplasma

Jeweils 10 μ l humanes Blutplasmas wurden vor der Gewinnung von Apolipoprotein E zur Isoformbestimmung auf ein IEF-Gel aufgetragen und anschließend mittels WesternBlot und Chlornaphthol sichtbar gemacht. Auf der rechten Seite sind die Apo E Isoformbanden angegeben. Esial sind die sialisierten Apo E Banden.

Durch die veränderten Laufeigenschaften des Apolipoprotein E entsprechend des jeweiligen Genotypes zeigen sich die Apo E Banden in unterschiedlicher Höhe auf dem IEF-Gel. So zeigt das aufgetragene Plasma mit homozygoten Apo E4-Genotyp eine am stärksten ausgeprägte Apo E4-Bande und nur eine minimale Ausprägung der Banden E2 und E3, welche zwar auf ein geringes Vorhandensein von Allelen dieser Apo E Typen hindeuten, phänotypisch und physiologisch aber keine Relevanz haben. Auch bei dem aufgetragenen Apo $E_{3/3}$ - und $E_{2/2}$ -Plasma zeigen sich die stark ausgeprägten Banden im Bereich des jeweiligen Apo E Allel, so dass aufgrund dieser eine Zuordnung zu dem jeweiligen Apo E-Isoformtyp möglich ist. Das Apo $E_{3/3}$ -Plasma zeigt zudem eine minimale Ausprägung des Apo E2-Allels und in der Lane vom Apo $E_{2/2}$ -Plasmas sind zusätzlich noch die Banden von sialisierten Apolipoproteinen sichtbar.

3.2.2. Aufreinigung von Apo E

Nach Bestimmung der Isoform kann nun die Isolierung und Aufreinigung des Proteins aus dem jeweiligen Plasma erfolgen. Nachdem mittels Ultrazentrifugation zunächst die Lipoproteine und in einem zweiten Schritt über einen Dichtegradienten die triglyceridreichen Lipoproteine (TRL) isoliert wurden, konnten die Lipoproteine nach dem delipidieren auf ein präparatives SDS-PAGE aufgetragen und nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (siehe 2.4.1.). Zum Nachweis von Apo E und Bestimmung der Apo E Bande im präparativen Gel wurden 15 µl der delipidierten Lipoproteine unter entsprechenden Verhältnissen auf ein Mini-SDS-PAGE aufgetragen und für 60 bis 120 min bei 12 mA laufen gelassen. Abbildung 9 zeigt exemplarisch für die Gewinnung von reinem Apolipoprotein E das Apolipoproteinmuster der delipidierten Lipoproteine bei der Präparation von Apo E_{3/3}. Anhand des aufgetragenen Proteinmarkers lassen sich deutlich die Banden der Apolipoproteine Apo A_I mit einer Molekularmasse von 28,5 kDa, Apo E mit einer von 34 kDa und Apo B im Bereich 265 und höher und die Bande des Albumins mit einer Molekularmasse von 66 kDa voneinander unterscheiden.

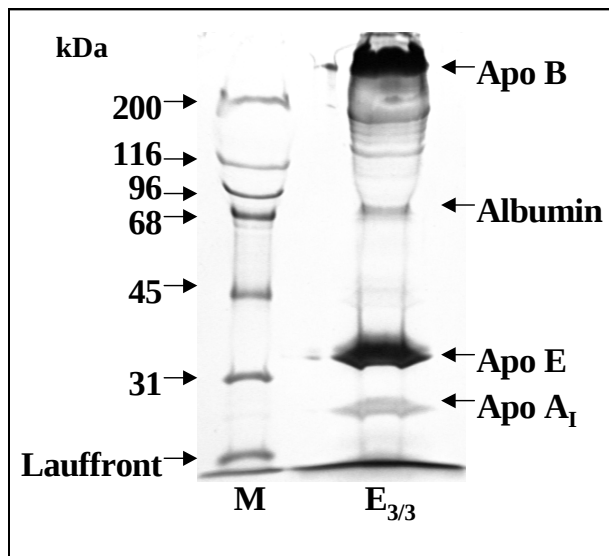


Abbildung 9: Apolipoproteinmuster der delipidierten Lipoproteine während der Apo E Präparation

Die delipidierten Lipoproteine wurden zum Nachweis von Apolipoprotein E auf ein 12% Mini-SDS-Page aufgetragen und unter reduzierten Bedingungen aufgetrennt. Zum Erkennen des Apolipoproteinmusters wurde eine Proteinfärbung (Coomassie) verwendet. Auf der linken Seite ist der Proteinmarker (M) aufgetragen und die Molekulargewichte in kDa angegeben, auf der rechten die detektierten Apolipoproteine.

Um nun das gewonnene Apo E nach Isolierung und Aufreinigung aus Humanplasma darzustellen und auf seine Reinheit zu kontrollieren, wurden je 10 µg des Proteins auf ein 15%iges SDS-Page aufgetragen und unter reduzierten Bedingungen für 2 bis 4 Stunden bei 30 mA laufen gelassen. In Abbildung 10 zeigt sich bei allen drei aufgetragenen Isoformen deutlich die Apo E-Bande im Bereich von 34 kDa ohne zusätzliche Verunreinigungen durch andere Proteinbanden. Obwohl sich aufgrund ihres gleichen Molekulargewichtes

keine eindeutige Unterscheidung der Isoform $E_{2/2}$, $E_{3/3}$ und $E_{4/4}$ im SDS-PAGE beobachten lässt, ist dennoch die verminderte Motilität von Apo $E_{2/2}$ im elektrischen Feld aufgrund des durch den AS-Austausch veränderten SDS-Bindungsverhaltens anhand der im Gegensatz zu $E_{3/3}$ und $E_{4/4}$ leicht höher liegenden Apo E-Bande erkennbar.

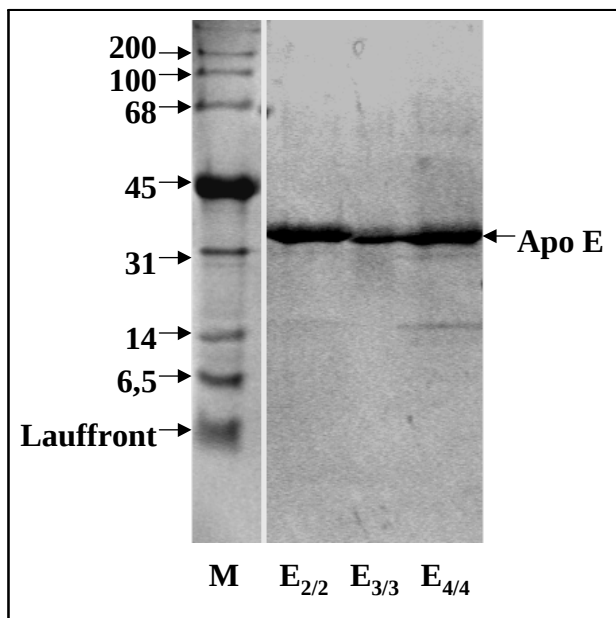


Abbildung 10: Apolipoproteinmuster des verwendeten Apolipoprotein E

Zum Nachweis des Vorhandenseins von Apolipoprotein E nach Isolierung aus Humanplasma wurde je 10 μ g Apo $E_{2/2}$, $E_{3/3}$, $E_{4/4}$ auf ein 15% SDS-PAGE aufgetragen, unter reduzierten Bedingungen aufgetrennt und mit Proteinfärbung (Coomassie) sichtbar gemacht. Auf der linken Seite ist der Proteinmarker (M) aufgetragen und die Molekulargewichte in kDa angegeben.

3.3. Aufnahme von Chylomikronen in Abhängigkeit der Apo E Isoform

3.3.1. Immunfluoreszenz-Aufnahmeexperimente

Um die Abhängigkeit der Chylomikronenaufnahme in Hepatomazellen und Fibroblasten von den unterschiedlichen Apolipoprotein E-Isoformen und früher beschriebene Unterschiede der drei Isoformen darzustellen, wurden zunächst Aufnahmeexperimente mit unterschiedlichen Aufnahmezeiten und Apo E Konzentrationen durchgeführt, anhand deren folgend Rückschlüsse auf den Versuchsaufbau späterer Pulse-Chase Experimente gezogen werden konnten. Hierzu wurden die in Bezug auf ihr Apo E heterozygoten Chylomikronen mit der jeweiligen homozygoten Apo E Isoform bei Raumtemperatur für 20min inkubiert, in der Annahme, dass so das freie Apo E an die CM assoziiert und entsprechend der im Menschen physiologisch auftretenden Vorgänge die Aufnahme steigert. Diese und mögliche Isoform-Unterschiede ließen sich dann mittels Immundetektion des Apo E visuell darstellen. Der Versuchsablauf entsprach dem in Material und Methoden beschriebenen Schema (2.6.1.) und die Immunmarkierung der Zellen erfolgte mit Anti-Apo E-Antikörper, die der Zellkerne mit DAPI Kernfärbung.

Zunächst erfolgten Experimente mit Hepatomazellen der Zellreihe HUH7. Sie wurden für 24h bis zur Subkonfluenz bei 37°C ausgesetzt und vor Inkubation mit den Liganden 60min mit sterilem DMEM ausgehungert. Die CM wurden mit je 25µg/ml Apo E_{2/2}, E_{3/3} und E_{4/4} assoziiert und für 10min, 30min und 120min bei 37°C den HUH7 Zellen zugesetzt. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnten nach Fixations-, Makierungs- und Waschvorgängen das in den Zellen befindliche Apo E detektiert werden (grüne Strukturen in den Abbildungen).

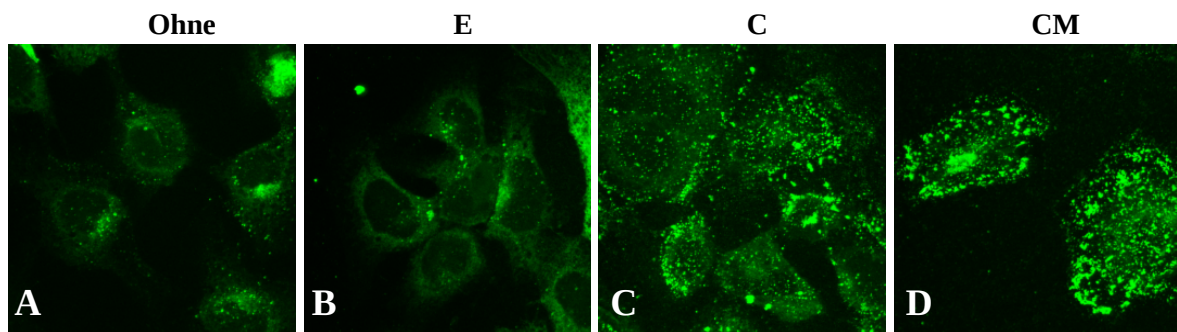


Abbildung 11: Vergleich der Apo E-Detektion in Hepatomazellen bei Inkubation mit unterschiedlichen Ligandensuspensionen

Hepatomazellen wurden für 24h bis zur Subkonfluenz kultiviert und bei 37°C für 30min mit unterschiedlichen Ligandensuspensionen inkubiert. Nach Fixierung der Zellen mit PFA-Methanol-Lösung wurden an der Oberfläche gebundene Liganden mit Hilfe von Heparin entfernt. Zur Darstellung der endozytierten Partikel erfolgte die Detektion spezieller Antikörper gegen Apo E, gefolgt von DTAF-konjugierten AK gegen Immunglobuline des Kaninchens (siehe 2.6.1.).

Die Aufnahmen wurden mittels konfokalen Mikroskopes aufgenommen. Die sich in den Abbildungen darstellenden grün fluoreszierenden Partikel entsprechen dem Apolipoprotein E. Während in Abb. 11A keine Zugabe von Ligandenlösung erfolgte, zeigt Abb. 11B die Inkubation mit 25µg/ml reinem Apo E_{3/3}, Abb. 11C die mit reinen CM und Abb. 11D die Inkubation mit CM, welche zuvor für 20min mit 25µg/ml Apo E_{3/3} angereichert wurden.

Abbildung 11 A-D zeigt das in den Hepatomazellen identifizierte Apo E nach einer Inkubationszeit von 30min. Es lässt sich schon ohne Inkubation mit dem Liganden bzw. Apo E eine leicht grüne Fluoreszenz in den Zellen erkennen, die auf eine endogene Produktion von Apo E in den Hepatomazellen hindeutet (Abb. 11A). Um des Weiteren auszuschließen, dass in der Ligandensuspension frei vorliegendes Apo E in die Zelle direkt aufgenommen wird und somit einen Vergleich verfälschen oder unmöglich machen würde, erfolgte die Inkubation der Zellen mit gleicher Menge freien Proteins. Hierbei lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Apo E-Konzentration erkennen, was gegen eine bedeutende direkte Aufnahme von Apo E spricht (Abb. 11B). Bei der Inkubation mit CM in Abbildung 11C ist nun eine Zunahme der Aufnahme zu erkennen, die durch den in CM

enthaltenen Apo E Anteil erklärbar ist. Durch vorherige Assoziation der CM mit Apo E lässt sich diese Aufnahme noch steigern. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass freies Apo E mit den CM assoziierte und bei der Aufnahme in die Zelle als Transporter dient (Abb. 11D).

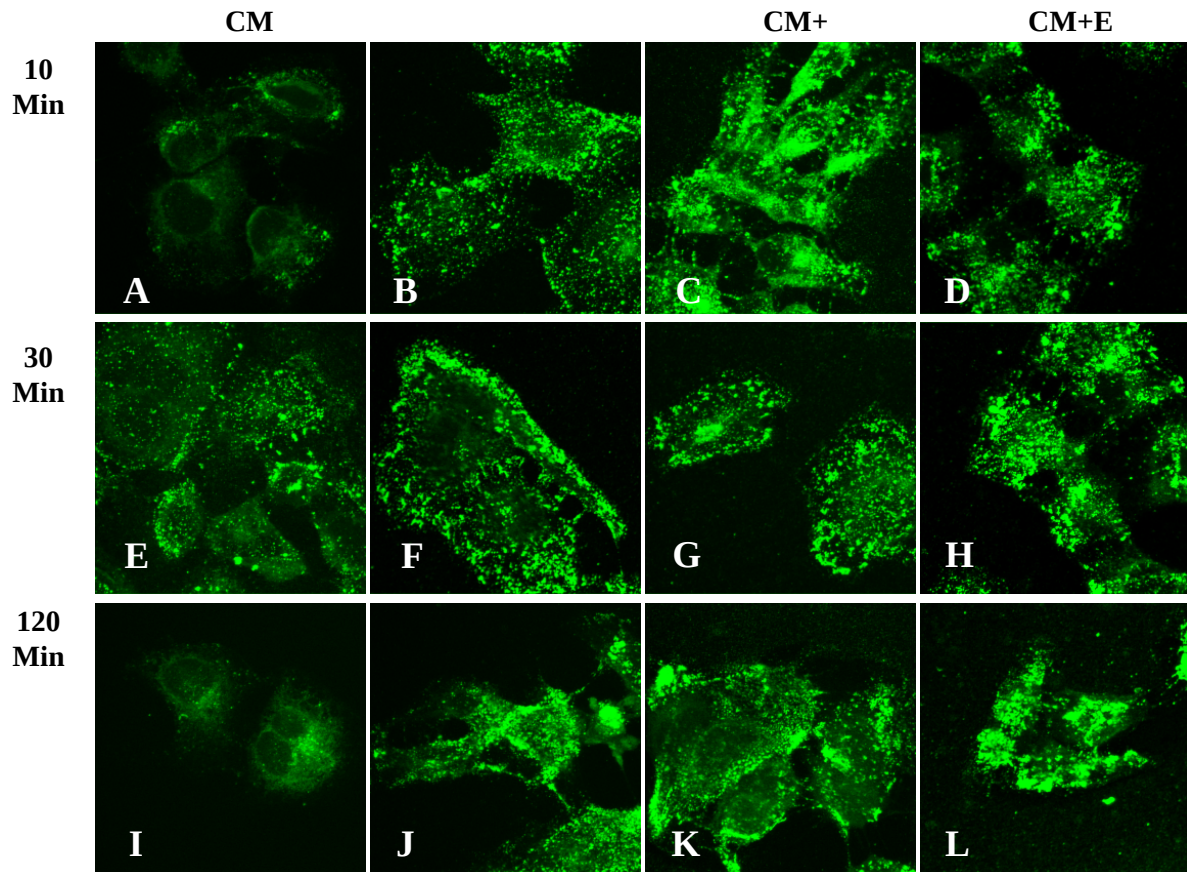


Abbildung 12: Vergleich intrazellulärer Apo E-Detektion in Hepatomazellen in Abhängigkeit von der Apo E-Isoform und unterschiedlichen Aufnahmezeiten

Hepatomazellen wurden für 24h bis zur Subkonfluenz kultiviert. Nach 20minütiger Assoziation mit 25µg/ml Protein je Apo E-Isoform folgte die Inkubation der Zellen bei 37°C für 10min (Abb. 12A-D), 30min (Abb. 12E-H) und 120min (Abb. 12I-L) mit den angereicherten CM der jeweiligen Isoformen. Nach Fixierung der Zellen mit PFA-Methanol-Lösung wurden an der Oberfläche gebundene Liganden mit Hilfe von Heparin entfernt. Zur Darstellung der endozytierten Partikel erfolgte die Detektion spezieller Antikörper gegen Apo E, gefolgt von DTAF-konjugierten AK gegen Immunglobuline des Kaninchens (siehe 2.6.1.).

Die mittels konfokalen Mikroskopes gemachten Bilder zeigen intrazellulär gelegenes Apo E und dessen Lokalisation in Abhängigkeit der Isoformen Apo E_{2/2} (Abb. 12B/F/J), E_{3/3} (Abb. 12C/G/K) und E_{4/4} (Abb. 12D/H/L).

Die gesteigerte Aufnahme durch Assoziation mit Apolipoprotein E im Gegensatz zu den reinen CM lässt sich auch in Abbildung 12 A-L deutlich erkennen. Es werden jeweils die Aufnahme von CM, CM+Apo E_{2/2}, CM+Apo E_{3/3} und CM+Apo E_{4/4} im direkten Vergleich bei Inkubationszeiten von 10min (Abb. 12A-D), 30min (Abb. 12E-H) und 120min (Abb. 12I-L) gezeigt. Bei allen drei Inkubationszeiten zeigt sich eine gesteigerte Aufnahme im

Gegensatz zu der jeweiligen Inkubation mit reinen CM in den Abbildungen 12A, 12E und 12I. Hierbei lassen sich mit zunehmender Inkubationszeit keine quantitativen Unterschiede feststellen, jedoch zeigen sich bei genauer Betrachtung qualitative Unterschiede in der Lokalisation der Fluoreszenzpartikel. Vergleicht man die Aufnahme von Apo E-angereicherten CM im Verlauf von 10min, 30min und 120min so lässt sich eine leichte Verlagerung der Partikel von zentral gelegenen Vesikeln der Zelle (Abb. 12B-D, 12F-H) hin zu Akkumulationen in der Zellperipherie ausmachen (Abb. 12J-L). Bei dieser Betrachtung fällt für Apo E_{3/3} bei einer Inkubationszeit von 10min (Abb. 12C) nur eine stärkere Intensität der Fluoreszenz auf, wogegen der eben beschriebene qualitative Unterschied erst bei einer Aufnahmezeit von 30min (Abb. 12G) und 120min (Abb. 12K) zu sehen ist. Isoformspezifische Unterschiede der Fluoreszenz und somit Unterschiede in dem Aufnahmeverhalten von Apo E_{2/2}, E_{3/3} und E_{4/4} lassen sich bei keiner der drei Aufnahmezeiten feststellen.

Dem gleichen Versuchsaufbau folgend wurden IMF-Aufnahmeexperimente auf humanen Hautfibroblasten durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen für 48h bei 37°C bis zur Subkonfluenz kultiviert und mit Ligandenlösung für 10min bzw. 60min inkubiert. Die Apolipoprotein E-Konzentration, die den CM zugegeben wurde, betrug jeweils 10µg/ml und 50µg/ml.

Abbildung 13A-H und 14A-H zeigen humane Hautfibroblasten im Immunfluoreszenzmikroskop mit Detektion des Apo E und des Nucleolus in Abb. A-D und E-H und Darstellung der Zelle und des Nucleolus mittels Phasenkontrastaufnahme und DAPI-Kernfärbung. Die Phasenkontrastaufnahme dient der Kontrolle des Zellzustandes der experimentell sensiblen Fibroblasten.

Im Vergleich zu den vorhergehenden Experimenten mit Hepatomazellen zeigt sich bei Inkubation der Zellen mit reinem CM kaum eine Detektion von Apo E, was zum einen darauf hindeutet, dass die Fibroblasten keine endogene Produktion von Apo E besitzen und zum anderen für eine geringe Aufnahme von reinem CM in die Zelle spricht (Abb. 13A+E, 14A+E). Es zeigt sich des weiteren, dass die Detektion des Apo E und eine damit zusammenhängende Apo E-assoziierte CM-Aufnahme erst in höheren Proteinkonzentrationen deutlich in Erscheinung tritt (Abb. 14B-D, 14F-H). So lassen sich bei der Proteinkonzentration von 10µg und einer Aufnahmezeit von 10min (Abb. 13B-D) keine Fluoreszenzen erkennen und auch bei einer Steigerung der Inkubationszeit auf 60min

(Abb. 13F-H) tritt diese erst deutlich in Form eines Randsaumes bei Apo E_{4/4}-assoziierten CM auf (Abb. 13H).

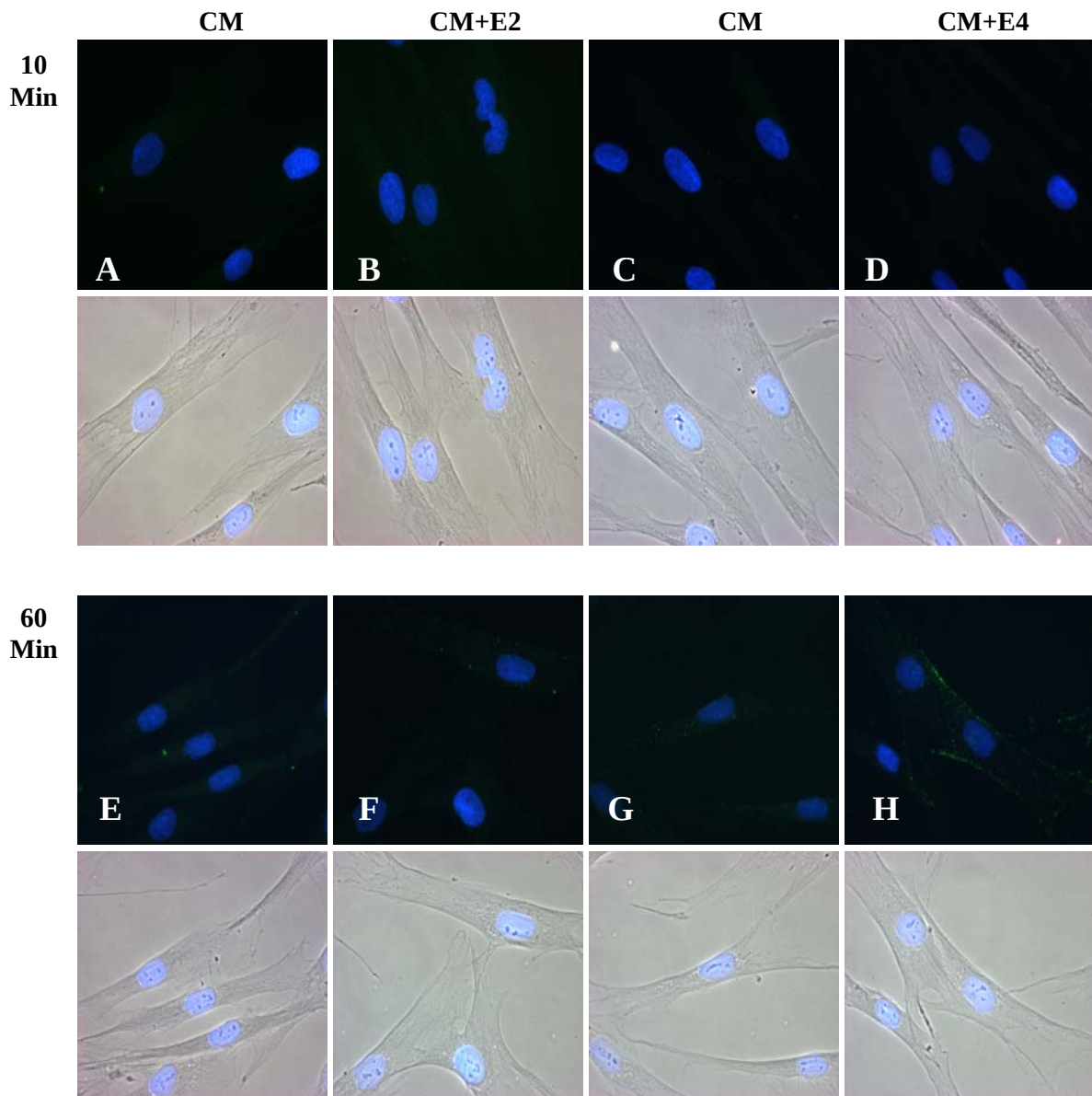


Abbildung 13: Vergleich intrazellulärer Apo E-Detektion in humanen Hautfibroblasten in Abhängigkeit von der Apo E-Isoform und unterschiedlichen Aufnahmezeiten bei einer Proteinkonzentration von 10µg/ml

Fibroblasten wurden für 48h bis zur Subkonfluenz kultiviert. Nach Assoziation mit 10µg/ml Protein je Apo E-Isoform folgte die Inkubation der Zellen bei 37°C für 10min (Abb. 13A-D) und 60min (Abb. 13E-H) mit den angereicherten CM der unterschiedlichen Isoform. Nach Fixierung der Zellen mit PFA-Methanol-Lösung wurden an der Oberfläche gebundene Liganden mit Hilfe von Heparin entfernt. Zur Darstellung der endozytierten Partikel erfolgte die Detektion spezieller Antikörper gegen Apo E, gefolgt von DTAF-konjugierten AK gegen Immunglobuline des Kaninchens. Die Zellen selbst und der Nukleolus wurden mit Hilfe von Phasenkontrastaufnahme und DAPI-Kernfärbung dargestellt (siehe 2.6.1.). Die mittels IMF-Mikroskopes bei einer Belichtungszeit von 6000 Millisekunden aufgenommenen Bilder zeigen intrazellulär gelegenes Apo E und dessen Lokalisation in Abhängigkeit der unterschiedlichen Aufnahmezeiten und Isoformen Apo E_{2/2} (Abb. 13B/F), E_{3/3} (Abb. 13C/G) und E_{4/4} (Abb. 13D/H).

Bei Konzentrationssteigerung des Apo E zeigt sich dagegen eine deutliche Erhöhung der Aufnahme bei 10min und 60min Inkubationszeit (Abb. 14B-D, 14F-H). Hier lassen sich fluoreszierende Partikel im gesamten Zytoplasma der Fibroblasten erkennen, wobei es bei Apo E_{3/3} mit 60minütiger (Abb. 14G) und bei E_{4/4} mit 10- und 60minütiger Aufnahme (14D, 14H) wieder zu der zuvor beschriebenen Saumbildung von akkumuliertem Protein in der Zellperipherie kommt. Dies deutet, wie schon bei den Aufnahmeexperimenten mit HUH7-Zellen, auf einen Zusammenhang des zeitlichen Faktors mit der Lokalisation der Partikel in der Zellperipherie hin. Im Gegensatz hierzu scheint die Proteinkonzentration mehr Einfluss auf die quantitative Aufnahme zu nehmen, so zeigt sich bei einer Konzentration von 50µg/ml und Aufnahmezeit von 10min eine deutlich stärkere Fluoreszenz als bei einer Aufnahmezeit von 60min, aber einer Konzentration von nur 10µg/ml Apo E (Abb. 14B-D, Abb. 13F-H).

In Bezug auf isoformspezifische Unterschiede lassen sich erst bei höherer Proteinkonzentration Unterschiede erkennen. So sieht man bei einer Proteinkonzentration von 50µg/ml stark ausgeprägte Anzahl fluoreszierender Partikel in den Zellen, mit der Tendenz eines zunehmenden Apo E-Aufnahmeverhaltens von E_{2/2} über E_{3/3} zu E_{4/4} (Abb. 14B-D, 14F-H).

Interessant erscheint die bei Apo E_{4/4}-assoziierte CM auftretende Saumbildung, die sich schon bei geringer Proteinkonzentration und einer Aufnahmezeit von 60min in Abbildung 13H zeigt. Sie ist bei Proteinkonzentrationssteigerung (Abb. 14H) deutlich verstärkt und stellt sich auch schon bei einer Inkubationszeit von 10min signifikant dar (Abb. 14D).

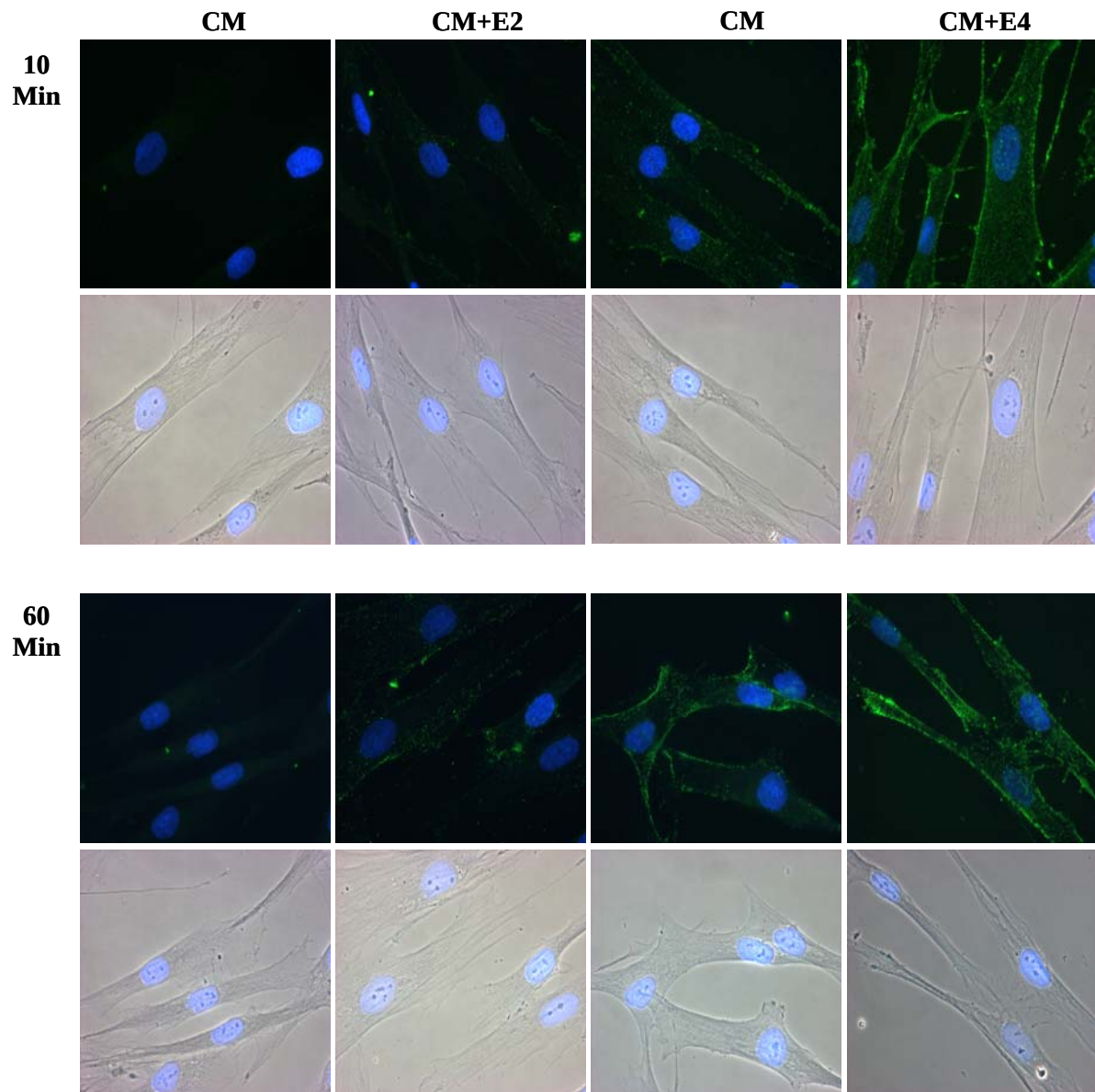


Abbildung 14: Vergleich intrazellulärer Apo E-Detektion in humanen Hautfibroblasten in Abhängigkeit von der Apo E-Isoform und unterschiedlichen Aufnahmezeiten bei einer Proteinkonzentration von 50µg/ml

Fibroblasten wurden für 48h bis zur Subkonfluenz kultiviert. Nach Assoziation mit 50µg/ml Protein je Apo E-Isoform folgte die Inkubation der Zellen bei 37°C für 10min (Abb. 14A-D) und 60min (Abb. 14E-H) mit den angereicherten CM der unterschiedlichen Isoform. Nach Fixierung der Zellen mit PFA-Methanol-Lösung wurden an der Oberfläche gebundene Liganden mit Hilfe von Heparin entfernt. Zur Darstellung der endozytierten Partikel erfolgte die Detektion spezieller Antikörper gegen Apo E, gefolgt von DTAF-konjugierten AK gegen Immunglobuline des Kaninchens. Die Zellen selbst und der Nukleolus wurden mit Hilfe von Phasenkontrastaufnahme und DAPI-Kernfärbung dargestellt (siehe 2.6.1.). Die mittels IMF-Mikroskopes bei einer Belichtungszeit von 6000 Millisekunden aufgenommenen Bilder zeigen intrazellulär gelegenes Apo E und dessen Lokalisation in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Aufnahmezeiten und Isoformen Apo E_{2/2} (Abb. 14B/F), E_{3/3} (Abb. 14C/G)

3.4. Intrazelluläre Stoffwechselwege von Chylomikronen in Abhängigkeit der Apo E Isoform

Um nun die intrazellulären Stoffwechselwege von CM in Abhängigkeit der Apo E Isoformen und dem Einfluss von HDL als extrazellulärer Akzeptor für recycelte Proteine zu untersuchen, wurden im folgenden Teil Pulse-Chase Experimente zunächst mit ^{125}I -radioaktiv markierten CM und im Anschluss daran auf Immunfluoreszenz-Basis durchgeführt.

3.4.1. Radioaktive Pulse-Chase Experimente

Die radioaktiven Pulse-Chase Experimente erfolgten auf Hepatomazellen der Zellreihe HUH7, die für 24h bei 37°C in six-well Platten bis zur Subkonfluenz ausgesetzt wurden und nach 60minütigem Aushungern mit „sterilem“ DMEN für eine Zeit von 60min mit den jeweiligen Ligandensuspensionen inkubiert wurden. Diese bestanden entsprechend den vorhergehenden Aufnahmeexperimenten aus reinen CM oder Apo E-assoziierten CM (siehe 3.3.1.). Nach der Aufnahmezeit erfolgte zunächst die Entfernung von unspezifischen Bindungen mittels Waschens der Zellen mit PBS und Blockierung spezifischer Bindungen durch 15min Inkubation mit Heparin (110U/ml) (siehe 2.7.1.) und im Anschluss der Chase durch 90min Inkubation mit 10% HDL. Diese diente als Akzeptor für recycelte Apolipoproteine, zum größten Teil dem Apo E, und hatte somit einen katalysierenden Effekt für die Retroendozytose-Prozesse der Zelle (Heeren, 1999). Zur Unterscheidung der einzelnen Stoffwechselfraktionen der CM wurde das Chasemedium nach der Chasezeit abgenommen und mittels TCA-Fällung in die recycelten Proteine (Pellet) und die Abbauprodukte (Überstand) der CM aufgetrennt. Zur Bestimmung der in der Zelle verbliebenen Proteine der CM wurden die Zellen mit 0.1N NaOH-Lösung lysiert. Bei allen drei Fraktionen wurden im Anschluss im γ -counter die Radioaktivität bestimmt und es ergaben sich so Werte für Aufnahme (Restradioaktivität der lysierten Zellen), Recycling (Pellet des Chasemediums) und Abbau (Überstand des Chasemediums). Zur späteren Berechnung der absoluten Werte in ng/mg Zellprotein erfolgte die Zellproteinbestimmung mit Hilfe der Methode nach Lowry (siehe 2.3.4.).

Insgesamt wurden vier Experimente mit identisch verwendeten Liganden und nach dem gleichen Versuchsaufbau durchgeführt. Es sollen aus Übersichtsgründen zunächst die Werte in ng/mg Zellprotein anhand eines Versuches dargestellt werden. Da pro

Ligandenansatz jeweils drei Werte ermittelt wurden, sind die in Abbildung 15 und 16 aufgeführten Zahlen gemittelte Werte mit entsprechenden Standardabweichungen.

Da trotz standardisierter Bedingungen zahlreiche Einflüsse (Verwendung unterschiedlich passagierter Zellen, unterschiedliche Lagerungszeiten der Liganden etc.) zu Abweichungen zwischen den absoluten Werten der einzelnen Experimente führten, diese sich aber in prozentual ermittelter Aussage nicht signifikant voneinander unterscheiden, werden im Anschluss für alle vier Versuche die gemittelten prozentualen Werte dargestellt.

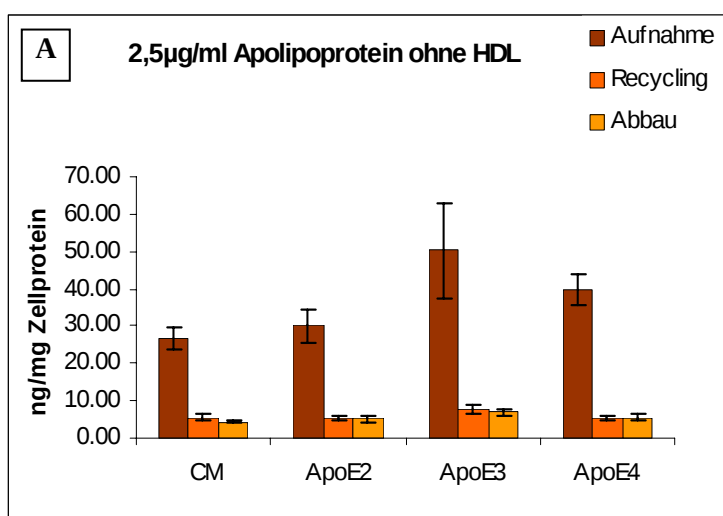
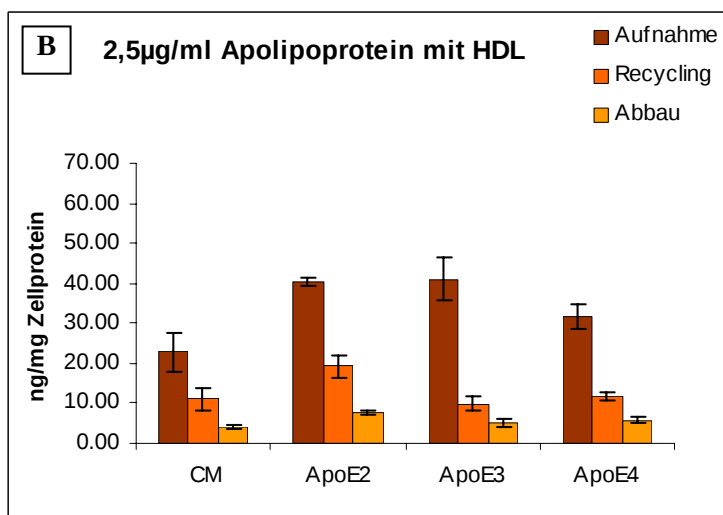


Abbildung 15:
Aufnahme, Recycling und Abbau in ng/mg Zellprotein von Apo E-assoziierten ¹²⁵I-CM unterschiedlicher Isoform im Vergleich, ohne und mit HDL als Recycling-induzierende Chase-Lösung und einer Apo E-Konzentration von 2,5µg/ml

Hepatomazellen wurden für 24h bis zur Subkonfluenz kultiviert und bei 37°C für 60min mit Apo E-angereicherten CM inkubiert. Nach Entfernung von zellgebundenen Liganden erfolgte eine 90min Chasezeit mit reinem Chase-Medium (Abb. 15A) bzw. mit HDL-Chase-Medium (Abb. 15B). Im Anschluss wurde das Chase-Medium in eine TCA-präzipitierbare (Recycling) und eine TCA-lösliche Fraktion (Abbau) getrennt. Mit Hilfe von 0,1N NaOH-Lösung wurden die Zellen zur Messung der Aufnahme lysiert und gleich den Recycling- und Abbaufractionen die jeweilige Radioaktivität im γ-counter für 1min gemessen. Die bestimmte Radioaktivität wurde in ng/mg Zellprotein umgerechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Ligandenansätzen der unterschiedlichen Apo E-Isoformen, mit den sich daraus ergebenden Standardabweichungen.



Abbildungen 15A+B und 16A+B zeigen zunächst im Vergleich Aufnahme, Recycling und Abbau der reinen CM, Apo E_{2/2}-, E_{3/3}- und E_{4/4}-assoziierte CM bei einer Proteinkonzentration von 2,5µg/ml bzw. 25µg/ml mit und ohne HDL als externem Akzeptor. Es lässt sich bei allen die schon bei den IMF-Aufnahmeexperimenten deutlich beobachtete Steigerung der Chylomikronenaufnahme durch zusätzliches Apo E feststellen,

wobei diese nicht so stark ausgeprägt erscheint wie in den IMF-Versuchen. Auch die durch Konzentrationserhöhung erreichte Aufnahmesteigerung in die Zellen ist zwar vorhanden, stellt sich aber nur minimal dar. Ebenso lassen die Recycling- und Abbauwerte keine eindeutige Beeinflussung durch Erhöhung der Apo E-Konzentration erkennen.

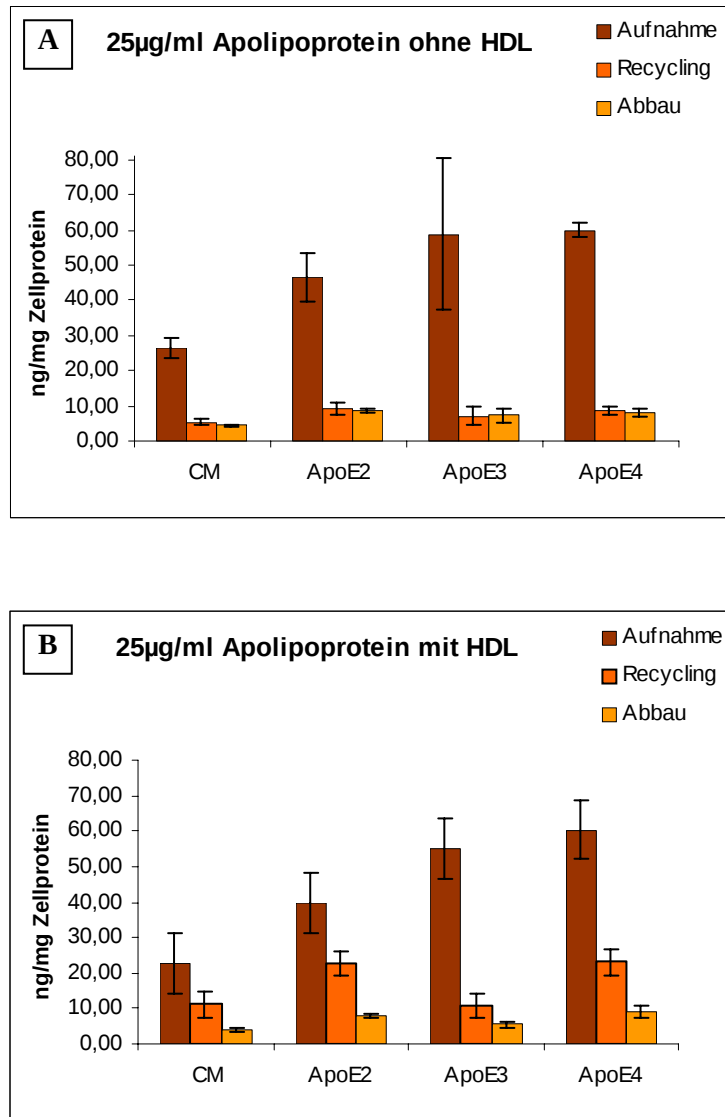


Abbildung 16:
Isoformspezifische Aufnahme, Recycling und Abbau in ng/mg Zellprotein von Apo E-assoziierten ¹²⁵I-CM im Vergleich, ohne und mit HDL als Recycling-induzierende Chase-Lösung und einer Apo E-Konzentration von 25µg/ml

Hepatomazellen wurden für 24h bis zur Subkonfluenz kultiviert und bei 37°C für 60min mit Apo E-angereicherten CM inkubiert. Nach Entfernung von zellgebundenen Liganden erfolgte eine 90min Chasezeit mit reinem Chase-Medium (Abb. 16A) bzw. mit HDL-Chase-Medium (Abb. 16B). Im Anschluss wurde das Chase-Medium in eine TCA-präzipitierbare (Recycling) und eine TCA-lösliche Fraktion (Abbau) getrennt. Mit Hilfe von 0,1N NaOH-Lösung wurden die Zellen zur Messung der Aufnahme lysiert und gleich den Recycling- und Abbaufractionen die jeweilige Radioaktivität im γ-counter für 1min gemessen. Die bestimmte Radioaktivität wurde in ng/mg Zellprotein umgerechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Ligandenansätzen der unterschiedlichen Apo E-Isoformen, mit den sich daraus ergebenden Standardabweichungen.

Vergleicht man die Versuche in Bezug auf den Effekt von HDL (Abb. 15A+16A und Abb. 15B+16B), so zeigt sich eine deutliche Steigerung des Recycling-Prozesses bei allen Inkubationsansätzen. Diese entsprechen jedoch nicht den in anderen Arbeiten beschriebenen bis zu dreifachen Zunahmen (Heeren, 1999). Die gesteigerte Retroendozytose von radioaktiv markierten Partikeln lässt eine Messung verminderter Aufnahmewerte vermuten, die sich auch in den Abbildungen 15B und 16B minimal zeigt. Ausnahme hierzu stellen die Aufnahmewerte von Apo E_{2/2}-assoziierten CM in Abbildung

15B, der ansteigend ist, und Apo E_{4/4} in Abbildung 16B dar, bei dem keine Veränderung der Radioaktivität auftritt. Betreffend des Abbaus lassen sich keine signifikanten Unterschiede zeigen, was für eine komplette Aufnahme der verstärkt exocytierten Partikel durch die HDL spricht.

Betrachtet man die Werte auf Unterschiede in Abhängigkeit der Apo E-Isoformen hin, so zeigt sich bei höheren Konzentrationen von 25µg/ml und einer Aufnahmezeit von 60min die in den IMF-Experimenten beschriebene Tendenz eines Aufnahmeverhaltens $E_{2/2} < E_{3/3} < E_{4/4}$ (Abb. 17). Bei Proteinkonzentrationen von 2,5µg/ml ist jedoch nur ein vermindertes Aufnahmeverhalten von Apo E_{2/2} gegenüber E_{3/3} und E_{4/4} zu entdecken und Apo E_{4/4} zeigt bisherigen Beobachtungen widersprechend eine geringere Endozytose im Vergleich zu Apo E_{3/3}.

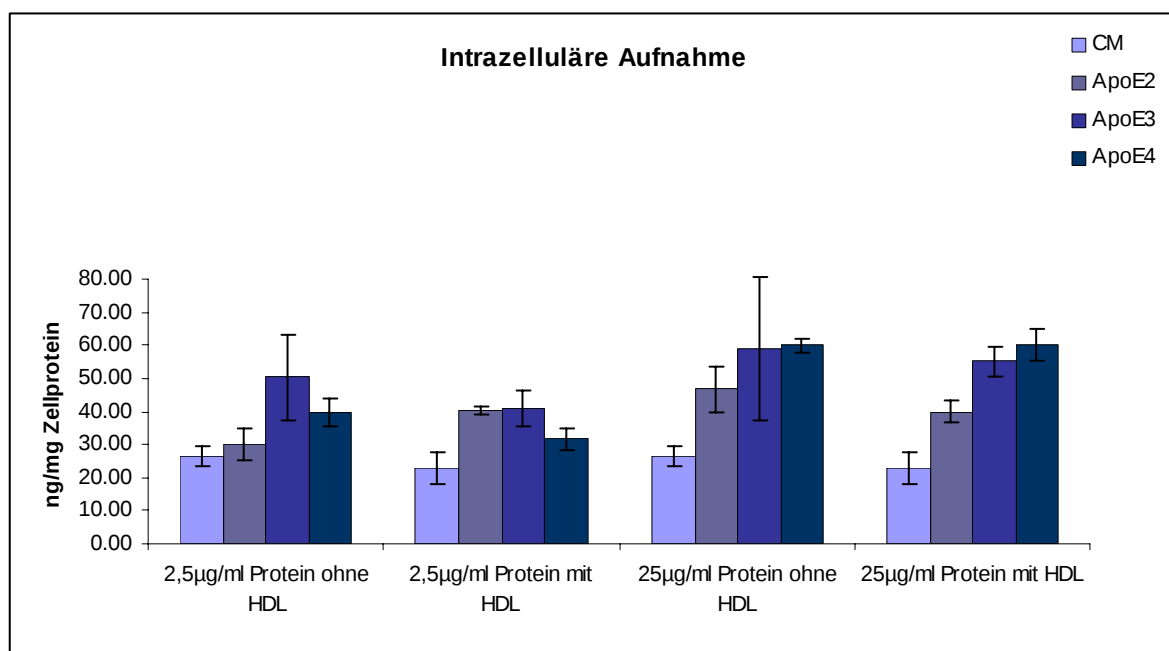


Abbildung 17: Isoformspezifische Aufnahme in ng/mg Zellprotein von Apo E-assoziierten CM auf Hepatomazellen bei 2,5µg/ml und 25µg/ml Proteinkonzentration und Chase-Medium ohne und mit HDL-Zusatz

Hepatomazellen wurden für 24h bis zur Subkonfluenz kultiviert und bei 37°C für 60min mit Apo E-angereicherten CM inkubiert. Nach Entfernung von zellgebundenen Liganden erfolgte eine 90min Chasezeit mit reinem Chase-Medium bzw. mit HDL-Chase-Medium. Im Anschluss wurde das Chase-Medium in eine TCA-präzipitierbare (Recycling) und eine TCA-lösliche Fraktion (Abbau) getrennt. Mit Hilfe von 0,1N NaOH-Lösung wurden die Zellen zur Messung der Aufnahme lysiert und gleich den Recycling- und Abbaufractionen die jeweilige Radioaktivität im γ -counter für 1min gemessen. Die bestimmte Radioaktivität wurde in ng/mg Zellprotein umgerechnet. Gezeigt sind die gemittelten Werte der Aufnahme (Restradioaktivität der lysierten Zelle) von jeweils 3 Ligandenansätzen der unterschiedlichen Apo E-Isoformen mit den sich daraus ergebenden Standardabweichungen.

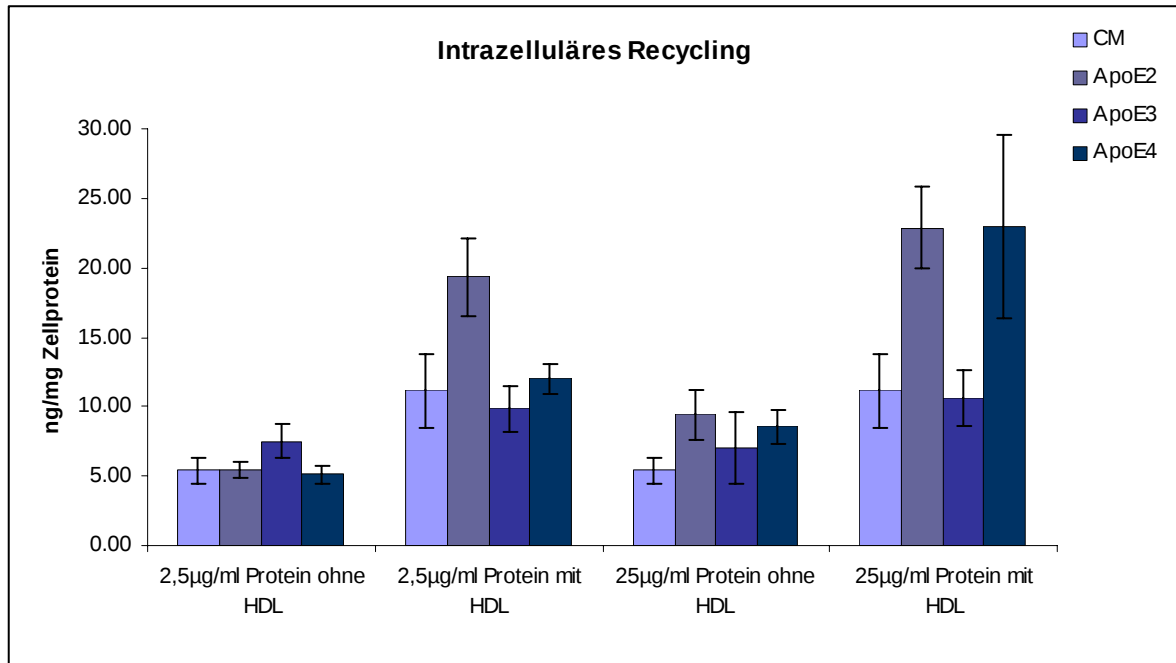


Abbildung 18: Isoformspezifisches Recycling in ng/mg Zellprotein von Apo E-assoziierten CM auf Hepatomazellen bei 2,5 µg/ml und 25 µg/ml Proteinkonzentration und Chase-Medium ohne und mit HDL-Zusatz

Hepatomazellen wurden für 24h bis zur Subkonfluenz kultiviert und bei 37°C für 60min mit Apo E-angereicherten CM inkubiert. Nach Entfernung von zellgebundenen Liganden erfolgte eine 90min Chasezeit mit reinem Chase-Medium bzw. mit HDL-Chase-Medium. Im Anschluss wurde das Chase-Medium in eine TCA-präzipitierbare (Recycling) und eine TCA-lösliche Fraktion (Abbau) getrennt. Mit Hilfe von 0,1N NaOH-Lösung wurden die Zellen zur Messung der Aufnahme lysiert und gleich den Recycling- und Abbaufractionen die jeweilige Radioaktivität im γ -counter für 1min gemessen. Die bestimmte Radioaktivität wurde in ng/mg Zellprotein umgerechnet. Gezeigt sind die gemittelten Werte des intrazellulären Recyclings (präzipitierbare TCA-Fraktion des Chase-Mediums) von jeweils 3 Ligandenansätzen der unterschiedlichen Apo E-Isoformen mit den sich daraus ergebenden Standardabweichungen.

Auch im Vorgang des Recyclings scheint es den Werten in Abbildung 18 nach keine eindeutige Abhängigkeit von der Apolipoprotein E Isoform zu geben. So sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Apo E_{2/2}, E_{3/3} und E_{4/4} zu entdecken. Betrachtet man die isoformspezifischen Unterschiede betreffend des HDL-Effektes, so zeigt sich eine stärkere Recyclingsteigerung bei den Isoformen E_{2/2} und E_{4/4} im Gegensatz zu Apo E_{3/3} (Abb. 18).

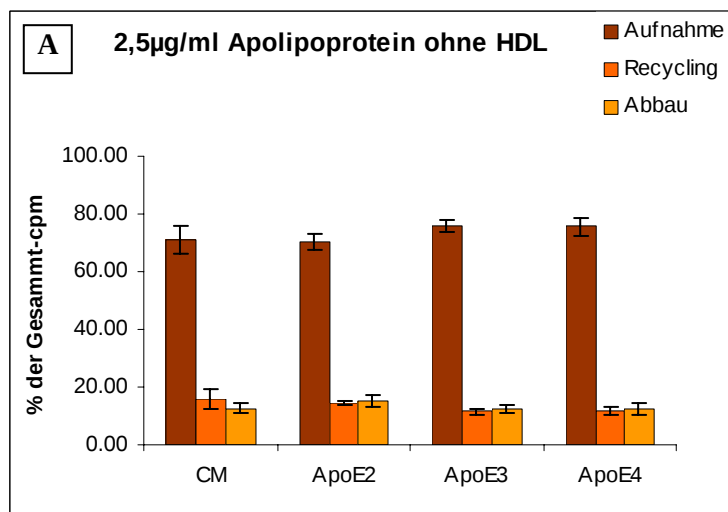
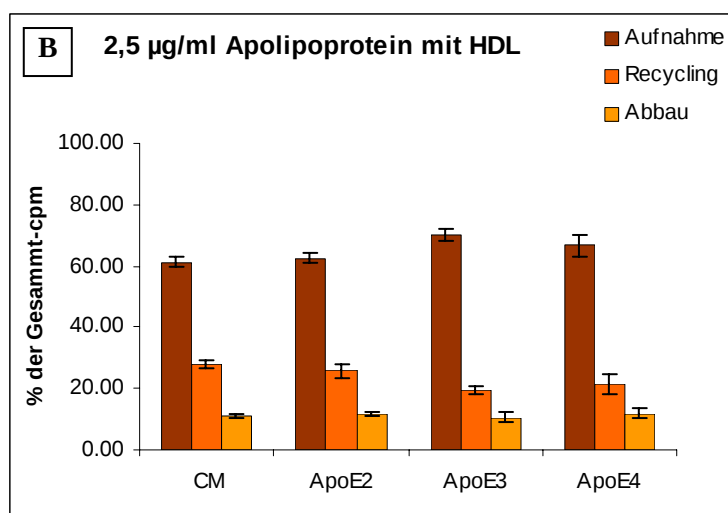


Abbildung 19:
Prozentuale Verteilung von Aufnahme, Recycling und Abbau Apo E-assoziierten ¹²⁵I-CM unterschiedlicher Isoform im Vergleich, bei Chase ohne und mit HDL und einer Apo E-Konzentration von 2,5µg/ml

Hepatomazellen wurden für 24h bis zur Subkonfluenz kultiviert und bei 37°C für 60min mit Apo E-angereicherten CM inkubiert. Nach Entfernung von zellgebundenen Liganden erfolgte eine 90min Chasezeit mit reinem Chase-Medium (Abb. 19A) bzw. mit HDL-Chase-Medium (Abb. 19B). Im Anschluss wurde das Chase-Medium in eine TCA-präzipitierbare (Recycling) und eine TCA-lösliche Fraktion (Abbau) getrennt. Mit Hilfe von 0,1N NaOH-Lösung wurden die Zellen zur Messung der Aufnahme lysiert und gleich den Recycling- und Abbaufractionen die jeweilige Radioaktivität im γ-counter für 1min gemessen. Die Gesamtaufnahme wurde durch Addition der drei Fraktionen bestimmt und auf 100% gesetzt. Daraus errechnen sich die prozentualen Verteilungen der einzelnen Parameter, welche jeweils aus vier Versuchen gemittelt und mit entsprechender Standardabweichung in % der gemessenen Gesamt-cpm angegeben sind.



Um einen direkten Vergleich der Wirkung unterschiedlicher Proteinkonzentrationen, des HDL-Effektes und der Apo E-Isoformen auf Aufnahme, Recycling und Abbau von CM in Hepatomazellen darstellen zu können, wurden folgende Werte gemittelt und in prozentualer Verteilung dargestellt. Abbildungen 19A+B und 20A+B zeigen in Bezug auf die gemessene Gesamtaktivität die prozentuale Verteilung der jeweiligen Fraktion von reinen CM, Apo E_{2/2}-, E_{3/3}- und E_{4/4}-assoziierten CM, bei den Proteinkonzentrationen von 2,5µg/ml und 25µg/ml mit und ohne HDL als externem Akzeptor. In der prozentualen Darstellung zeigt sich bei keiner der Isoformen eine Änderung in Aufnahme-, Recycling- oder Abbauverhalten durch Steigerung der Proteinkonzentration, was bedeutet, dass die Werte proportional zueinander gleich stark anstiegen. Auch lassen sich die Apo E-assoziierten CM in diesem Punkt nicht von den reinen CM unterscheiden (Abb. 19+20).

Betrachtet man die Werte ohne HDL als Akzeptor (Abb. 19A+20A) im Vergleich zu denen, in denen HDL als extrazellulärer Akzeptor vorhanden war (Abb. 19B+20B), so zeigt sich auch im prozentualen Verhältnis eine Verschiebung von Aufnahme zum Recycling hin. Diese tritt bei allen Ansätzen auf und zeigt keinen Unterschied in Abhängigkeit von der zugefügten Apolipoproteinkonzentration.

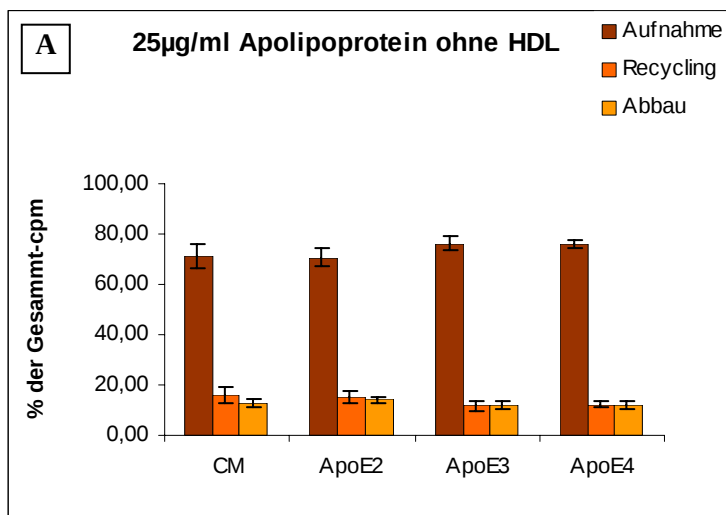
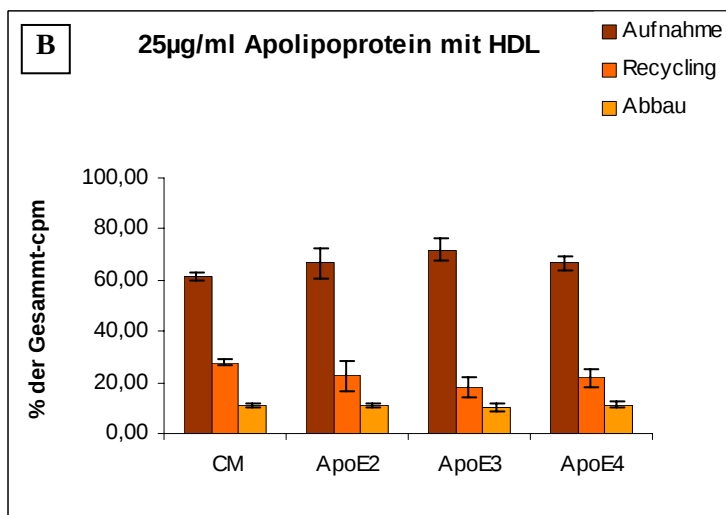


Abbildung 20:
Prozentuale Verteilung von Aufnahme, Recycling und Abbau Apo E-assoziierten ¹²⁵I-CM unterschiedlicher Isoform im Vergleich, bei Chase ohne und mit HDL und einer Apo E-Konzentration von 25µg/ml

Hepatomazellen wurden für 24h bis zur Subkonfluenz kultiviert und bei 37°C für 60min mit Apo E-angereicherten CM inkubiert. Nach Entfernung von zellgebundenen Liganden erfolgte eine 90min Chasezeit mit reinem Chase-Medium (Abb. 20A) bzw. mit HDL-Chase-Medium (Abb. 20B). Im Anschluss wurde das Chase-Medium in eine TCA-präzipitierbare (Recycling) und eine TCA-lösliche Fraktion (Abbau) getrennt. Mit Hilfe von 0,1N NaOH-Lösung wurden die Zellen zur Messung der Aufnahme lysiert und gleich den Recycling- und Abbaufractionen die jeweilige Radioaktivität im γ -counter für 1min gemessen. Die Gesamtaufnahme wurde durch Addition der drei Fraktionen bestimmt und auf 100% gesetzt. Daraus errechnen sich die prozentualen Verteilungen der einzelnen Parameter, welche jeweils aus vier Versuchen gemittelt und mit entsprechender Standardabweichung in % der gemessenen Gesamt-cpm angegeben sind.



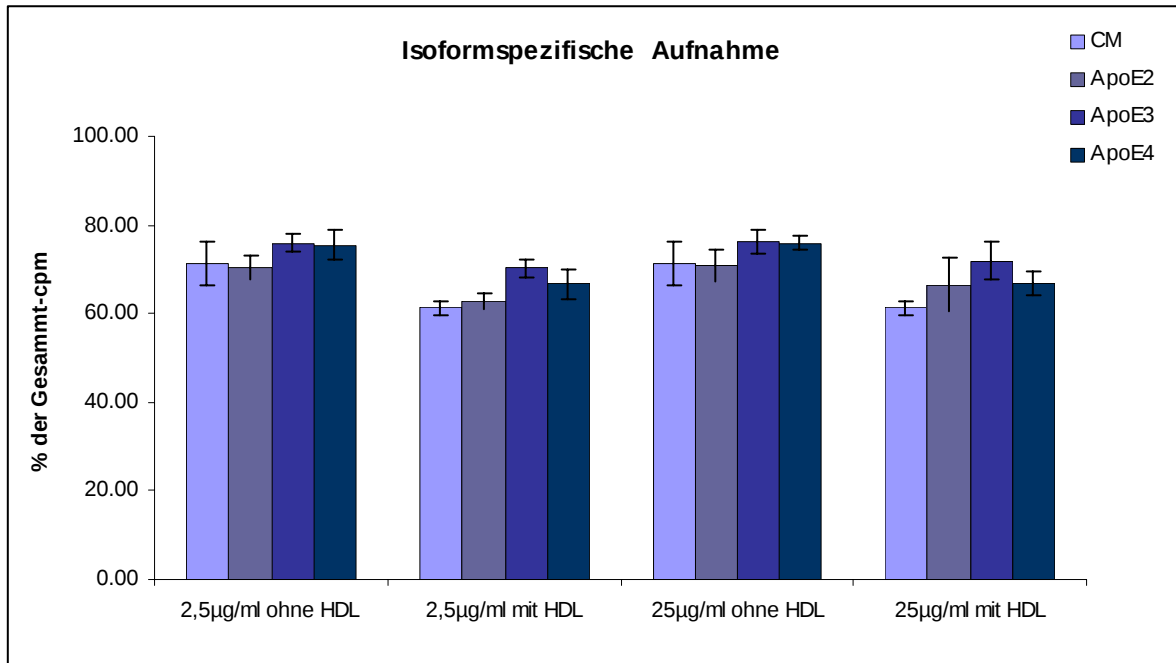


Abbildung 21: Prozentuale Verteilung der isoformspezifischen Aufnahme von Apo E-assoziierten CM auf Hepatomazellen bei 2,5µg/ml und 25µg/ml Proteinkonzentration und Chase-Medium ohne und mit HDL-Zusatz

Hepatomazellen wurden für 24h bis zur Subkonfluenz kultiviert und bei 37°C für 60min mit Apo E-angereicherten CM inkubiert. Nach Entfernung von zellgebundenen Liganden erfolgte eine 90min Chasezeit mit reinem Chase-Medium bzw. mit HDL-Chase-Medium. Im Anschluss wurde das Chase-Medium in eine TCA-präzipitierbare (Recycling) und eine TCA-lösliche Fraktion (Abbau) getrennt. Mit Hilfe von 0,1N NaOH-Lösung wurden die Zellen zur Messung der Aufnahme lysiert und gleich den Recycling- und Abbaufractionen die jeweilige Radioaktivität im γ -counter für 1min gemessen. Daraus errechnet sich der prozentuale Anteil der Aufnahme (Restradioaktivität der lysierten Zellen) aus vier Versuchen gemittelt und mit entsprechender Standardabweichung in % der gemessenen Gesamt-cpm angegeben sind.

Signifikante isoformspezifische Unterschiede zeigen sich in den prozentualen Verteilungen nicht (Abb. 21 und Abb.22). In Abbildung 21 lässt sich erkennen, dass Apo E_{3/3}-assoziierte CM den stärksten Aufnahmeanteil im Vergleich zu den anderen Isoformen besitzt. In Bezug auf das Recycling dagegen zeigt es die geringsten Werte und es stellen sich die reinen CM mit dem höchsten Anteil dar (Abb. 22). Schaut man sich den bei allen Isoformen auftretenden HDL-Effekt genauer an, so zeigt sich auch bei den prozentualen Verteilungen die in den Absolutwerten beschriebene stärkere Recyclingsteigerung von E_{2/2} und E_{4/4} im Vergleich zu E_{3/3} (Abb. 22).

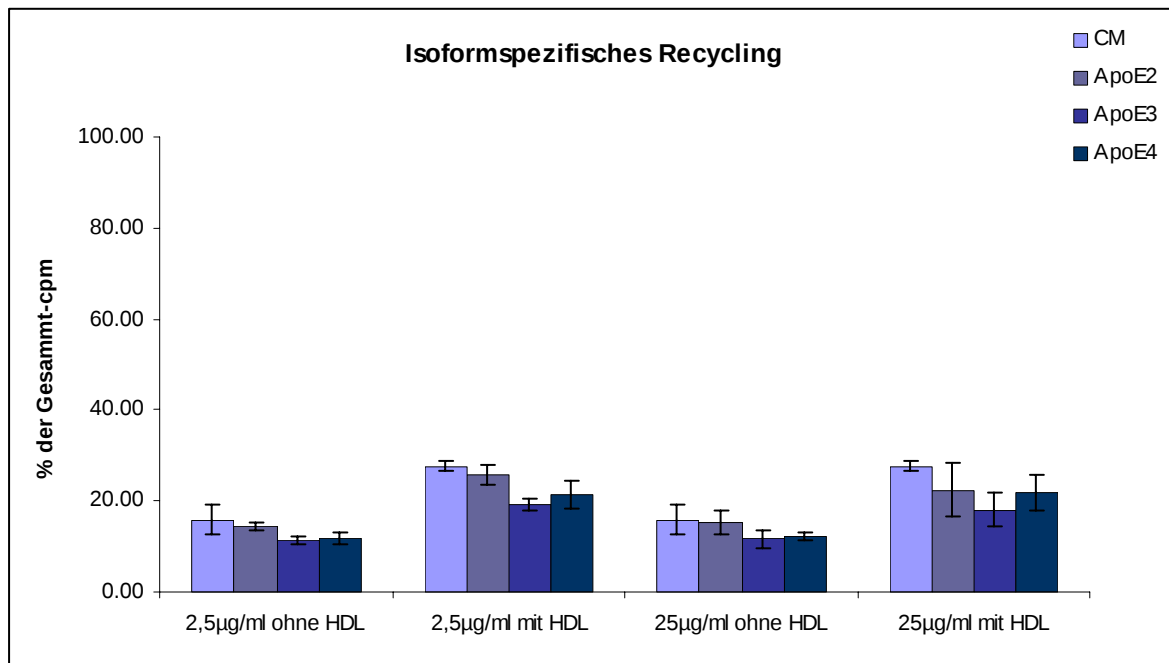


Abbildung 22: Prozentuale Verteilung des isoformspezifischen Recyclings von Apo E-assoziierten CM auf Hepatomazellen bei 2,5µg/ml und 25µg/ml Proteinkonzentration und Chase-Medium ohne und mit HDL-Zusatz

Hepatomazellen wurden für 24h bis zur Subkonfluenz kultiviert und bei 37°C für 60min mit Apo E-angereicherten CM inkubiert. Nach Entfernung von zellgebundenen Liganden erfolgte eine 90min Chasezeit mit reinem Chase-Medium bzw. mit HDL-Chase-Medium. Im Anschluss wurde das Chase-Medium in eine TCA-präzipitierbare (Recycling) und eine TCA-lösliche Fraktion (Abbau) getrennt. Mit Hilfe von 0,1N NaOH-Lösung wurden die Zellen zur Messung der Aufnahme lysiert und gleich den Recycling- und Abbaufractionen die jeweilige Radioaktivität im γ -counter für 1min gemessen. Daraus errechnet sich der prozentuale Anteil des intrazellulären Recyclings (präzipitierbare TCA-Fraktion des Chase-Mediums) aus vier Versuchen gemittelt und mit entsprechender Standardabweichung in % der gemessenen Gesamt-cpm angegeben sind.

3.4.2. IMF Pulse-Chase Experimente

Um die intrazellulären Stoffwechselwege visuell darzustellen, wurden, entsprechend den Aufnahmeexperimenten, IMF Pulse-Chase Versuche auf Hepatomazellen der Zellreihe HUH7 und auf humanen Hautfibroblasten durchgeführt.

Basierend auf den vorhergehenden Aufnahme- und Pulse-Chase-Experimenten wurden für alle folgenden Versuche eine Apolipoprotein E-Konzentration von 50µg/ml und eine Aufnahme- und Chasezeit von jeweils 60min gewählt. Der Versuchsablauf entsprach dem der IMF-Aufnahmeexperimente mit zusätzlichem der Aufnahme direkt folgendem Chase (siehe 2.7.1.). Als extrazellulärer Akzeptor wurde wie in den radioaktiven Experimenten Apo-E-freie HDL_{Non-Binding} eingesetzt.

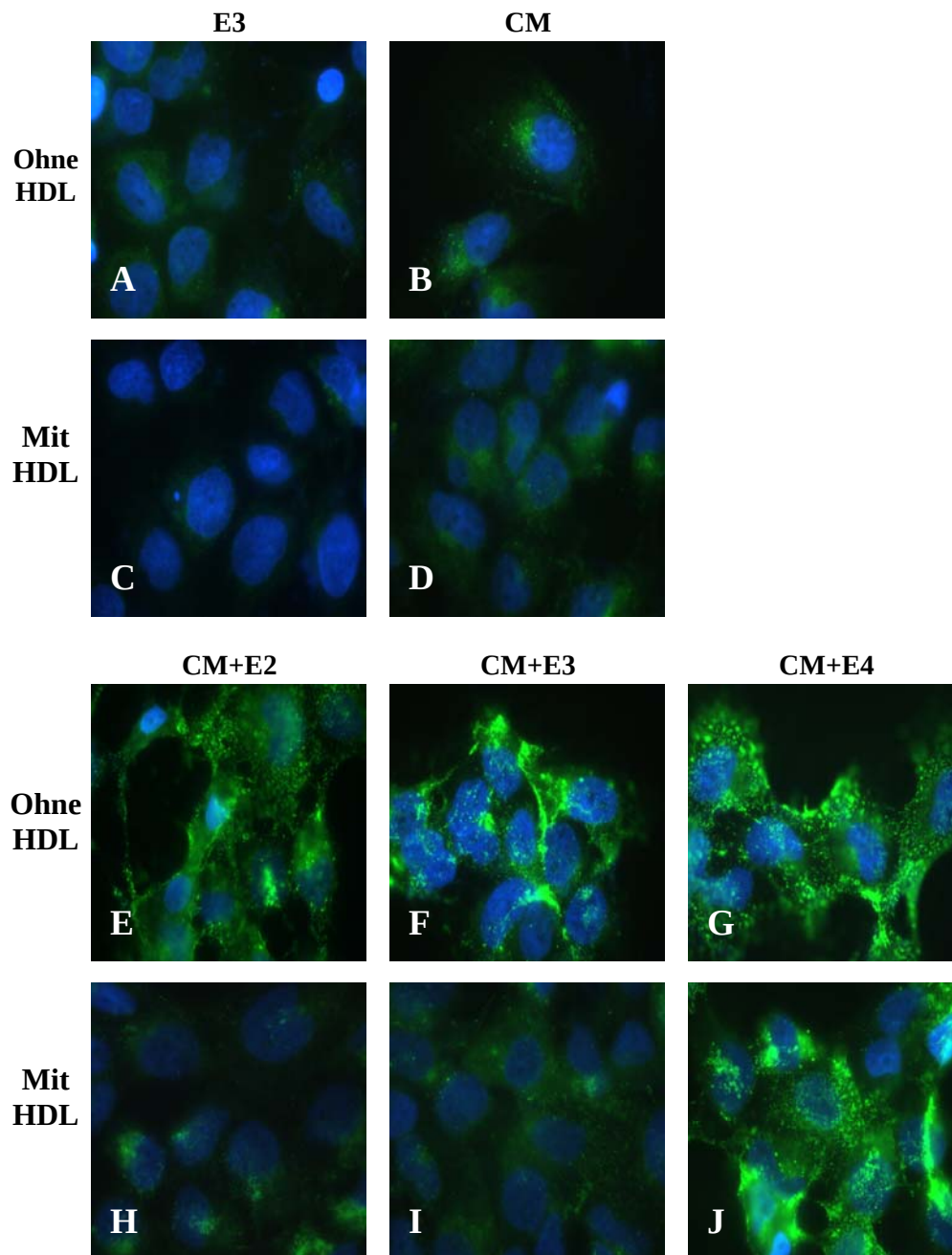


Abbildung 23: Pulse-Chase Experimente auf Hepatomazellen zum Vergleich von HDL induziertem intrazellulären Recycling der Apo E Isoformen

Hepatomazellen wurden für 24h bis zur Subkonfluenz kultiviert. Nach Assoziation mit 50µg/ml Protein je Apo E-Isoform folgte die Inkubation der Zellen bei 37°C für 60min mit den angereicherten CM der unterschiedlichen Isoform. Im Anschluss an ein 90minütiges Chase mit reinem Chase-Medium bzw. mit HDL-Chase-Medium wurden nach Fixierung der Zellen mit PFA-Methanol-Lösung die an der Oberfläche gebundenen Liganden mit Hilfe von Heparin entfernt. Zur Darstellung der endozytierten Partikel erfolgte die Detektion spezieller Antikörper gegen Apo E, gefolgt von DTAF-konjugierten AK gegen Immunglobuline des Kaninchens. Die Markierung der Zellkerne wurde mit DAPI-Kernfärbung durchgeführt (siehe 2.6.1.). Mit dem IMF-Mikroskop konnten bei einer Belichtungszeit von 8000 Millisekunden intrazellulär gelegenes Apo E und dessen Lokalisation in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Apo E Isoformen E_{2/2} (Abb. 23E/H), E_{3/3} (Abb. 23F/I) und E_{4/4} (Abb. 23G/J) unter Zusatz und Weglassen von HDL als extrazellulärem Akzeptor gezeigt werden.

Abbildungen 23A-J zeigen das Pulse-Chase Experiment auf Hepatomazellen mit Detektion des Apolipoprotein E und des Nucleolus.

Betrachtet man zunächst die Inkubation der Zellen mit reinem Apo E_{3/3} (Abb. 23A), so zeigt sich, wie schon in den Aufnahmeversuchen, keine Aufnahme freien Proteins und nahe dem Nucleolus lokalisierte Fluoreszenz deutet wieder auf endogen produziertes Apo E hin. Während sich die Aufnahme von reinen CM nur leicht durch detektiertes Apo E zeigt (Abb. 23B), wurde durch Assoziation mit Apo E wieder eine deutlich verstärkte Aufnahme erreicht (Abb. 23E/F/G). Isoformspezifische Unterschiede lassen sich nur minimal zeigen. So scheinen die fluoreszierenden Partikel bei Apo E_{2/2} in diffuser und leicht geringerer Intensität innerhalb der Zelle aufzutreten (Abb. 23E), während sich bei Apo E_{3/3} und Apo E_{4/4} die schon vorher beobachtete Saumbildung in der Zellperipherie zeigt (Abb. 23F und 23G), zu der bei Apo E_{4/4} noch eine verstärkte Verklumpung der Partikel gegenüber Apo E_{3/3} hinzukommt.

Der Effekt von HDL stellt sich deutlich in den Abbildungen 23C/D und 23H/I dar. So lässt sich in Abbildung 23C kaum noch endogen produziertes Apo E detektieren und auch bei Inkubation mit reinen und Apo E_{2/2}- und E_{3/3}-assoziierten CM zeigt sich eine deutliche Steigerung des Recyclingprozesses (Abb. 23D/H/I). Interessanterweise lässt sich bei Apo E_{4/4}-assoziierten CM mit HDL als Chasemedium (Abb. 23J) eine den ohne HDL zugesetzten Zellen (Abb. 23G) gleich starke Fluoreszenz detektieren. Diese Akkumulation von Protein deutet auf eine verminderte Recyclingfähigkeit der Apo E_{4/4}-Isoform im Vergleich zu Apo E_{2/2} und E_{3/3} hin.

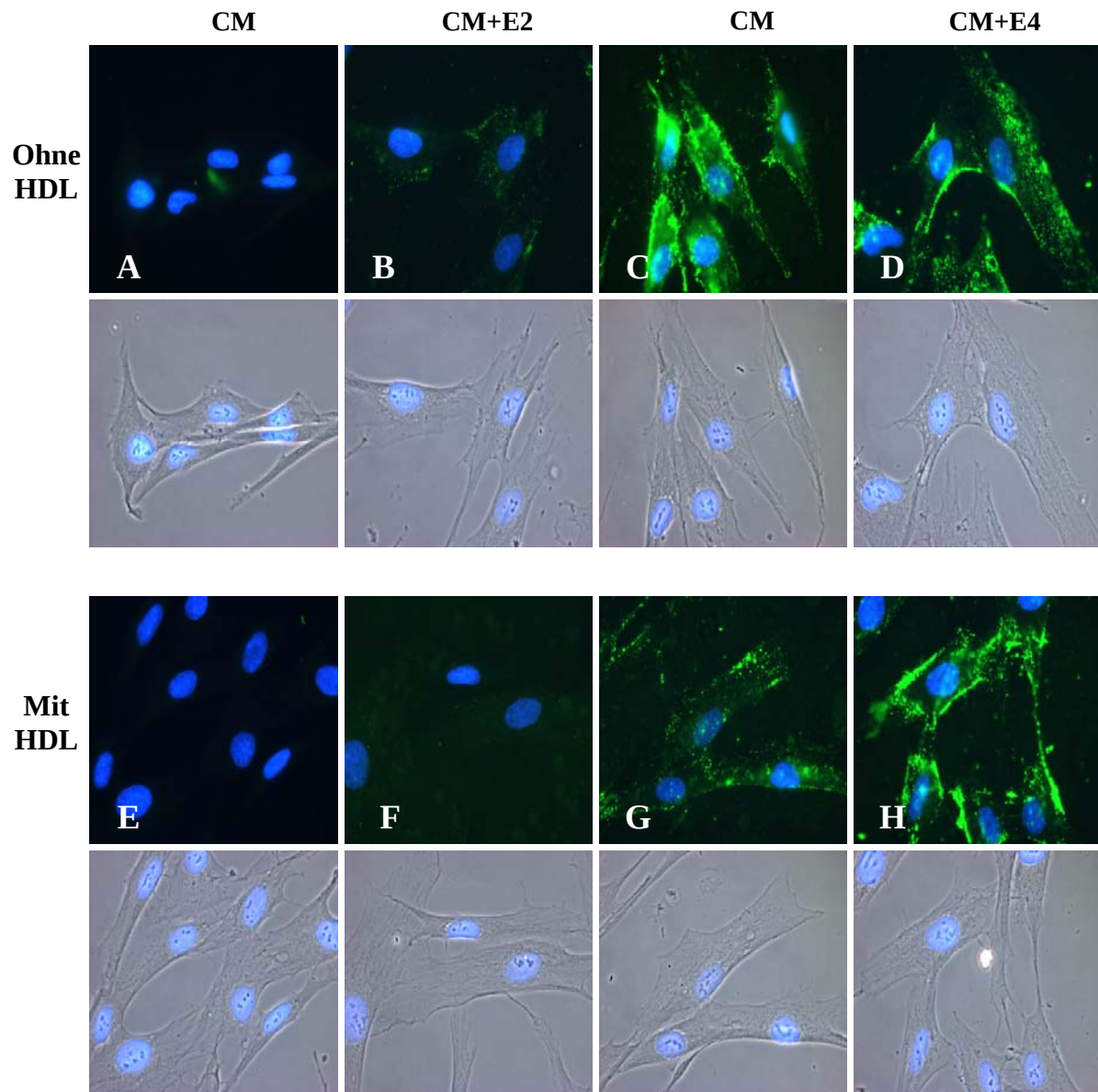


Abbildung 24: Pulse-Chase Experimente auf humanen Hautfibroblasten zum Vergleich von HDL induziertem intrazellulärem Recycling der Apo E Isoformen

Humane Hautfibroblasten wurden für 48h bis zur Subkonfluenz kultiviert. Nach Assoziation mit 50µg/ml Protein je Apo E-Isoform folgte die Inkubation der Zellen bei 37°C für 60min mit den angereicherten CM der unterschiedlichen Isoform. Im Anschluss an ein 90minütiges Chase mit reinem Chase-Medium bzw. mit HDL-Chase-Medium wurden nach Fixierung der Zellen mit PFA-Methanol-Lösung die an der Oberfläche gebundenen Liganden mit Hilfe von Heparin entfernt. Zur Darstellung der endozytierten Partikel erfolgte die Detektion spezieller Antikörper gegen Apo E, gefolgt von DTAF-konjugierten AK gegen Immunglobuline des Kaninchens. Die Zellen selbst und der Nukleolus wurden mit Hilfe von Phasenkontrastaufnahme und DAPI-Kernfärbung dargestellt (siehe 2.6.1.). Die mittels IMF-Mikroskop bei einer Belichtungszeit von 8000 Millisekunden aufgenommenen Bilder zeigen intrazellulär gelegenes Apo E und dessen Lokalisation in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Apo E Isoformen $E_{2/2}$ (Abb. 24B/F), $E_{3/3}$ (Abb. 24C/G) und $E_{4/4}$ (Abb. 24D/H) unter Zusatz und Weglassen von HDL als extrazellulären Akzeptor gezeigt werden.

Versuche auf humanen Hautfibroblasten, die in Abbildung 24 dargestellt sind, ergaben unter exakt gleichen Bedingungen den eben beschriebenen Pulse-Chase Experimenten sehr ähnliche Ergebnisse. Wie in den Aufnahmeexperimenten schon gezeigt, ist kein endogen produziertes Apo E in den Zellen zu detektieren und auch die Aufnahme von reinen CM stellt sich nicht dar (Abb. 24A). Der einzelne fluoreszierende Partikel in Abbildung 24A deutet aufgrund seiner Größe und Homogenität eher auf einen Artefakt hin. Des Weiteren zeigt sich die schon beschriebene leicht geringer scheinende Aufnahme von Apo E_{2/2}-assoziierten CM im Gegensatz zu E_{3/3} und E_{4/4}, während insgesamt die Aufnahme durch Apo gesteigert wird und es bei E_{3/3} und E_{4/4} wieder zur Saumbildung durch Akkumulation des Proteins in der Zellperipherie kommt (Abb. 24B/C/D).

Auch in Bezug auf das Recyclingverhalten gleichen die Ergebnisse stark denen auf Hepatomazellen durchgeführten. So zeigt sich wieder eine eindeutige Entfernung der Fluoreszenz durch Chase mit HDL bei E_{2/2} und E_{3/3} als Ergebnis des verstärkten Recyclings (Abb. 24F und 24G). Bei Apo E_{4/4} kommt es wieder zur deutlichen Akkumulation trotz Chase mit HDL (Abb. 24H).

3.5. HDL induziertes Recycling in Tangier-Fibroblasten

Das sich in den IMF-Pulse-Chase Experimenten darstellende fehlende Recycling von Apolipoprotein E der Isoform E_{4/4} und dessen Akkumulation in der Zellperipherie wirft die Frage nach dem genauen Recyclingprozess von Apo E der endozytierten CM auf. Da, wie erst kürzlich in der Literatur beschrieben, der ABC1-Transporter eine wichtige Funktion beim Apolipoprotein-vermittelten Cholesterinstoffwechsel besitzt, liegt die Annahme nahe, dass dieses Transportsystem auch eine Rolle in Recyclingprozessen von Apolipoprotein E spielt. Aus diesem Grund wurden abschließend zur genaueren Aufklärung dieses Prozesses Pulse-Chase Experimente unter identischen Bedingungen vorausgehender Versuche mit Apo E_{3/3}-assoziierten CM auf Tangier-Fibroblasten im Vergleich zu Normal-Fibroblasten durchgeführt. Tangier-Zellen besitzen einen Defekt im ABC1-Transporter Gen, wodurch es zu mangelnder zellulären Cholesterinverstoffwechselung kommt, welche als Ursache für die Tangier-Erkrankung identifiziert wurde.

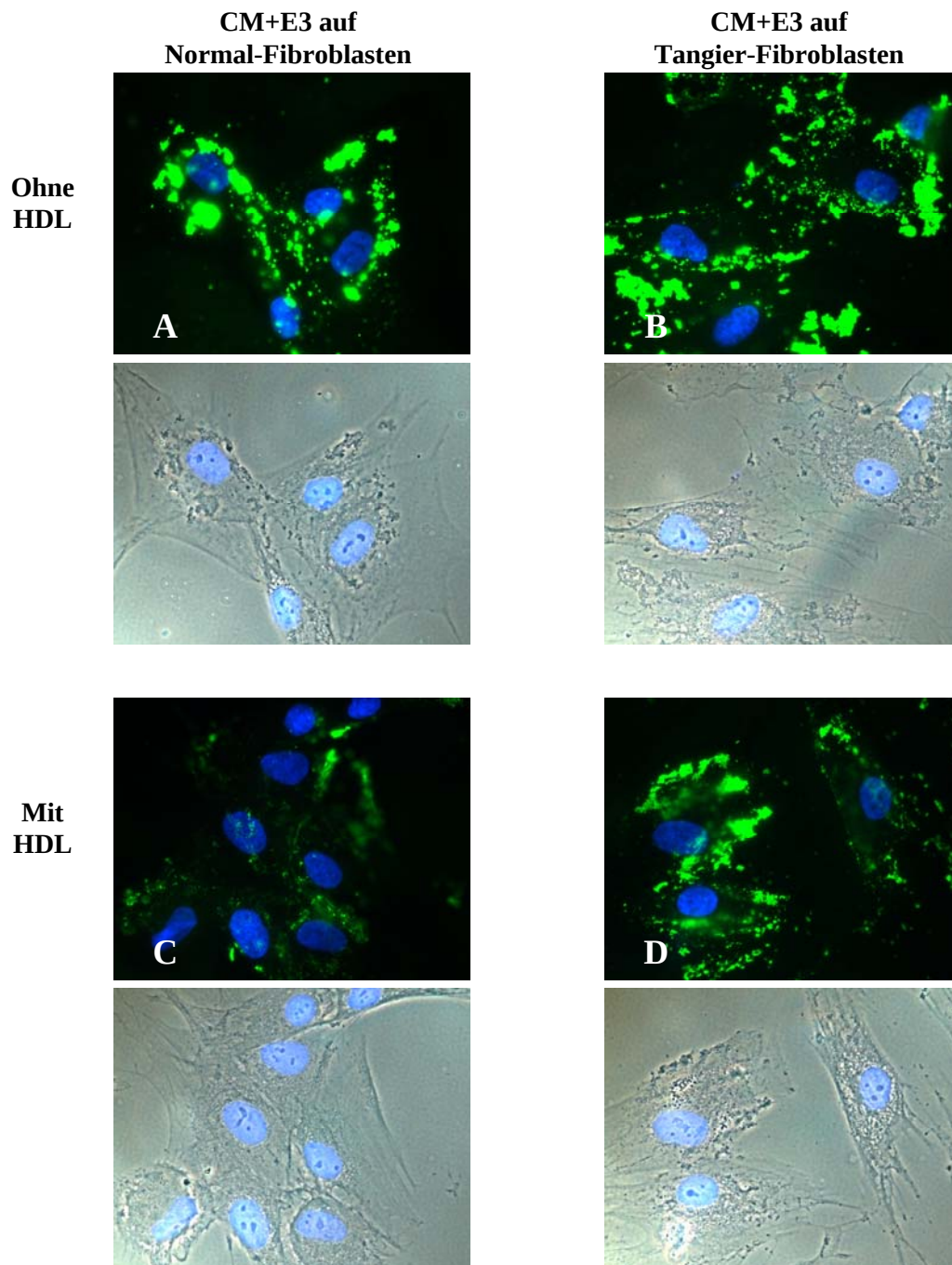


Abbildung 25: Pulse-Chase Experimente auf Normal-Fibroblasten und Tangier-Fibroblasten im Vergleich, zur Untersuchung des intrazellulären Recyclingmechanismus der Apo E Isoform E_{3/3} bei HDL induziertem Recycling

Normale Hautfibroblasten und Tangier-Fibroblasten wurden für 48h bis zur Subkonfluenz kultiviert. Nach Assoziation mit 50µg/ml Protein Apo E_{3/3} folgte die Inkubation der Zellen bei 37°C für 60min mit den Apo E-angereicherten CM. Im Anschluss an ein 90minütiges Chase mit reinem Chase-Medium bzw. mit HDL-Chase-Medium wurden nach Fixierung der Zellen mit PFA-Methanol-Lösung die an der Oberfläche gebundenen Liganden mit Hilfe von Heparin entfernt. Zur Darstellung der endozytierten Partikel erfolgte die Detektion spezieller Antikörper gegen Apo E, gefolgt von DTAF-konjugierten AK gegen Immunglobuline des Kaninchens. Die Zellen selbst und der Nukleolus wurden mit Hilfe von Phasenkontrastaufnahme und DAPI-Kernfärbung dargestellt (siehe 2.6.1.). Die mittels IMF-Mikroskopes bei einer Belichtungszeit von 8000 Millisekunden aufgenommenen Bilder zeigen intrazellulär gelegenes Apo E und dessen Lokalisation auf Normal-Fibroblasten (Abb.25A/C) und Tangier-Fibroblasten (Abb. 25B/D) in Abhängigkeit von HDL als extrazellulärem Akzeptor.

Betrachtet man nun die detektierte Fluoreszenz in Abbildung 25A-D, so lassen sich bei den Normal-Fibroblasten mit und ohne Zusatz von HDL als Akzeptor die schon vorher beschriebenen Recyclingprozesse von Apo E_{3/3} deutlich erkennen (Abb. 25C und 25A). Und auch bei den Tangier-Fibroblasten ohne HDL-Chase erscheint eine den Normal-Fibroblasten vergleichbare starke intrazelluläre Fluoreszenz (Abb. 25B). Im Gegensatz hierzu zeigt sich bei Tangier-Fibroblasten unter Zusatz von HDL eine den Apo E_{4/4}-assoziierten CM der vorhergehenden Versuche ähnliches, fehlendes Recycling- und Akkumulationsverhalten des Proteins (Abb. 25D). Dies lässt auf einen Zusammenhang des ABC1-Transporters mit der Apo E-Retroendozytose der Zellen schließen und somit auch auf eine mögliche Störung dieses Transportsystems bei der Apo E-Isoform E_{4/4}.

3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Um Experimente zum Aufnahme- und Recyclingverhalten von CM in Abhängigkeit von unterschiedlichen Apo E Isoformen durchführen und vergleichen zu können, mussten die verwendeten Liganden und die Apo E Isoformen zunächst isoliert und charakterisiert werden. Anhand photometrischer Cholesterin-, Triglyzerid- und Proteinbestimmung und Auftrennung der Proteinfractionen mittels SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass die gewonnenen und aufgereinigten Lipoproteine bis auf minimale, physiologische Abweichungen den in der Literatur beschriebenen Werten entsprachen und unterschiedliche Präparationen sich in ihrer prozentualen Zusammensetzung glichen. Des weiteren konnte in gelelektrophoretischen Analysen demonstriert werden, dass die einzelnen Apolipoprotein E Isoformen E_{2/2}, E_{3/3} und E_{4/4} sauber isoliert und aufgereinigt wurden und keine Verunreinigung durch andere Proteinanteile entstand, welche zur Beeinflussung der nachfolgenden Experimente hätte führen können.

Bei dem Versuch, heterozygoten Apo E_{2/3}-CM in homozygote Apo E isoformspezifische CM umzuwandeln, wurde zwar eine eindeutige Assoziation der jeweiligen freien Apo E-Isoform an die CM erkannt, dennoch blieben die ursprünglichen Apo E-Banden im IEF-Gel sichtbar und deuteten somit auf eine verbleibende heterozygote Form hin.

Spezifische Untersuchungen zur Aufnahme von CM in Abhängigkeit ihrer Apo E Isoform auf Hepatomazellen und Hautfibroblasten und später durchgeführte Pulse-Chase Experimente zu intrazellulären Recyclingprozessen ergaben eine deutliche

Aufnahmesteigerung der CM durch Assoziation mit freiem Apolipoprotein E. Auch konnte bei IMF-Versuchen die in der Literatur beschriebene verminderte Aufnahme von Apo E_{2/2}-assoziierten CM im Vergleich zu Apo E_{3/3} und E_{4/4} gezeigt werden.

Betrachtet man das intrazelluläre Recycling von Apo E als Bestandteil der CM, so stellte sich durch Zugabe von HDL als extrazellulärem Akzeptor des Proteins eine eindeutige Induktion des Recyclingprozesses in den IMF-Pulse-Chase Experimenten dar. Hierbei ließ sich zwischen den Isoformen E_{2/2} und E_{3/3} kein Unterschied erkennen, während es bei Apo E_{4/4} nicht zu der verstärkten Retroendozytose kam, sondern das Protein intrazellulär erhalten blieb und in der Zellperipherie akkumulierte. Diese Beobachtung führte zu einer abschließenden genaueren Untersuchung des Recycling-Mechanismus durch IMF-Pulse-Chase Experimente auf Tangier-Fibroblasten mit Defekt des ABC1-Transporters im Vergleich zu Normal-Fibroblasten. Dabei konnte bei Inkubation mit Apo E_{3/3}-assoziierten CM auf Tangier-Fibroblasten und Chase mit HDL dieselbe Akkumulation des Proteins in der Zellperipherie entdeckt werden wie bei Apo E_{4/4} auf Normal-Fibroblasten, was auf einen Zusammenhang des ABC1-Transporters mit dem Retroendozytoseprozess von Apo E und einer möglichen Störung des HDL-induzierten Recyclings bei der Apo E_{4/4} Isoform hinweist.

4. Diskussion

Für die Zufuhr von exogener Energie in Form von Nahrungslipiden, spielt der Transport und die Aufnahme der Lipide mittels Chylomikronen eine bedeutende Rolle im menschlichen Fettstoffwechsel. Der Prozess der CM-Aufnahme in die Zelle und der folgende intrazelluläre Stoffwechselweg der einzelnen Lipoproteinanteile wird durch viele unterschiedliche Faktoren beeinflusst und stellt einen sehr komplexen und bis jetzt nur zum Teil aufgeklärten Vorgang dar. Einer der zentralen Faktoren bei der Aufnahme von CM und anderen Lipoproteinen wie VLDL und HDL ist das auf der Oberfläche der Partikel haftende Apolipoprotein E. Da für dieses Protein verschiedene Allele im menschlichen Genom existieren, aus denen sich dem entsprechend unterschiedliche Phänotypen ergeben (Innerarity and Mahley 1978; Innerarity et al., 1984), stellte sich die Frage in welcher Weise die Aufnahme von CM und die intrazelluläre Verstoffwechselung dieser und des Proteins von der jeweiligen Isoform abhängig ist.

4.1. Biochemische Charakteristika von Chylomikronen und Apolipoprotein E

Chylomikronen werden in den Enterozyten des Duodenums aus den zugeführten Nahrungslipiden und Apolipoproteinen gebildet und gelangen über die Lymphbahn in den Blutkreislauf. Dort werden sie durch die an der HSPG der Endothelzellen haftenden LpL hydrolytisch gespalten (Olivecrona and Bengtsson-Olivecrona, 1993; Eisenberg et al., 1992) und gelangen als Chylomikronen-Remnants zur Leber, wo sie nach Anreicherung mit Apo E in einem Rezeptor-abhängigen Prozess in die Leberzellen aufgenommen werden (Beisiegel, 1992; Cooper, 1998). Aufgrund des kurzen postprandialen Zeitraumes, in dem sich die CM vor Internalisierung in die Leber im Blutkreislauf befinden, erweist sich die Isolierung der Partikel als sehr schwierig. So stellte sich die Frage nach einem Liganden, der in seinen physiologischen Bedingungen als möglichst repräsentativ gelten konnte. Wie kürzlich beschrieben, bieten hierfür aus Plasma von Apo C-II-defizienter Patienten isolierte tryglizeridreichen Lipoproteine (TRL) ein gutes Modell für die in Vivo Prozesse (Heeren, 1998). Patienten mit dem seltenen genetischen Defekt der Apo C-II-Defizienz akkumulieren CM pathologisch im Plasma (Beil et al., 1992). Diese konnten

durch Ultrazentrifugation isoliert und im Anschluss charakterisiert werden, um in den folgenden Experimenten als Ligand zu fungieren. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, entsprachen die CM in ihrer Zusammensetzung mit 5,1/7,0% Cholesterin-, 94,4/92,2% Triglyzerid- und 0,5/0,8% Proteinanteil weitgehend den in der Literatur beschriebenen Werten (Gotto et al., 1986; Havel et al., 1955; Kane et al., 1996). Die minimalen Abweichungen lassen sich zum einen mit den nahrungsabhängigen, physiologischen Schwankungen und zum anderen mit Verunreinigung durch VLDL-Partikel und CM- und VLDL-Remnant Partikel erklären, welche sich auf Grund ihrer den CM sehr ähnlichen physikalischen Eigenschaften schwer mittels Ultrazentrifugation voneinander trennen ließen. Für die Experimente spielten sie jedoch nur eine untergeordnete Rolle, da sich zeigte, dass die unterschiedlichen Präparationen in ihrer prozentualen Zusammensetzung übereinstimmten und somit einen Vergleich der unterschiedlichen Isoformen möglich machten. Auch die autoradiographische Darstellung der ¹²⁵I-markierten CM in Abbildung 5 zeigte mit seinen Proteinbanden das charakteristische Apolipoproteinmuster von CM und bestätigte so die Reinheit des isolierten Liganden. So präsentierte sich deutlich das in CM vorherrschende Apolipoprotein E mit seiner entsprechenden Bande im Bereich von 34kDa. Des weiteren konnte Apo C I+III und das FHR-IV (Skerka, 1997) im Gel detektieren werden. Die für die Unterscheidung von CM und VLDL wichtigen Apolipoproteine Apo B₄₈ und B₁₀₀ ließen sich aufgrund ihrer Partikelgröße nicht auf dem 15%igen Gel darstellen; durch die ausgeprägte Bande des Apo E und die prozentuale Zusammensetzung der Partikel konnte jedoch von einer nur geringen Verunreinigung durch VLDL ausgegangen werden.

Die weitere Umwandlung der CM zu Chylomikronen-Remnants und somit zu einer weiteren Annäherung an physiologische Umstände im Stoffwechsel des Menschen wurde aus Gründen der dadurch zusätzlich hinzukommenden unberechenbaren Konstanten im Versuchsaufbau nicht in Betracht gezogen.

Für die Untersuchung isoformspezifischer Unterschiede wurde Apolipoprotein E aus triglyzeridreichem Humanplasma gewonnen und anschließend charakterisiert. Dieses für die Aufnahme von Lipoproteinen in die Zellen bedeutende Protein (siehe 1.3.) kommt in der Bevölkerung aufgrund eines natürlich auftretenden Polymorphismus neben den heterozygoten Formen in den untersuchten homozygoten Isoformen E_{2/2}, E_{3/3} und E_{4/4} vor (Innerarity and Mahley 1978; Innerarity et al., 1984). Wie in Abbildung 7 und 9 gezeigt, konnten die Isoformen in einem komplexen und langwierigen Prozess mittels

Ultrazentrifugation, SDS-Page und Elution aus Plasma der jeweilig vorher bestimmten Apo E-Isoform (siehe 2.4.) ohne Verunreinigung als homozygotes Protein isoliert und aufgereinigt werden. So stellt sich diese Methode trotz großer Mengen benötigten triglyzeridreichen Plasmas als erfolbringend und exakt genug dar.

Um isoformspezifische Unterschiede bei der Aufnahme von CM detektieren zu können, mussten die Liganden die jeweilige homozygote Apo E Isoform besitzen. Die aus dem Apo C II-defizienten Plasma isolierten CM besaßen jedoch den heterozygoten Phänotyp $E_{2/3}$. Wie oben beschrieben, stellt die Gewinnung von Chylomikronen aus Plasma gesunder Menschen an sich schon einen sehr schwierigen Vorgang dar und lässt sich bis jetzt nur aus Apo C II-defizientem Plasma gut isolieren. Zusätzlich treten die Apo E Isoformen $E_{2/2}$ mit 3-12% und $E_{4/4}$ mit 12-18% in einer sehr geringen Häufigkeit in der Bevölkerung auf. Somit stellt die Verwendung von homozygoten CM ein aus technischen Gründen ungeeignetes Versuchsmodell dar. Deswegen wurde versucht, CM durch Inkubation mit einem Überschuss des jeweiligen Apo in isoformspezifische Chylomikronen umzuwandeln. In Abbildung 7 zeigt sich deutlich ein Effekt durch die 60minütige Inkubation mit reinem Apo E. So wurden die schon vorher bestehenden Apo E-Banden der CM verstärkt, während sich durch Inkubation mit Apo $E_{4/4}$ sogar eine zusätzliche Bande detektieren ließ. Damit konnte bewiesen werden, dass die CM mit dem zugesetzten freien Apo E assoziierten, sich die vorhandenen Apo E Isoformen aber nicht kompetitiv verdrängen oder abschwächen ließen.

Somit stellten die modulierten CM kein eindeutiges Modell für die isoformspezifischen Aufnahme- und Recyclingunterschiede dar.

4.2. Experimentelles System

In dieser Arbeit dienten zwei unterschiedliche experimentelle Methoden der Detektion bei ansonsten gleichem Versuchsaufbau als Basis der Untersuchungen. Es wurden zunächst Aufnahmeversuche mit Detektion des Apolipoprotein E mittels Immunfluoreszenz durchgeführt und im Anschluss Pulse-Chase Experimente mit Detektion der radioaktiv markierten CM und IMF-Detektion. Als Grundlage aller Experimente dienten verschiedene Zelllinien, die zur Entwicklung der im Menschen normal auftretenden Rezeptorausprägung

in lipoproteinhaltigem Normalmedium für 24-48h kultiviert wurden (siehe 2.2.). Da mit biologisch aktivem Material gearbeitet wurde, existierten trotz weitgehend standardisierter Versuche unterschiedliche Faktoren, welche die Ergebnisse beeinflussten. So entstammen die kultivierten Zellreihen unterschiedlichen Passagen und können hierdurch Veränderungen in ihren physiologischen Prozessen und Reaktionen aufweisen. Auch glichen die ausgesetzten Zellen trotz einheitlicher Methoden der Zählung und Kultivierung in ihrer Zellzahl und Zelldichte nicht exakt einander und die Verwendung unterschiedlicher Chargen von Inkubations- oder Ligandenmedium mag zusätzlich einen gewisse Rolle gespielt haben.

Gleiches gilt für die aus Humanplasma isolierten Liganden. So unterlagen diese in ihrer Zusammensetzung immer den z.B. durch Variation in der Nahrungsaufnahme auftretenden physiologischen Schwankungen des Spenders. Hinzu kamen durch Isolierung, Art und Zeitraum der Lagerung bedingte Veränderungen. So können trotz Lagerung bei 4° C Unterschiede in den Experimenten durch Alterung und Akkumulation der Chylomikronen auftreten. Die hierdurch in Größe veränderten Partikel können Unterschiede in Aufnahme- und Recyclingverhalten zeigen, wodurch es wiederum zu Abweichungen unter den einzelnen Experimenten kommen kann. Um dieses zu vermeiden, wurden die Ligandenpräparationen jeweils nach 3 Wochen verworfen und neue, nach den oben beschriebenen Verfahren, gewonnen.

Da sich bei der Isolierung der CM die VLDL schwer trennen ließ, kann das unterschiedliche Aufnahmeverhalten der VLDL auch ein Faktor für Abweichungen in den experimentellen Ergebnissen gewesen sein.

Eine weitere Problematik stellten die mit ^{125}I -markierten Chylomikronen für die radioaktiven Assays dar. So kann die Markierung der Partikel mit ^{125}I in geringem Maße variieren und auch der Prozess selbst führt durch Verdünnung der Ligandensuspension zu minimalen Differenzen zwischen den unterschiedlichen Präparationen. Des Weiteren werden im Gegensatz zu den IMF-Experimenten bei den radioaktiven Assays zur Untersuchung des intrazellulären Recyclings alle radioaktiv markierten Anteile der CM detektiert und nicht nur das Apolipoprotein E. Betreffend des Aufnahme- und Recyclinganteils führte dies zu Ungenauigkeiten im Vergleich zu den IMF-Assays, in denen spezifisch das Apo E dargestellt wurde.

4.3. Aufnahme und intrazelluläre Stoffwechselwege von Chylomikronen

Die Aufnahme von Chylomikronen in die Leber stellt einen hoch-spezifischen und komplexen Prozess im menschlichen Organismus dar. Die im Duodenum produzierten CM werden vor Internalisierung in die Leberzellen in mehreren Schritten zu Chylomikronen-Remnants umgewandelt, welche das Hauptsubstrat der rezeptorassoziierten Aufnahme darstellt (siehe 1.1.1.). Durch hydrolytische Spaltung, Austausch von Apolipoproteinen und Anreicherung mit Apo E verändern sich Zusammensetzung, Partikelform und -größe und somit auch das Aufnahmeverhalten in die Zellen. So konnte gezeigt werden, dass TRL-Remnants im Gegensatz zu TRL eine bis zu 3,5fach erhöhte Aufnahme zeigen (Heeren, 1998). Dies kann zum einen durch die Modifizierung der Aufnahmeprozesse durch die partikelassoziierten LpL und durch die weitere Anreicherung der Remnant-Partikel mit Leberzell-sekretierten Apo E („Secretion Recapture“-Modell; Ji et al., 1994a; Kowal et al., 1989; Shimano et al., 1994) erklärt werden. Zum anderen konnte eine finale Modifizierung der Partikel durch die HL gezeigt werden, die zu einer weiteren Steigerung der Aufnahme führt (Heeren, 1998; Krapp et al., 1996; Ji et al., 1994c).

Die in den Versuchen verwendeten Liganden entsprachen somit nicht vollkommen den physiologischen Verhältnissen. Dennoch konnte durch Anreicherung der CM mit Apo E eine Steigerung der Aufnahme gezeigt werden (Abb. 11, 14 und 17), die aber nicht dem in der Literatur beschriebenen Ausmaß entsprach und sich durch die fehlenden Modifikationen der Partikel erklären lässt. Des Weiteren führte möglicherweise die ungenaue Markierung und somit auch Detektion der CM in den radioaktiven Assays zu einer verfälschten quantitativen Aussage, was für eine grundsätzliche Problematik im Aufbau dieser Experimente spricht.

In allen Experimenten ließen sich isoformspezifische Unterschiede erst bei erhöhten Apo E-Konzentrationen und längeren Aufnahmezeiten von 60min darstellen. Dies könnte daran liegen, dass die CM-eigenen heterozygoten Apo E Isoformen weiterhin einen gewissen Einfluss auf die Aufnahme der CM ausübten und dieser Effekt erst bei hohen Konzentrationen von homozygoten Apo E überlagert wurde.

Betrachtet man nun die Unterschiede des Aufnahmeverhaltens in Abhängigkeit der unterschiedlichen Apo E Isoformen, so lassen sich in anderen Arbeiten beobachtete Phänomene bestätigen.

Die mit Apo E_{2/2} angereicherten CM zeigen im Vergleich zu Apo E_{3/3} und E_{4/4} eine verminderte Zellaufnahme in den IMF- und radioaktiven Experimenten (Abb. 14B/F, 17 und 21). Apo E_{2/2} besitzt einen Austausch der AS Arginin zu Cystin an Position 158 in ihrer AS-Sequenz (Zannis et al., 1982; Beisiegel et al., 1992) (siehe 1.3.). Diese mit der Hyperlipoproteinämie Typ III-assoziierten homozygote Form führt in 5-10% der Fälle durch zusätzliche genetisch-, hormonell- und umweltbeeinflusste Faktoren zu schweren Störungen im Lipidhaushalt (Mahley et al., 1988; Utermann et al., 1984). Hervorgerufen durch die Substitution der AS kommt es zu einer Konformationsänderung in der Bindungsdomäne des Apo E, welche eine verminderte Bindungsaktivität gegenüber dem LDL-R und LRP zur Folge hat (Mahley et al., 1995, 1998; Dong et al., 1996). Des Weiteren ergaben neuste Untersuchungen, dass VLDL-Partikel homozygoter Apo E_{2/2}-Patienten nur sehr geringe Konzentrationen von Apo C aufweisen (Mahley et al., 1999). Überträgt man die verringerte Konzentration von Apo C-II als Kofaktor der LpL bei der Partikelaufnahme auf CM, so lässt dies möglicherweise auf einen weiteren, für die verringerte Aufnahme von Apo E_{2/2}-assoziierten CM und die hiermit einhergehende Triglyzeridämie verantwortlichen Faktor schließen (Mahley et al., 1998). Diese Beobachtung zeigte sich aber nicht so deutlich wie in der Literatur beschrieben (Utermann et al., 1987; Guillaume et al., 1995), was möglicherweise durch die oben genannten Restwirkungen des CM-eigenen, heterozygoten Apo E zu erklären ist. Hinzu kommt, wie schon in vergleichbaren Experimenten mit Apo E angereicherten VLDL gezeigt wurde, dass die Kultivierung der Zellen mit lipoproteinhaltigem Nährmedium nicht zu einer reaktiven Hochregulation der Rezeptoren an der Zelloberfläche und somit insgesamt verstärkter Aufnahme führte, wie es unter den in der Literatur beschriebenen Versuchsbedingungen durch lipoproteinfreies Medium geschah. Somit ließen sich hier die geringfügigen Isoformunterschiede bei niedrigen Apo E Konzentrationen nicht darstellen. Zuletzt mag auch wieder die ungenaue Detektion der einzelnen Fraktionen in den radioaktiven Experimenten eine weitere Rolle gespielt haben, da sich im Gegensatz hierzu in den IMF-Versuchen die verminderte Aufnahme als deutlich signifikanter erwies (Abb. 14B/F).

Apolipoprotein E_{4/4} und E_{3/3} hingegen zeigten in den durchgeführten Versuchen keine isoformspezifisch veränderte Aufnahmeverhalten. Weder in den radioaktiven Assays noch in den IMF-Experimenten ließen sich bei unterschiedlichen Konzentrationen und Aufnahmezeiten Differenzen detektieren. Die in vergleichbaren Experimenten mit Apo

E_{4/4}-angereicherten VLDL beobachtete signifikante Steigerung der Aufnahme und die in vivo beobachtete erhöhte Aufnahme von Apo E 4-haltiger Lipoproteine (Gregg et al., 1986) konnte somit nicht eindeutig bestätigt werden. Es zeigten sich bei IMF-Experimenten auf Fibroblasten zwar eine Tendenz zu einem isoformspezifischen Aufnahmeverhalten in der Reihenfolge von E_{2/2}<E_{3/3}<E_{4/4} (Abb. 13 und 14), dies konnte aber weder auf Hepatomazellen noch in radioaktiven Experimenten eindeutig bewiesen werden. Da gleich den Versuchen mit Apo E-angereicherten VLDL das Apolipoprotein E detektiert wurde, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die verstärkt in den Zellen auftretenden fluoreszierenden Apo E_{4/4}-Partikel möglicherweise auf unterschiedliche intrazelluläre Stoffwechselwege deuten und keine Differenzen betreffs der Aufnahme darstellen.

Nach rezeptorvermittelter Endozytose der CM in die Zellen kommt es ligandenspezifisch zu unterschiedlichen intrazellulären Stoffwechselprozessen. So konnten zu den zuerst in der Literatur untersuchten intrazellulären Stoffwechselwegen der LDL kürzlich die Stoffwechselwege von TRL genauer beschrieben werden (Heeren, 1998, Heeren et al., 2001, 2003). Hierbei zeigte sich, dass der in der Literatur beschriebene verminderte lysosomale Abbau der TRL im Gegensatz zu LDL in Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Lokalisation innerhalb der Zelle steht. Partikelassoziierte Apolipoproteine, vor allem das Apo E, wurden weitaus geringer lysosomal abgebaut und statt dessen zu ca. 60% an die Zelloberfläche zurückgeführt und mit HDL re-assoziiert. Sie unterlagen somit also einem Recyclingprozess. Intrazellulär konnten peripher gelegene Recycling-Endosomen identifiziert werden, welche sich in Lokalisation und Funktion von den perinukleären Recycling-Endosomen und den für die Degradation von Lipoproteinanteilen verantwortlichen Lysosomen unterschieden. Es erfolgte vermutlich in frühen Endosomen der Zelle nach Endozytose der TRL eine unterschiedliche Sortierung der Lipide und Apolipoproteinanteile, wobei Apo B₄₈ und die Lipidanteile mit Lysosomen fusionierten, um anschließend abgebaut zu werden, während Apolipoprotein E im Komplex mit Apo C, LpL, LRP und LDL-R. in die Zellperipherie transportiert und folgend zur Zelloberfläche zurückgeführt wurde.

In den nun durchgeführten radioaktiven Experimenten konnten durch Analyse des Chase-Mediums und Detektion von Aufnahme-, Recycling- und Abbaufraction der CM die intrazellulären Stoffwechselprozesse und das Recycling bestätigt werden. Es ließ sich aber auf Grund der Markierungsmethode mit ¹²⁵I eine genaue Bestimmung der einzelnen Fraktionsanteile nicht durchführen. Somit zeigte sich, wie schon in vergleichbar

durchgeführten Versuchen mit Apo E-angereicherten VLDL beschrieben, die Problematik, dass die Recyclingproteine zwar als Apo E und C identifiziert wurden (Heeren, 1998) und die degradierten Anteile, wie in der Literatur beschrieben, vor allem aus Apo B und den Lipidanteilen bestanden, inwiefern aber Unterschiede in Kinetik und Stoffwechselwegen der Proteine die Ergebnisse beeinflussen, ist nicht eindeutig geklärt.

Die visuelle Darstellung der intrazellulären Lokalisation von Apolipoprotein E mittels IMF-Versuchen stellt eine präzisere Methode für die Untersuchung der Stoffwechselwege dieses Proteinanteils der CM und vor allem für den Recyclingprozess dar. Das für den Lipoproteinstoffwechsel sehr wichtige Protein konnte in der Zellperipherie von Hepatomazellen und Fibroblasten detektiert werden, was für die von Heeren 1998 beschriebenen Vorgänge der intrazellulären Sortierung in peripher gelegenen Recyclingendosomen und dessen Retroendozytose spricht. Diese Ergebnisse entsprachen auch denen der kürzlich gezeigten intrazellulären Verstoffwechselung von Apo E-angereicherten VLDL. Ungeklärt blieben allerdings bisher die direkten Retroendozytose-Mechanismen, mit denen die Apolipoproteine wieder zur Zelloberfläche zurückgeführt werden.

4.4. HDL als extrazellulärer Akzeptor für recycelte Apolipoproteine und die Rolle des ABC-1 Transporters

Um unter möglichst physiologischen Voraussetzungen mittels extrazellulären Akzeptors die zu untersuchenden Recyclingprozesse zu induzieren und genaueren Aufschluss über diese zu erhalten, wurde in Pulse-Chase Experimenten 10% HDL als Chase-Suspension verwandt.

HDL spielt eine entscheidende Rolle beim Reversen Cholesterintransport (siehe 1.1.2.). Als naszierende Partikel nimmt sie freies Cholesterin aus den Membranen nichtheptatischer Zellen oder von anderen Lipoproteinen auf und transportiert es nach Anreicherung von Apo E als HDL_E in die Leber. Es konnte gezeigt werden, dass es bei zu geringem oder fehlendem HDL zur Akkumulation von Cholesterin in peripheren Geweben und somit zu diversen pathologischen Veränderungen kommt. So können sich Gewebsmakrophagen zu gefährlichen Schaumzellen entwickeln, welche mit der Entstehung von Atherosklerose in Zusammenhang gebracht werden und auch in neuronalen Zellen stellt die pathologische

Anreicherung von lipidhaltigen Strukturen eine Voraussetzung für gewisse Erkrankungen dar.

Zusätzlich beteiligt sich die HDL an den Übertragungsmechanismen von Apolipoproteinen der Lipoproteine untereinander, welche Voraussetzung für die komplexen Prozesse im Fettstoffwechsel sind.

Die Präparation des Proteins erfolgte wie in Material und Methode gezeigt, durch Ultrazentrifugation von Humanplasma (siehe 2.3.2.). Vor der Charakterisierung der isolierten Partikel wurde das in der HDL enthaltene Apo E nach der Methode nach Mahley und Weisgraber über eine Heparinsefamosäule entfernt (Mahley and Weisgraber, 1980), so dass diese einen hochpotenten Akzeptor für recyceltes Apo E darstellte. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich entsprechen die isolierten Partikel bis auf geringe Abweichungen in ihrer Proteinzusammensetzung den in der Literatur beschriebenen Werten. Der erhöhte Proteinanteil kann für eine leichte Verunreinigung durch Albumin sprechen, dessen Bande sich auch schwach im SDS-Page erkennen ließ (siehe Abb. 6). Hauptsächlich zeigten sich hierbei aber die für HDL charakteristischen Proteinbanden des Apo AI auf einer Höhe von 28,5kDa und die bei „Binding“-HDL, im Gegensatz zu „Non-Binding“-HDL, im 34kDa-Bereich liegende Apo E-Bande.

Funktional entsprach die HDL_{Non-Binding} der in den vorangegangenen Versuchen mit TRL verwendeten HDL als Akzeptor (Heeren, 1998). So ließen sich keine Unterschiede in Potenz oder Interaktion zu Apo E feststellen.

Beobachtungen in den radioaktiven Assays mit und ohne HDL als extrazellulärem Akzeptor ließen vermuten, dass der Effekt von HDL in der Verstärkung des Recyclingprozesses durch Beschleunigung desselben zu Stande kam. So blieb bei Anstieg des Recyclings der Anteil der degradierten CM-Anteile gleich, während die gemessene Restaktivität (Aufnahme) geringfügig abnahm (Abb. 19 und 20) und damit auf eine beschleunigte Retroendozytose hinwies. Es scheint also zu einer Induktion der intrazellulären Prozessierung und der Retroendozytose von Apo E durch extrazellulär vorhandenes HDL zu kommen, was sich auch in den IMF-Experimenten deutlich darstellen ließ. So waren im Gegensatz zu den Zellen ohne HDL-Chase, bei Vorhandensein von HDL als extrazellulärem Akzeptor, die fluoreszierenden Apo E-Partikel kaum noch, bzw. gar nicht mehr in den Zellen zu detektieren (Abb. 23 und 24). Eine Ausnahme hierzu stellte das Apo E_{4/4} dar, auf die aber später noch im Rahmen der isoformspezifischen Unterschiede eingegangen werden soll.

Die Beeinflussung von HDL auf den Apo E-Stoffwechsel erinnert stark an den in der Literatur beschriebenen Einfluss der HDL auf den Reversen Cholesterintransport und verstärkt die bisherige Hypothese, dass Apo E eine entscheidende Rolle im Efflux von Cholesterin aus der Zelle spielt. So konnte zum Beispiel durch Zugabe von extrazellulären Apo E der Cholesterinefflux aus der Zelle gesteigert werden (Barter, 1993; Huang et al., 1994).

Um den Mechanismus des Recyclings von Apo E und den Zusammenhang zwischen diesem und der zellulären Cholesterinabgabe genauer zu verstehen, wurden Versuche auf Tangier-Zellen durchgeführt, welche einen Defekt im ABC1-Rezeptor Gen besitzen und somit diesen nicht an der Zelloberfläche exprimieren. Der ABC1-Transporter wurde vor kurzem als Schlüsselprotein im zellulären Reversen Cholesterintransport identifiziert (Lawn et al., 1999). Er ist vermutlich auf der Zelloberfläche lokalisiert und spielt hier beim direkten Transfer von Cholesterin der Zelle auf Apo A-I enthaltende Partikel eine entscheidende Rolle. Patienten mit der vererblichen Tangier-Krankheit zeichnen sich durch abnorme Plasma-Lipoprotein-Spiegel aus. So weisen sie nur minimal oder keine HDL, bei gleichzeitig bis zu 50% verringerten LDL-Spiegeln und leicht- bis mittelhohen Triglyzeridwerten auf.

In IMF-Versuchen mit Tangier-Fibroblasten und Normal-Fibroblasten (Abb. 25) konnte nun gezeigt werden, dass es bei Defekt des ABC1-Transporters trotz HDL-Chase-Zusatzes zu einer intrazellulären Akkumulation des Apolipoproteins, entsprechend des auf Normalzellen ohne HDL-Zusatz beobachteten Phänomens und der in der Literatur beschriebenen Cholesterinakkumulationen bei Tangier-Patienten kommt. Dies beweist, dass der entscheidende Transport von Apolipoprotein E aus der Zelle über den ABC1-Transporter geschehen muss und es lässt sich somit eine direkte Verbindung zwischen dem Apolipoprotein E und dem Cholesterinefflux herstellen. Intrazellulär könnte Apo E in der Zellperipherie vom oben genannten Recycling-Komplex aus Apolipoproteinen und Rezeptor dissoziieren und nach erneuter Assoziation mit Cholesterin mittels ABC1-Transporter an die Zelloberfläche und anschließend an HDL abgegeben werden. Zur genaueren Untersuchung dieser Vorgänge und zur Klärung, ob das Apo E nur in Verbindung mit Cholesterin oder auch eigenständig transportiert werden kann, bedarf es aber noch weiterer Experimente.

Die Annahme, dass der ABC1-Transporter auch für den Apo E Transport zuständig ist, lässt somit einige frühere Beobachtungen erklären. So beantwortet sich nun z.B. die Frage nach dem veränderte Metabolismus von TRL bei Patienten mit der Tangier-Krankheit (De

Risi et al., 1997). Die Annahme, dass bei Tangier-Kranken die verminderten HDL Spiegel aus mangelnder Cholesterinbeladung der Apo A-I haltigen Lipoproteine und somit frühzeitigen Entfernung aus dem Kreislauf durch das retikuloendotheliale System resultieren, lässt sich auch auf die TRL übertragen, welche durch mangelndes Apo E in ihrer Größe und im Kreislaufvorkommen vermindert sind.

Ob nun beeinflussende Faktoren des Apo E auf den Cholesterinefflux einzig durch Veränderungen während des ABC1-Transport wirken oder Apo E zusätzlich an der Zelloberfläche einen Effekt auf Rezeptoren und Transportmechanismen hat und wie stark diese Einflüsse sich auf den Kreislauf des Reversen Cholesterintransport auswirken, konnte bisher aber nicht eindeutig geklärt werden.

4.5. Isoformspezifische Unterschiede des Apo E Recyclings

Mit zunehmender Aufklärung der zentralen Funktion, die Apo E auf den Cholesterinstoffwechsel ausübt, stellt sich die Frage nach isoformspezifischen Unterschieden des Proteins und ihre Auswirkungen auf den Lipoproteinstoffwechsel. Bisher konnten unterschiedliche Erkrankungen mit Apo E Isoformen in Zusammenhang gebracht werden, wobei die hierfür verantwortlichen pathologischen Mechanismen weitgehend ungeklärt sind, für therapeutische Ansätze aber eine zentrale Bedeutung haben. Wie zuvor beschriebene, ist Apo E_{2/2} mit Hyperlipoproteinämie Typ III und in 5-10% auch mit atherosklerotischen Veränderungen assoziiert. Im Gegensatz zur Aufnahme konnten weder in den radioaktiven-, noch in den IMF-Experimenten Unterschiede in der intrazellulären Prozessierung von Apo E_{2/2} gezeigt werden. Da dies sowohl in Versuchen mit radioaktiv-markierten Partikeln, wie auch in IMF-Versuchen untersucht wurde, kräftigt es die Hypothese, dass die zuvor in ähnlichen Experimenten beobachtete scheinbar verminderte Recyclingfähigkeit von E_{2/2}-assoziierten Lipoproteinen eher auf die Aufnahme- als auf Recyclingunterschiede zurückzuführen ist und sich die verringerte Bindungsaffinität zum LDL-Rezeptor nicht auf intrazelluläre Komplexbildung auswirkt.

Bei Betrachtung der Apo E_{4/4}-Isoform stellt sich nun ein anderes, hoch interessantes Bild dar. Apo E_{4/4} wird heute mit unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen wie die Alzheimer- und die Creutzfeld-Jakob-Krankheit in Zusammenhang gebracht (Namba et al., 1991). So wird vermutet, dass Apo E_{4/4} eine Rolle bei der Entstehung der für die „late

onset“ und sporadischen Alzheimer-Krankheit charakteristischen neuropathologischen Strukturen spielt (Weisgraber et al., 1994). In den IMF-Versuchen konnte nun gezeigt werden, dass, anders als bei Apo E_{2/2} und E_{3/3}, Apo E_{4/4} bei HDL induzierten Chase kein Recycling aufzeigte, sondern intrazellulär akkumulierte. So war in den Pulse-Chase Experimenten bei der Apo E_{4/4} Isoform keine Verminderung der fluoreszierenden Partikel durch HDL Zugaben zu detektieren, wie sie bei den anderen Isoformen deutlich wurde (Abb. 23 und 24). Ganz im Gegenteil zeigt sich die schon vorher beschriebene signifikante Akkumulation des Proteins in der Zellperipherie. Interessanterweise gleicht diese Akkumulation den in den Tangier-Versuchen beobachteten Phänomenen, was Rückschlüsse auf den pathophysiologischen Mechanismus dieser Akkumulation und dem verhinderten Recycling zulässt. Geht man davon aus, dass der ABC1 Transporter für die Retroendozytose des Apo E zuständig ist, könnte der beobachtete Unterschied im Recycling von Apo E_{4/4} auf eine Störung des Transportes dieses Proteins an die Oberfläche zurückzuführen sein. Möglicherweise kommt es durch die veränderte Struktur der Isoform zu Konformationsänderungen des Transportproteins oder dessen Bindungsdomäne und somit zu einer Hemmung des Transportes durch die Zellmembran oder zu einer stark verminderten Affinität von Apo E_{4/4} der Bindungsdomäne gegenüber. Dies deutet daraufhin, dass ein Anteil des ABC1-Transporters intrazellulär gelegen ist, welcher entweder direkt eine Bindungsdomäne für Apo E aufweist oder über 2nd Messenger-Mechanismen aktiviert werden kann. Es scheint also der Recyclingprozess von Apo E_{4/4} an der Stelle der ABC1-transportervermittelten Retroendocytose an die Zelloberfläche und Übertragung auf HDL gestört zu sein, was zu einer Akkumulation in zellmembrannahen Endosomen führt und sich in den IMF-Experimenten als beobachtete periphere Akkumulation der Fluoreszenzpartikel zeigt.

Dies lenkt von dem früher erhobenen Verdacht, dass die intrazelluläre Akkumulation von Apo E_{4/4}, durch im Gegensatz zu E_{2/2} und E_{3/3} verringerte Affinität zu HDL (Dong and Weisgraber, 1996) verursacht wird, etwas ab und verdeutlicht in Anbetracht einer solch signifikanten Hemmung, dass der ABC1-Transporter den Hauptmechanismus für den Recyclingprozess und die dadurch vermittelte erneute Bereitstellung von Apo E für den Lipoproteinstoffwechsel darstellt.

Vergleicht man nun pathologische Veränderungen im Stoffwechsel von Apo E_{4/4}-Trägern mit denen von Patienten, die an der Tangier Krankheit leiden, so lassen sich gewisse Verbindungen im Pathomechanismus erahnen. Während es bei einem Teil der Menschen mit der Apo E_{4/4} Isoform zu den oben beschriebenen neurodegenerativen Erkrankungen

kommt, weisen Tangier-Patienten unter anderen periphere Neuropathien und ein 4-6fach erhöhtes Risiko für koronare Herzkrankheiten (KHK) auf (Hobbs and Rader, 1999; Lawn et al., 1999). Hierbei kommt es in allen Fällen zur Akkumulation von Lipiden oder hiermit assoziierten, pathologischen Strukturen in neuronalen Zellen oder Zellen des retikuloendotheliale Systems. So bilden sich z.B. bei den Apo E_{4/4}-assoziierten neurodegenerativen Erkrankungen pathologische intrazelluläre Neurofilamente und extrazelluläre Plaques von β -Amyloid und bei der Tangier Krankheit akkumulieren Lipide in den Schwan'schen Zellen des neuronalen Systems und in Makrophagen der Gefäß-Endothelien.

Dies deutet auf einen entscheidenden Zusammenhang zwischen der Akkumulation von Apo E_{4/4} und der von Cholesterin. So lässt sich vermuten, dass Apo E_{4/4} durch Affinitätsänderung des ABC1-Transporters oder direkter Interaktion mit Cholesterin einen hemmenden Einfluss auf den transmembranösen Transport im Rahmen des Reversen Cholesterintransportes hat. Oder der Effekt kommt durch mangelnde Bereitstellung von recyceltem Apo E zustande, welcher möglicherweise zu verminderten HDL Spiegeln führt, indem die in ihrer Zusammensetzung veränderten Lipoproteine vermehrt durch das retikuloepitheliale System dem Kreislauf entzogen werden. Wie sich zeigte, entwickeln Apo E_{4/4}-Träger aber nicht genau gleiche Symptome wie Patienten mit der Tangier-Krankheit und es zeigten sich auch nur bei einem geringem Anteil der Träger die assoziierten Erkrankungen. Dies verdeutlicht, dass noch andere Einflüsse eine Rolle bei der Entwicklung der manifesten Erkrankungen spielen und Apo E_{4/4} allein keinen ausreichenden Faktor darstellt.

Der genaue Mechanismus und das Ausmaß des Einflusses sind somit noch nicht eindeutig geklärt und stellen Aufgaben für weitere Forschungen auf diesem Gebiet dar. Die Tatsache, dass isoformspezifische Unterschiede in den radioaktiven Versuchen im Gegensatz zu den signifikanten Ergebnissen der IMF-Experimente nicht zu detektieren waren, wirft Fragen über Spezifität des Versuchsaufbau und der durchgeführten Methode auf und erfordert möglicherweise in später folgenden Experimenten eine Modulation der Detektionsmethode oder des Aufbaus.

5. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten zuvor beschriebene intrazelluläre Recyclingmechanismen von Apo E (Heeren, 1998) genauer untersuchen und den Einfluss der unterschiedlichen Apo E Isoformen auf die zelluläre Aufnahme von Chylomikronen und auf deren intrazellulären Stoffwechsel- und Recyclingprozesse klären. Des Weiteren sollte hierbei der beschriebene Effekt von HDL als extrazellulärer Akzeptor für recycelte Apolipoproteine (Heeren, 1998; Fazio, 1998) genauer beobachtet werden.

Nach Isolierung und Aufreinigung von Chylomikronen und Apolipoprotein E erfolgten zunächst Immunfluoreszenz-Aufnahmeversuche auf Hepatomazellen und Fibroblasten mit unterschiedlichen Aufnahmezeiten und Apo E Konzentrationen und Detektion des Apolipoproteins. Bei der Verwendung von humanen CM als Liganden zeigte sich die in der Literatur beschriebene Aufnahmesteigerung von CM durch Zusatz von Apo E. Isoformspezifische Unterschiede konnten betreffend Apo E_{2/2} gefunden werden. Hier lies sich eine verzögerte Aufnahme nachweisen, die sich aber im Vergleich zu Ergebnissen vorausgegangener Untersuchungen nur leicht ausgeprägt darstellte.

In anschließenden Pulse-Chase-Experimenten auf Hepatomazellen, Normal-Fibroblasten und Tangier-Fibroblasten zum intrazellulären Recycling wurde der Recycling-induzierende Effekt von HDL in radioaktiven- und IMF-Versuchen deutlich gezeigt. Dieser erreichte in den radioaktiven Experimenten nicht die von Heeren beschriebene 60%ige Steigerung (Heeren, 1998), konnte allerdings in den IMF-Experimenten durch signifikante Verminderung der fluoreszenz-markierten Apo E-Partikel in der Zelle verdeutlicht werden. In den durchgeführten IMF-Versuchen auf Tangier-Fibroblasten, welche einen Defekt des für den Reversen Cholesterintransport aus peripheren Zellen verantwortlich gemachten ABC1-Transporter besitzen, erfolgte im Gegensatz zu Normal-Fibroblasten trotz HDL als Chasezusatzes eine Akkumulation von Apo E_{3/3} in der Zellperipherie. Somit konnte der ABC1-Transporter als die für den Recyclingmechanismus von Apo E zuständige transmembranöse Struktur identifiziert werden.

In abschließenden Untersuchungen zu isoformspezifischen Unterschieden im Recycling von Apo E konnte eine Akkumulation von Apo E_{4/4} in Hepatomazellen und Fibroblasten beschrieben werden. Während Apo E_{2/2} und E_{3/3} durch HDL-Induktion weitgehend aus der Zelle entfernt werden konnten sammelten sich fluoreszierende Apo E_{4/4}-Partikel massiv in

der Zellperipherie an und glichen somit dem zuvor bei Tangier-Fibroblasten gezeigten Bild der Apo E Akkumulation.

Die Frage, inwiefern und in welchem Ausmaß diese isoformspezifische, intrazelluläre Akkumulation Ursache für pathologische Veränderungen im intrazellulären Lipidstoffwechsel ist, bleibt in weiteren Experimenten zu klären.

6. Literaturverzeichnis

1. Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H. and Krieger, M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271, 518-520.
2. Aggerbeck, L.P., Wetterau, J.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. and Agard, D.A. (1988) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the amino-terminal (receptor-binding) domain of human apolipoprotein E3 from serum very low density lipoproteins. *J.Mol.Bio.*202, 179-181.
3. Alam, R., Yatsu, F.M., Tui, L. and Alam, S. (1989) Receptor mediated uptake and 'retroendocytosis' of high density lipoproteins by cholesterol-loaded human monocyte-derived macrophages: possible role in enhancing reverse cholesterol transport. *Bioch.Biophys.Acta* 1004, 292-299.
4. Anderson, R.G., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1977) Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10, 351-364.
5. Argraves, K.M., Battey, F.D., MacCalman, C.D., McCrae, K.R., Gafvels, M., Kozarsky, K.F., Chappell, D.A., Strauss, J.F. and Strickland, D.K. (1995) The very low lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type I complex. *J.Biol.Chem.* 270, 26550-26557.
6. Ashcom, J.D., Tiller, S.E., Dickerson, K., Cravens, J.L., Argraves, W.S. and Strickland, D.K. (1990) The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin. *J.Cell.* 110, 1041-1048.
7. Barter, P.J. (1993) High-density lipoproteins and reverse cholesterol transport. *Curr.Opin.Lipidol.* -217.

8. Barter, P.J., Hopkins, G.J. and Calvert, G.D. (1982) Transfer and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. *Biochem.J.* 208, 1-7.
9. Basu, S.K., Ho, Y.K., Brown, M.S., Bilheimer, D.W., Anderson, R.G., Goldstein, J.L. (1982) Biochemical and genetic studies of the apolipoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J.Bio.Chem.* 257, 9788-9795.
10. Beil, F.U., Fojo, S.S., Brewer, H.B.J., Greten, H. and Beisiegel, U. (1992) Apolipoprotein C-II deficiency due to Apo C-II Hamburg: clinical and biochemical features and HphI restriction enzyme polymorphism. *Eur.J.Clin.Invest.* 22, 88-95.
11. Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G. and Stanley, K.K. (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an Apo E-binding protein. *Nature* 341, 162-164.
12. Beisiegel, U., Weber, W. and Bentsson-Olivecrona, G. (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomikrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88, 8342-8346.
13. Beisiegel, U. (1992) Apolipoproteins as ligands for lipoprotein-receptors. In: *Structure and functions of apolipoproteins*, 269-294. Edited by Rosseneu, M., Boca Raton, USA, CRC Press.
14. Beisiegel, U. (1995) Receptors for triglycerid-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. *Curr.Opin.Lipidol.* 6, 177-122.
15. Beisiegel, U., Weber, W., Heeren, J. and Hilpert, J. (1995) Intracellular consequences of chylomikron uptake. *Circulation* 92, 691.
16. Beisiegel, U. and Heeren, J. (1997) Lipoprotein Lipase (EC 3.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *Proc.Nutr.Soc.* 56, 731-737.
17. Brown, M.S., Deuel, T.F., Basu, S.K. and Goldstein, J.L. (1978) Inhibition of the binding of low density lipoprotein to cell surface receptor in human fibroblasts by positively charged proteins. *J.Supramolec.Struc.* 8, 223-234.

18. Brown, M.S., Anderson, R.G. and Goldstein, J.L. (1983) Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* 32, 663-667.
19. Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1983) Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann.Rev.Biochem.* 52, 253-261.
20. Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
21. Bu, G., Williams, S., Strickland, D.K. and Schwartz, A.L. (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue type plasminogen activator. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 7427-7431.
22. Chappell, D.A., Fry, G.L., Waknitz, M.A., Iverius, P.H., Williams, S.E. and Strickland, D.K. (1992) The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor binds and mediates catabolism of bovine milk lipoprotein lipase. *J.Bio.Chem.* 267, 25764-25767.
23. Chappell, D.A., Inoue, I., Fry, G.L., Pladet, M.W., Bowen, S.L., Iverius, P.H., Lalouel, J.M. and Strickland, D.K. (1994) Cellular catabolism of normal very low density lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is induced by the C-terminal domain of lipoprotein lipase. *J.Bio.Chem.* 269, 18001-18006.
24. Chen, W.J., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of low density lipoprotein receptor. *J.Bio.Chem.* 265, 31116-31123.
25. Cooper, A.D. Hepatic uptake of chylomikron remnants. *J.Lip.Res.* 38, 2173-2192.
26. Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921-923.

27. Davignon, J., Gregg, R.E. and Sing, C.F. (1988) Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 8, 1-21.
28. Davis, C.G., Goldstein, J.L., Suedhof, T.C., Anderson, R.G., Russell, D.W. and Brown, M.S. (1987) Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 326, 760-765.
29. De Duve, C. and Wattiaux, R. (1966) Functions of lysosomes. *Ann.Rev.Physiol.* 28, 435-492.
30. DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, M.S. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 24, 680-686.
31. Dolphin, P.J. (1992) Lipolytic enzymes and the role of apolipoproteins in the regulation of their activity. In: *Structure and function of apolipoproteins*, 1st Ed., 296-362. Edited by Rosseneu, M., Boca Raton, USA, CRC Press.
32. Dong, M.L., Wilson, C., Wardell, M., Simmons, T., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H. and Agard, D. (1994) Human apolipoprotein E. the role of Arginin in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *J.Biol.Chem.*, 22358-22865.
33. Dong, M.L. and Weisgraber, K.H. (1996) Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginin 61 and Glutamatic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J.Biol.Chem.* 271, 19053-19057.
34. Dunn, K.W. and Maxfield, F.R. (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J.Cell.Bio.* 117, 301-310.
35. Eisenberg, S. and Olivecrona, T. (1979) Very low density lipoprotein. Fate of phospholipids, cholesterol, and apolipoprotein C during lipolysis in vitro. *J.Lipid.Res.* 20, 614-623.

36. Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivecrona, T. and Vlodavsky, L. (1992) Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparin sulfate on cell surface and extracellular matrix. *J.Clin.Invest.* 90, 2013-2021.
37. Elshourbagy, N., Liao, W.S., Mahley, R.W. and Taylor, J.M. (1985) Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82, 203-207.
38. Fazio, S., Linton, F., Hasty, A.H. and Swift, L.L. (1998) Recycling of apolipoprotein E in mouse liver. *J.Biol.Chem.* 274, 8247-8253.
39. Fernandez-Borja, M., Bellido, D., Vilella, E., Olivecrona, G. and Vilaro, S. (1996) Lipoprotein lipase-mediated uptake of lipoprotein in human fibroblasts: evidence for a LDL receptorindependent internalization pathway. *J.Biol.Chem.* 264, 12462-12466.
40. Fuki, I.V., Kuhn, K.M., Lomazov, I.R., Rothman, V.L., Tuszynski, G.P., Iozzo, R.V., Swenson, T.L., Fisher, E.A. and Williams, K.J. (1997) The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro. *J.Clin.Invest.* 15, 1611-1622.
41. Gafvels, M.E., Caird, M., Britt, D., Jackson, C.L., Patterson, D. and Strauss, J.F. (1993) Cloning of a cDNA encoding a putative human very low density lipoprotein/apolipoprotein E receptor and assignment of the gene to chromosome 9p23. *Somatic.Cell and Molec.Gen.* 19, 557-569.
42. Godyna, S., Liao, G., Popa, L., Stefansson, S. and Argraves, W.S. (1995) Identification of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) as an endocytic receptor for thrombospondin J-1. *J.Cell* 129, 1403-1410.
43. Goldberg, L.J. (1996) Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J.Lipid.Res.* 37, 693-707.

44. Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1974) Binding and degradation of low density lipoprotein by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J.Biol.Chem* 249, 5153-5162.
45. Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W. and Schneider, W.J. (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from LDL receptor system. *Ann.Rev.Cell.* 1, 1-39.
46. Gotto, A.M.J., Pownall, H.J. and Havel, R.J. (1986) Introductions to plasma lipoproteins. *Method.Enzymol.* 128, 3-41.
47. Greenspan, P. and StClair, R.W. (1984) Retroendocytosis of low density lipoprotein. Effect of lysosomal inhibitors on the release of undegraded 125I-low density lipoprotein of altered composition from skin fibroblasts in culture. *J.Biol.Chem* 259, 1703-1713.
48. Gregg, R.E., Zech, L.A., Schaefer, E.J., Stark, D., Wilson, D. and Brewer, H.B.junior (1986) Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *J.Clin.Invest.* 78, 815-821.
49. Griffin, B.A. and Packard, C.J. (1994) Metabolism of VLDL and LDL subclasses. *Curr.Opin.Lipidol.* 5, 200-206.
50. Guillaume, D., Bertrand, P., Dea, D., Davignon, J, and Poirier (1995) Apolipoprotein E and low density lipoprotein binding and internalization in primary cultures of rat astrocytes: isoformspecific alterations. *J.Neurochem.* 66, 2410-2417.
51. Hallmann, D.M., Boerwinkle, E., Saha, N., et al. (1991) The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am.J.Hum.Gen.* 49, 338-349.
52. Havel, R.J., Eder, H.A. and Bragdon, J.H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J.Clin.Invest.* 1345.

53. Havel, R.J., Chao, Y., Windler, E.E., Kotide, L. and Guo, L.S. (1980) Isoform specificity in the hepatic uptake of apolipoprotein E and the pathogenesis of familial dysbetalipoproteinemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77, 4349-4353.
54. Havel, R.J. Kotide, L., Vigne, J.L., et al. (1980) Radioimmunoassay of human arginin-rich apolipoprotein, apolipoprotein E. Concentration in blood plasma and lipoproteins as affected by apoprotein E 3 deficiency. *J.Clin.Invest.* 66, 1351-1366.
55. Havel, R.J. and Hamilton, R.L. (1988) Hepatic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology* 8, 1689-1704.
56. Heegaard, C.W., Simonsen, A.C., Oka, K., Kjoller, L., Christensen, A., Madsen, B., Ellgaard, L., Chan, L. and Andreasen, P.A. (1995) Very low density lipoprotein receptor binds and mediates endocytosis of urokinase-type plasminogen activator-type-1 plasminogen inhibitor complex. *J.Biol.Chem.* 270, 20855-20861.
57. Heeren, J. (1998) Intrazellulärer Stoffwechselweg triglyzeridreicher Lipoproteine. *Biol. Dissertation, Universität Hamburg.*
58. Heeren, J., Weber, W. and Beisiegel, U. (1999) Intracellular processing of endocytosed triglycerid-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J.Cell Sci.* 112, 349-359.
59. Heeren, J., Grewal, T., Jaeckle, S. and Beisiegel, U. (2001) Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J.Biol.Chem.* 276, 42333-42338.
60. Heeren, J., Grewal, T., Laatsch, A., Rottke, D., Rinninger, C.E. and Beisiegel, U. (2003) Recycling of apolipoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J.Biol.Chem.* 278, 14370-14378.

61. Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H. and Standly, K.K. (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kD liver membrane protein closely related to the LPL receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* 7, 4119-4127.
62. Hinshaw, J.E. and Schmidt, S.L. (1995) Dynamin self-assemblies into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374, 190-192.
63. Hobbs, H.H., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1992) Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum.Mutat.* 1, 445-466.
64. Hobbs, H.H. and Rader, D.J. (1999) ABC1: connecting yellow tonsils, neuropathy, and very low HDL. *J.Clin. Invest.* 104, 1015-1017.
65. Hofer, F., Gruenberger, M., Kowalski, H., Machat, H., Huettinger, M., Kuechler, E. and Blass, D. (1994) Members of low density lipoprotein receptors family mediate cell entry of a minor group common cold virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 1839-1842.
66. Huang, Y., VonEckardstein, A., Wu, S., Maeda, N. and Assmann, G. (1994) A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with gamma mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 1834-1838.
67. Hussain, M.M., Kancha, R.X., Zhou, Z., Luchoomun, J., Zu, H. and Bakillah, A. (1996) Chylomikron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochem.Biophys.Acta* 1300, 151-170.
68. Innerarity, T.L and Mahley, R.W. (1978) Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo E-containing lipoproteins as compared to low density lipoproteins. *Biochem.* 17, 1440-1447.
69. Innerarity, T.L., Weisgraber, K.H., Arnold, K.S., Rall, S.C.Jr and Mahley, R.W. (1984) Normalization of receptor binding of apolipoprotein E2. Evidence for modulation of the binding site conformation. *J.Biol.Chem.* 259, 7261-7267.

70. Ignatius, M.J., Gebicke-Harter, P.J., Skene, J.H., Schilling, J.W., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. and Shooter, E.M. (1986) Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83:1125-1129.
71. 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 chylomikron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J.Biol.Chem.*271, 22422-22427.
72. Ishida, B.Y., Albee, D. and Paigen, B. (1990) Interconversion of pre-beta migrating lipoproteins containing apolipoprotein A-I and HDL. *J.Lipid.Res.* 31, 227-236.
73. Jensen, T.G., Moestrup, S.K., Sottrup-Jensen, L., Petersen, C.M. and Gliemann, J. (1988) Receptors for alpha 2-macroglobulin- and pregnancy zone protein- proteinase complexes in the human placental syncytiotrophoblast. *Placenta* 9, 463-477.
74. Ji, Z.S., Brecht, W.J., Miranda, R.D., Hussain, M.M., Innerarity, T.L. and Mahley, R.W. (1993) Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J.Biol.Chem.* 268, 10160-10167.
75. Ji, Z.S., Fazio, S., Lee, Y.L. and Mahley, R.W. (1994a) Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J.Biol.Chem.* 269, 12764-12772.
76. Ji, Z.S., Fazio, S. and Mahley, R.W. (1994b) Variable heparan sulfate proteoglycan binding of apolipoprotein E variants may modulate the expression of type III hyperlipoproteinemia. *J.Biol.Chem.* 269, 13421-13428.
77. Ji, Z.S., Laur, S.J., Fazio, S., Bensadoun, A., Taylor, J.M. and Mahley, R.W. (1994c) Enhanced binding and uptake of remnant lipoproteins by hepatic lipase-secreting hepatoma cells in culture. *J.Biol.Chem.* 269, 1342-13426.

78. Ji, Z.S., Pitas, R.E. and Mahley, R.W. (1998) Different cellular accumulation/redemption of apolipoprotein E mediated by cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J.Biol.Chem.* 273, 13452-13460.
79. Kambouris, A.M., Roach, P.D., Calvert, G.D. and Nestel, P.J. (1990) Retroendocytosis of high density lipoproteins by the human hepatoma cell line, HepG2. *Arteriosclerosis* 10, 582-590.
80. Kan, J.P. (1996) Structure and function of plasma lipoproteins and their receptors. In: *Atherosclerosis and coronary disease*, 89-103. Edited by Fuster, V., Ross, R. and Topol, E.J., Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.
81. Kim, D.H., Ijima, H., Goto, K., Sakai, J., Ishii, H., Kim, H.J., Suzuki, H., Kondo, H., Saeki, S. and Yamamoto, T. (1996) Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in the brain. *J.Biol.Chem.* 271, 8373-8380.
82. Kita, T., Brown, M.S., Watanabe, Y. and Goldstein, J.L. (1981) Deficiency of low density lipoprotein receptor in the liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78, 2268-2272.
83. Kounnas, M.Z., Morris, R.E., Thompson, M.R., Fitzgerald, D.J., Strickland, D.K. and Saelinger, C.B. (1992) The alpha 2 macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes *Pseudomonas* exotoxin A. *J.Biol.Chem.* 267, 12420-12423.
84. Kounnas, M.Z., Argraves, W.S. and Strickland, D.K. (1992) The 39-kDa receptor-associated protein interacts with two members of the low density lipoprotein receptor family, alpha 2 macroglobulin receptor and glycoprotein 330. *J.Biol.Chem.* 267, 21162-21166.
85. Kounnas, M.Z., Henkin, J., Argraves, W.S. and Strickland, D.K. (1993) Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular uptake of prourokinase. *J.Biol.Chem.* 268, 21862-21867.

86. Kowal, R.C., Herz, J., Goldstein, J.L., Esser, V. and Brown, M.S. (1989) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesterol esters derived from apolipoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86, 5810-5814.
87. Krapp, A., Zhang, H., Ginzinger, D., Liu, M.S., Lindberg, A., Olivecrona, G., Hayden, M.R. and Beisiegel, U. (1995) Structural features in lipoprotein lipase necessary for the mediation of lipoprotein uptake into cells. *J.Lipid Res.* 36, 2362-2373.
88. Krapp, A., Ahle, S., Kersting, S., Hua, Y., Kneser, K., Nielsen, M., Gliemann, J. and Beisiegel, U. (1996) Hepatic lipase mediates the uptake of chylomikrons and beta-VLDL into cells via LDL receptor-related protein (LRP). *J.Lipid Res.* 37, 926-936.
89. Kunitake, S.T., Mendel, C.M. and Hennessy, L.K. (1992) Interconversions between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. *J.Lipid Res.* 33, 1807-1816.
90. Lauer, S.J., Walker, D., Elshourbagy, N., Reardon, C.A., Levy-Wilson, B. and Taylor, J.M. (1988) Two copies of the human apolipoprotein C-I gene are linked closely to the apolipoprotein E gene. *J.Biol.Chem.* 263, 7277-7286.
91. 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, 25-31.
92. Mahley, R.W., Innerarity, T.L. and Weisgraber, K.H. (1980) Alteration in metabolic activity of plasma lipoproteins following selective chemical alterations of the lipoproteins. *Ann.NY Acad.Sci.* 348, 265-280
93. Mahley, R.W. and Innerarity, T.L. (1983) Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochem.Biophys.Acta* 737, 197-222.
94. Mahley, R.W. (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622-630.

95. Mahley, R.W. and Hussain, M.M. (1991) Chylomikron and chylomikron remnant catabolism. *Curr.Opin.Lipidol.* 176.
96. Mahley, R.W., Ji, Z.S., Brecht, W.J., Miranda, R.D. and He, D. (1994) Role of heparan sulfate proteoglycans and the LDL receptor-related protein in remnant lipoprotein metabolism. *Ann.NY Acad.Sci.* 737, 39-52.
97. Mahley, R.W., Nathan, B.P. and Pitas, R.E. (1995) Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease *Ann.NY Acad.Sci.* 738.
98. Mahley, R.W. (1996) Heparan sulfate proteoglycans/low density lipoprotein receptor-related protein pathway involved in type III hyperlipoproteinemia and Alzheimer's disease. *Israel.J.Med.Sci.* 32, 414-429.
99. Mahley, R.W., Huang, Y. and Rall, S.C.jr. (1999) Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): Questions, quandaries, and paradoxes. *J.Lipid Res.* 40, 1933-1949.
100. Mann, W.A., Meyer, N., Weber, W., Meyer, S., Greten, H. and Beisiegel, U. (1995) Apolipoprotein E isoforms and rare mutations: parallel reduction in binding to cells and to heparin reflects severity of associated type III hyperlipoproteinemia. *J.Lipid Res.* 36, 517-525.
101. McLean, J.W., Elshourbagy, N., Chang, D.J., Mahley, R.W. and Taylor, J.M. (1984) Human apolipoprotein E mRNA. cDNA cloning and nucleotide sequencing of a new variant. *J.Bio.Chem.* 259, 6498-6504.
102. Meilinger, M., Haumer, M., Szakmary, K.A., Steinboeck, F., Schreiber, B., Goldberg, H. and Huettinger, M. (1995) Removal of lactoferrin from plasma is mediated by binding to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor and transport to endosomes. *Febs.Lett.* 360, 70-74.

103. Miller, K.W. and Small, D.M. (1987) Structure of triglycerid-rich lipoproteins: An analysis of core and surface phases. In: Plasma lipoproteins: New comprehensive biochemistry, Edited by Gotto, A.M.J., Amsterdam, Elsevier Science.
104. Moestrup, S.K. and Gliemann, J. (1989) Purification of the rat hepatic alpha 2 macroglobulin receptor as an approximately 440-kDa single chain protein. *J.Biol.Chem.* 264, 15574-15577.
105. Mukherjee, S., Ghosh, R.N. and Maxfield, F.R. (1997) Endocytosis. *Physiol.Rev.* 77, 759-803.
106. Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E. and Ikeda, K. (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeld-Jakob disease. *Brain.Res.* 541, 163-166.
107. Nathan, B.P., Bellosta, S., Sanan, D.A., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. and Pitas, R.E. (1994) Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 264, 850-853.
108. Nelson, N. (1992) Structure and function of V-ATPases in endocytic and secretory organelles. *J.Exp.Biol.* 172, 149-153.
109. Novak, S., Hiesberger, T., Schneider, W.J. and Nimpf, J. (1996) A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse. *J.Biol.Chem.* 271, 11732-11736.
110. Nykjaer, A., Bentsson-Olivecrona, G., Lookene, A., Moestrup, S.K., Petersen, C.M., Weber, W., Beisiegel, U. and Gliemann, J. (1993) The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta-migrating very low density lipoprotein associated with the lipase. *J.Biol.Chem.* 268, 15048-15055.

111. Olaisen, B., Teisberg, P. and Gedde-Dahl, T. (1982) The locus for apolipoprotein E (Apo E) is linked to the complement C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. *Hum.Gen.* 62, 233-236.
112. Olivecrona, T. and Bentsson-Olivecrona, G. (1993) Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr.Opin.Lipidol.* 196.
113. Oscarsson, J., Ottosson, M., Wiklund, O., et al. (1994) Low dose continuously infused growth hormone results in increased lipoprotein (a) and decreased low density lipoprotein cholesterol concentration in middle-age man. *Clin.Endocrinol. (Oxf)* 41, 109-116.
114. Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Hui, D. and Weisgraber, K.H. (1987) Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B, E (LDL) receptors in the brain. *J.Biol.Chem.* 262, 14352-14360.
115. Pullinger, C.R., North, J.D., Teng, B.B., Rifichi, V.A., Ronhild de Brito, A.E. and Scott, J. (1989) The apolipoprotein B gene is constitutively expressed in HepG2 cells: regulation of secretion by oleic acid, albumin, and insulin, and measurement of the mRNA half life. *J.Lipid Res.* 30, 1065-1077.
116. Rall, S.C.J., Weisgraber, K.H. and Mahley, R.W. (1982) Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J.Biol.Chem.* 257, 4171-4178.
117. Rall, S.C.J., Weisgraber, K.H. and Mahley, R.W. Isolation and characterization of apolipoprotein E. *Methods in Enzymology* 128, 273-287.
118. Raychowdhury, R., Niles, J.L., McCluskey, R.T. and Smith, J.A. (1989) Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor. *Science* 244, 1163-1165.
119. Rothman, J.E. and Schmid, S.L. (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell* 46, 5-9.

120. Rothman, J.E. (1994) Mechanism of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
121. Rubinstein, A., Gibson, J.C., Paterniti, J.R.J., Kakis, G., Little, A., Ginsberg, H.N. and Brown, W.V. (1985) Effect of heparin-induced lipolysis on the distribution of apolipoprotein E among lipoprotein subclasses. Studies with patients deficient in hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase. *J.Clin.Invest.* 75, 710-721.
122. Russel, D.W., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1989) Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. *J.Biol.Chem.* 264, 21682-21688.
123. Saito, A., Pietromonaco, S., Loo, A.K. and Faquhar, M.G. (1994) Complete cloning and sequencing of ret gp330/"megalin", a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene. *J.Biol.Chem.* 269, 2173-2182.
124. Saunders, A.M. and Roses, A.D. (1993) Apolipoprotein E4 allele frequency, ischemic cerebrovascular disease, and Alzheimer's disease. *Stroke* 24, 1416-1417.
125. Sehayek, E. and Eisenberg, S. (1991) Mechanism of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglycerid-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J.Biol.Chem.* 266, 18259-18267.
126. Shafi, S., Brady, S.E., Bensadoun, A. and Havel, R.J. (1994) Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomikron remnants in rat liver. *J.Lipid Res.* 35, 709-720.
127. Shimano, H., Namba, Y., Ohsuga, J., Kawamura, M., Yamamoto, K., Shimado, M., Gotoda, T., Harada, K., Yakazi, Y. and Yamada, N. (1994) Secretion-recapture process of apolipoprotein E in hepatic uptake of chylomikron remnants in transgenic mice. *J.Clin.Invest.* 93, 2215-2223.
128. Shore, V.G. and Shore, B. (1973) Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochem.* 12, 502-507.

129. Skerka, C., Hellwage, J., Weber, W., Tilkorn, A., Buck, F., Marti, T., Kampen, E., Beisiegel, U. and Zipfel, P.F. (1997) The human factor H-related protein 4 (FHR-4). A novel short consensus repeat-containing protein is associated with human triglycerid-rich lipoproteins. *J.Biol.Chem.* 272, 5626-5634.
130. Smith, J.D., Melian, A., Leff, T. and Breslow, J.L. (1988) Expression of human apolipoprotein E gene is regulated by multiple positive and negative elements. *J.Biol.Chem.* 263, 8300-83008.
131. St Clair, R.W. and Beisiegel, U. (1997) What do all the apolipoprotein E receptors do? *Curr.Opin.Lipidol.* 8, 243-245.
132. Stoorvogel, W., Strous, G.J., Geuze, H.J., Oorshot, V. and Schwartz, A.L. (1991) Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 65, 417-427.
133. Stefansson, S., Chappell, D.A., Argraves, K.M., Strickland, D.K. and Argraves, W.S. (1995a) Glycoprotein 330/low density lipoprotein receptor-related protein-2 mediates endocytosis of low density lipoproteins via interaction with apolipoprotein B100. *J.Biol.Chem.* 270, 19417-19421.
134. Stefansson, S., Kounnas, M.Z., Henkin, J., Mallampalli, R.K., Chappell, D.A., Strickland, D.K. and Argraves, W.S. (1995b) GP 330 on type II pneumocytes mediates endocytosis leading to degradation of pro-urokinase, plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase-plasminogen activator inhibitor-1 complex. *J.Cell* 108, 6-8.
135. Steinwrder, M. (2002) Biochemische und zellbiologische Untersuchung zum intrazellulären Stoffwechsel von Apolipoprotein E-Isoformen auf humanen Hepatomazellen. Med. Dissertation, Universität Hamburg.
136. Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., et al. (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 8098-8102.

137. Swandt, P., Richter, W.O., Parhofer, K.G. (1995) Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, 2. Aufl.. Schattauer, Stuttgart, New York.
138. Tabas, L. (1995) The stimulation of cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages. *Curr.Opin.Lipidol.* 6, 260-268.
139. Takahashi, S., Kawarabayasi, I., Nakai, T., Sakai, J. and Yamamoto, T. (1992) Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 9252-9256.
140. Takahashi, S., Suzuki, J., Kohno, M., Oida, K., Tamai, T., Miyabo, S., Yamamoto, T. and Nakai, T. (1995) Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J.Biol.Chem.* 270, 15747-15754.
141. Tso, P. and Balint, J.A. (1986) Formation and transport of chylomikrons by enterocytes to the lymphatics. *Am.J.Physiol.* 250, t-26.
142. Turnhofer, H., Schnabel, J., Betz, M., Lipka, G., Pidgeon, C. and Hauser, H. (1991) Cholesterin-transfer protein located in the intestinal brush-boarder membrane. Partial purification and characterization. *Biochem.Biophys.Acta* 1064, 275-286.
143. Utermann, G., Jaeschke, M. and Menzel, J. (1975) Familial hyperlipoproteinemia type III: deficiency of specific apolipoprotein (apo E-III) in the very low density lipoproteins. *FEBS Lett.* 46, 352-355.
144. Utermann, G. (1975) Isolation and partial characterization of arginine-rich apolipoproteins from human plasma very low density lipoproteins: apolipoprotein E. *Hoppe Seylers Z Physiol.Chem.* 356, 1113-1121.
145. Utermann, G., Hees, M. and Steinmetz, A. (1977) Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man. *Nature* 269, 604-607.

146. Utermann, G., Weber, W. and Beisiegel, U. (1979) Different Mobility in SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of apolipoprotein E from phenotypes apo E-N and apo E-D. *FEBS Lett.* 101, 21-26.
147. Utermann, G., Kindermann, I., Kaffarnik, H. and Steinmetz, A. (1984) Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Hum.Gen.* 65, 232-236.
148. Vandenbrouck, Y., Janvier, B., Lorient, C., Berezait, G. and Mangeney-Andreani, M. (1994) The modulation of apolipoprotein E gene expression by 3,3'-5'-triiodothyronine in HepG2 cells occurs at transcriptional and posttranscriptional levels. *Eur.J.Biochem.* 224, 463-471.
149. Willnow, T.E., Goldstein, J.L., Orth, K., Brown, M.S. and Herz, J. (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 binds similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomikron remnant clearance. *J.Biol.Chem.* 267, 26172-26180.
150. Watanabe, Y., Inaba, T., Shimano, H., Gotoda, T., Yamamoto, T., Mokuna, H., Sato, H., Yazaki, Y. and Yamada, N. (1994) Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages. Possible involvement in the atherosclerotic process. *Arterioscler.Thromb.* 14, 1000-1006.
151. Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L. and Mahley, R.W. (1982) Abnormal lipoprotein receptor binding activity of human apolipoprotein E due to cysteine-arginine interchanges at a single site. *J.Biol.Chem.* 257, 2518-2521.
152. Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., Harder, K.J., Mahley, R.W., Milne, R.W., Marcel, Y.I. and Sparrow, J.T. (1983) The receptor binding of human apolipoprotein E. Monoclonal antibody inhibition of binding. *J.Biol.Chem.* 258, 12348-12354.
153. Weisgraber, K.H., Rall, S.J.C., Mahley, R.W., Milne, R.W., Marcel, Y.I. and Sparrow, J.T. (1986) Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J.Biol.Chem.* 261, 2068-2076.

154. Weisgraber, K.H. and Rall, S.J.C. (1987) Human apolipoprotein B-100 heparin-binding sites. *J.Biol.Chem.* 262, 11097-11103.
155. Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., Kowal, R.C., Herz, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1990) Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J.Biol.Chem.* 265, 22453-22459.
156. Weisgraber, K.H. (1994) Apolipoprotein E: structure-function relationship. *Adv.Protein.Chem.* 45, 249-302.
157. Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Rall, S.J.C. and Weisgraber, K.H. (1988) Human apolipoprotein E E3 in aqueous solution. Evidence for two structural domains. *J.Biol.Chem.* 263, 6240-6248.
158. Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Bouma, M.E., Eisenberg, C., Munck, A., Hermier, M., Schmitz, J., Gay, G., Rader, D.J. and Gregg, R.E. (1992) Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 258, 99-1001.
159. Willnow, T.E., Goldstein, J.L., Orth, K., Brown, M.S. and Herz, J. (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complex and lactoferrin, an inhibitor of chylomikron remnant clearance. *J.Biol.Chem.* 267, 26172-26180.
160. Willnow, T.E., Sheng, Z., Ishibashi, S. and Herz, J. (1994) Inhibition of hepatic chylomikron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science* 264, 1471-1474.
161. Wilson, C., Wardell, M.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. and Agard, D.A. (1991) Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 252, 1817-1822.

162. Wolf, B.B., Lopes, M.B., Vandenberg, S.R. and Gonias, S.L. (1992) Characterization and immunohistochemical localization of alpha 2-macroglobulin receptor (low density lipoprotein receptor-related protein) in human brain. *Am.J.Pathol.* 141, 37-42.
163. Yamada, N., Shames, D.M., Takahashi, K. and Havel, R.J. (1988) Metabolism of apolipoprotein B-100 in large very low density lipoproteins of blood plasma. Kinetic studies in normal and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J.Clin.Invest.* 82, 2106-2113.
164. Yamamoto, T., Hoshino, A., Takahashi, S., Kawarabaysi, Y., Lijima, H. and Sakai, J. (1995) The role of the very low density lipoprotein receptor in the metabolism of plasma lipoproteins containing Apo E. *Ann.NY Acad.Sci.* 748, 217-224.
165. Yamazaki, H., Bujo, H., Kusonoki, J., Seimiya, K., Kanaki, T., Morisaki, N., Schneider, W.J. and Saito, Y. (1996) Elements of neural adhesion molecules and yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J.Biol.Chem.* 271, 24761-24768.
166. Zannis, V.I., Just, P.W. and Breslow, J.L. (1981) Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am.J.Hum.Genet.* 33, 11-24.
167. Zannis, V.I., Breslow, J.L., Utermann, G., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Havel, R.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Schonfeld, G., Hazzard, W.R. and Blum, C. (1982) Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J.Lipid.Res.* 23, 911-914.
168. Zannis, V.I., McPherson, J., Goldberger, G., Karathanasis, S.K. and Breslow, J.L. (1984) Synthesis, intracellular processing, and signal peptide of human apolipoprotein E. *J.Biol.Chem.* 259, 5495-5499.
169. Zannis, V.I., Kardassis, D., Hadzopoulou-Cladaras, M., Zanni, E.E. and Cladaras, C. (1992) Molecular biology of the human apolipoprotein genes: gene regulation and structure/function relationship. *Curr.Opin.Lipidol.* 3, 96-113.

7. Abkürzungsverzeichnis

α	Anti
ACAT	Acyl-CoenzymA-Cholesterin-Acyltransferase
AK	Antikörper
AP	Amoniumpersulfat
Apo	Apolipoprotein
AS	Aminosäure
ATP	Adenylnukleotidtriphosphat
ATPase	ATP spaltendes Enzym
BSA	Bovine Serum Albumin
CM	Chylomikronen
^{125}I -CM	Mit ^{125}I Iod radioaktiv markiert Chylomikronen
CR	Chylomikronen-Remnant
CPM	Counts per minute
CURL	Compartment of uncoupling of receptor and ligand
DiL	1,1'- Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FFS	Freie Fettsäuren
FCS	Fetal calf serum
HDL	High density lipoprotein
HL	Hepatische Lipase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IDL	Intermediate density lipoprotein
KBr	Kaliumbromid
kDa	Kilodalton
LCAT	Lecithin-cholesterol-acyltransferase
LDL	Low density lipoprotein
LPL	Lipoprotein-lipase
LRP	LDL receptor-related protein
M	Proteinmarker
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SR-B1	Scavenger receptor B1
TCA	Trichloressigsäure
THL	Tetrahydrolipstatin
TMED	Tetramethylethyldiamin
TRL	Triglyzeridreiche Lipoproteine
VLDL	Very low density lipoproteins

8. Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1:	Physikalische Eigenschaften und Zusammensetzung der Lipoproteine	2
Abbildung 1:	Exogener und endogener Stoffwechsel triglyzeridreicher Lipoproteine	6
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der LDL-Rezeptor-Gen-Familie	10
Abbildung 3:	Sekundärstruktur des Apo E	14
Abbildung 4:	Intrazellulärer Metabolismus von triglyzeridreichen Lipoproteinen	20
Tabelle 2:	Zusammensetzung humaner Chylomikronen	38
Abbildung 5:	Apolipoproteinmuster von ^{125}I -CM	39
Tabelle 3:	Zusammensetzung HDL _{Non Binding}	40
Abbildung 6:	Apolipoproteinmuster von HDL _E und HDL _{NB}	40
Abbildung 7:	Apolipoprotein E Isoformmuster der transformierten CM	42
Abbildung 8:	Apolipoprotein E Isoformmuster von Humanplasma	43
Abbildung 9:	Apolipoproteinmuster der delipidierten Lipoproteine während der Apo E Präparation	44
Abbildung 10:	Apolipoproteinmuster des verwendeten Apolipoprotein E	45
Abbildung 11:	Vergleich der Apo E-Detektion in Hepatomazellen bei Inkubation mit unterschiedlichen Ligandensuspensionen	46
Abbildung 12:	Vergleich intrazellulärer Apo E-Detektion in Hepatomazellen in Abhängigkeit von der Apo E-Isoform und unterschiedlichen Aufnahmezeiten	47
Abbildung 13:	Vergleich intrazellulärer Apo E-Detektion in humanen Hautfibroblasten in Abhängigkeit von der Apo E-Isoform und unterschiedlichen Aufnahmezeiten bei einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml	49
Abbildung 14:	Vergleich intrazellulärer Apo E-Detektion in humanen Hautfibroblasten in Abhängigkeit von der Apo E-Isoform und unterschiedlichen Aufnahmezeiten bei einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml	51
Abbildung 15:	Aufnahme, Recycling und Abbau in ng/mg Zellprotein von Apo E-assoziierten ^{125}I -CM unterschiedlicher Isoform im Vergleich, ohne und mit HDL als Recycling-induzierende Chase-Lösung und einer Apo E-Konzentration von 2,5 µg/ml	53

Abbilddung 16:	Isoformspezifische Aufnahme, Recycling und Abbau in ng/mg Zellprotein von Apo E-assoziierten ¹²⁵ I-CM im Vergleich, ohne und mit HDL als Recycling-induzierende Chase-Lösung und einer Apo E-Konzentration von 25µg/ml	54
Abbilddung 17:	Isoformspezifische Aufnahme in ng/mg Zellprotein von Apo E-assoziierten CM auf Hepatomazellen bei 2,5µg/ml und 25µg/ml Proteinkonzentration und Chase-Medium ohne und mit HDL-Zusatz	55
Abbilddung 18:	Isoformspezifisches Recycling in ng/mg Zellprotein von Apo E-assoziierten CM auf Hepatomazellen bei 2,5µg/ml und 25µg/ml Proteinkonzentration und Chase-Medium ohne und mit HDL-Zusatz	56
Abbilddung 19:	Prozentuale Verteilung von Aufnahme, Recycling und Abbau Apo E-assoziierten ¹²⁵ I-CM unterschiedlicher Isoform im Vergleich, bei Chase ohne und mit HDL und einer Apo E-Konzentration von 2,5µg/ml	57
Abbilddung 20:	Prozentuale Verteilung von Aufnahme, Recycling und Abbau Apo E-assoziierten ¹²⁵ I-CM unterschiedlicher Isoform im Vergleich, bei Chase ohne und mit HDL und einer Apo E-Konzentration von 25µg/ml	58
Abbilddung 21:	Prozentuale Verteilung der isoformspezifischen Aufnahme von Apo E-assoziierten CM auf Hepatomazellen bei 2,5µg/ml und 25µg/ml Proteinkonzentration und Chase-Medium ohne und mit HDL-Zusatz	59
Abbilddung 22:	Prozentuale Verteilung des isoformspezifischen Recyclings von Apo E-assoziierten CM auf Hepatomazellen bei 2,5µg/ml und 25µg/ml Proteinkonzentration und Chase-Medium ohne und mit HDL-Zusatz	60
Abbilddung 23:	Pulse-Chase Experimente auf Hepatomazellen zum Vergleich von HDL induziertem intrazellulären Recycling der Apo E Isoformen	61
Abbilddung 24:	Pulse-Chase Experimente auf humanen Hautfibroblasten zum Vergleich von HDL induziertem intrazellulärem Recycling der Apo E Isoformen	63
Abbilddung 25:	Pulse-Chase Experimente auf Normal-Fibroblasten und Tangier-Fibroblasten im Vergleich, zur Untersuchung des intrazellulären Recyclingmechanismus der Apo E Isoform E _{3/3} bei HDL induziertem Recycling	65

9. Danksagung

Abschließend möchte ich allen meinen besonderen Dank aussprechen, die mir bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit geholfen haben:

Frau Prof. Dr. Dr. h.c. U. Beisiegel, die diese Arbeit erst ermöglichte, indem sie mir das Thema dieser Arbeit zur selbständigen Bearbeitung überließ, die technischen Mittel bereit stellte und zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Dr. Jörg Heeren, der mich mit Engagement und Geduld die gesamte Zeit begleitet hat und ohne dessen Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Allen Mitarbeitern des biochemischen Stoffwechsellabores, insbesondere Alexander, Andreas, Christiane, Christine, Daniela, Dave, Dorte, Helga, Nico, Silvia, Steffi, Susanne und Thomas.

Meiner Mutter, Juliane Kratzert und meiner Schwester, Jeanette Kratzert, die mir bis zum Schluss eine große Hilfe waren.

Und natürlich Kathrin und Christiane, ohne die ich im Labor nur halb so viel Spaß gehabt hätte!

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Wolf Benjamin Kratzert
Geburtstag: 19.07.1972
Geburtsort: Lübeck
Wohnort: Hamburg

Schulausbildung:

1979 – 1993 Wolfgang Borchert Grundschule, Hamburg
1983 – 1989 Mittelstufe der Gesamtschule Jahnschule, Hamburg
1989 – 1990 Schüleraustausch an der Red Mountain High School, Arizona U.S.A.
1990 – 1992 Oberstufe der Gesamtschule Jahnschule, Hamburg

Hochschulausbildung:

April 1995 Beginn Des Medizinstudium an der Universität Hamburg
März 1997 Bestehen der ärztlichen Vorprüfung
Oktober 1997 – September 1999 Fortführung des Medizinstudium an der Universität Innsbruck, Österreich
Oktober 1999 Fortführung des Medizinstudium an der Universität Hamburg
Hamburg, Germany
März 2000 Bestehen des ersten Abschnittes der ärztlichen Prüfung
März 2002 Bestehen des zweiten Abschnittes der ärztlichen Prüfung
April – Juni 2002 Erstes PJ-Tertial: Chirurgie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg
Juni – Dezember 2002 Zweites PJ-Tertial: Inneren Medizin, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg
Januar – April 2003 Drittes PJ-Tertial: Anästhesiologie, University of California, San Francisco, USA und University of California, San Diego, USA
Juni 2003 Bestehen des dritten Abschnittes der ärztlichen Prüfung und Abschluss des Medizinstudiums an der Universität Hamburg

11. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Wolf Benjamin Kratzert