

Aus dem Institut für Arterioskleroseforschung  
an der Universität Münster  
Department für Zellbiologie und Ultrastrukturforschung  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Robenek

**Topographie und Dynamik von Perilipin und Adipophilin in Lipidtropfen**

**Inaugural-Dissertation**

zur  
Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Opretzka, Miriam Elin  
aus Gelsenkirchen

2005

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr.

Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter:

Univ.-Prof. Dr. H. Robenek

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. J. Sindermann

Tag der mündlichen Prüfung:

19. Juli 2005

Aus dem Institut für Arterioskleroseforschung  
an der Universität Münster  
Department für Zellbiologie und Ultrastrukturforschung  
Leiter: Univ.-Prof. Dr. H. Robenek  
Referent: Univ.-Prof. Dr. H. Robenek  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. J. Sindermann

## **Zusammenfassung**

### **Topographie und Dynamik von Perilipin und Adipophilin in Lipidtropfen**

**Elin Opretzka**

Nahezu alle Organismen, einschließlich Hefen, Pflanzen und Tieren sowie einige Prokaryonten, können neutrale Lipide in intrazellulären Lipidtropfen verpacken. Lipidtropfen sind dynamische subzelluläre Strukturen, die für die Membran-Biosynthese, die Cholesterin-Homöostase, den Cholesterin-Metabolismus, den Lipidtransport und die Energiebalance erforderlich sind. Sie sind zusammengesetzt aus einem Kern aus neutralen Lipiden, umgeben von einem Monolayer aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und spezifischen Populationen von Proteinen, die als notwendig für Gestaltung und Funktion der Lipidtropfen erachtet werden. Bisher wurde angenommen, dass die Lipidtropfen-assoziierten Proteine ausschließlich in dem den Lipidtropfen umgebenden Monolayer vorkommen.

Diese Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, neue Erkenntnisse über das Vorkommen und die Verteilung der Lipidtropfen-assoziierten Proteine Perilipin und Adipophilin in Lipidtropfen zu gewinnen. Als Objekte dienten kultivierte Adipozyten und Makrophagen. Für die Analysen wurde im Wesentlichen die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie eingesetzt. Mit Hilfe der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie konnten wir Perilipin und Adipophilin nicht nur in der Oberfläche von Lipidtropfen der untersuchten Zellen nachweisen, sondern erstmalig auch in deren Kern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen Beitrag zum allgemeinen Verständnis der strukturellen und funktionellen Organisation von Lipidtropfen und ihren assoziierten Proteinen.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07. 2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Arterienwand	1
1.2 Die Atherosklerose	4
1.2.1 Entstehung	4
1.2.2 Entwicklungsstufen	6
1.2.2.1 Frühe Läsionen	6
1.2.2.1.1 Fettstreifen	7
1.2.2.1.2 Intermediäre Läsionen	7
1.2.2.2 Fortgeschrittene Läsionen	8
1.2.2.2.1 Das Atherom	8
1.2.2.2.2 Das Fibroatherom	8
1.2.2.2.3 Komplizierte Läsionen	9
1.3 Lipidtropfen	10
1.3.1 Vorkommen und Zusammensetzung	10
1.3.2 Lipidtropfen-assoziierte Proteine	14
1.3.2.1 Perilipin	16
1.3.2.2 Adipophilin	18
1.3.2.3 TIP47, PP17, S3-12 und andere Mitglieder der PAT-Familie	21
1.4 Untersuchte Zellen	23
1.4.1 Adipozyten	23
1.4.2 Makrophagen	27
1.5 Ziele der Arbeit	31
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>32</b>
2.1. Zellkultur	32
2.1.1 Isolierung und Kultur	32
2.1.1.1 THP-1-Zellen	32
2.1.1.2. 3T3-L1-Zellen	32
2.1.2 Experimente mit Brefeldin A	33
2.1.3 Experimente mit acetyliertem Low Density-Lipoprotein	33

2.1.4 Zellzählung	33
2.2. Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopische Aufarbeitung der Zellen	33
2.2.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	33
2.2.2 Elektronenmikroskopie	34
2.2.2.1 Standardaufarbeitung für Ultradünnschnitte	34
2.2.2.2 Kryoultramikrotomie	35
2.2.2.3 Gefrierbruch als Methode zur Analyse von Membranen	36
2.2.2.3.1 Konventionelle Gefrierbruchmethode	37
2.2.2.3.2 Natrium Dodecyl Sulfat-Gefrierbruch-Immunzytochemie	38
2.2.2.4 Antikörper und Immungold	40
2.2.2.5 Quantifizierung	40
2.2.2.6 Bilddokumentation	40
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1 Die intrazelluläre Organisation einer Zelle nach Gefrierbruch	41
3.2 Die Natrium Dodecyl Sulfat-Gefrierbruch-Immunzytochemie	44
3.3 Verteilung von Perilipin und Adipophilin in Lipidtropfen	46
3.3.1 Der Lipidtropfen	46
3.3.2 Perilipin in Adipozyten	47
3.3.2.1 Perilipin in unbehandelten Adipozyten	47
3.3.2.2 Perilipin in Adipozyten nach Zugabe von AcLDL	51
3.3.2.3 Perilipin in Adipozyten nach Zugabe von Brefeldin A	56
3.3.3 Adipophilin in Makrophagen	60
3.4 Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse	63
<b>4. Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1 Die Gefrierbruch-Immunzytochemie: Methodische Aspekte	65
4.2 Lokalisation von Perilipin und Adipophilin in Lipidtropfen	70
4.3 Transport von Perilipin und Adipophilin zu Lipidtropfen	72
4.3.1 Transportsequenzen	72
4.3.2 Transportmechanismen	73

<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>76</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>94</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>95</b>
<b>9. Erklärung</b>	<b>96</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Arterienwand

Der Bau der Arterienwand hängt davon ab, welche Aufgaben die Arterie im Blutkreislauf hat. Nach Wandaufbau und Grösse lassen sich drei Arterientypen unterscheiden:

- Arteriolen
- Arterien vom elastischen Typ
- Arterien vom muskulären Typ

Arterien vom elastischen Typ sind herznahe, sehr dehnbare Gefäße, deren Aufgabe es ist, das mit grossem Druck aus dem Herzen gepumpte Blut aufzufangen und weiterzutransportieren. Hierzu zählen z.B. die Aorta und ihre Hauptäste. Makroskopisch sehen diese Gefäße gelb aus. Diese Farbe wird durch sehr viel elastisches Material in der Gefäßwand hervorgerufen.

Arterien vom elastischen Typ gehen zur Körperperipherie in Arterien vom muskulären Typ über, die das Blut zu den Organen befördern. Arterien vom muskulären Typ sind durch eine muskelreiche Schicht gekennzeichnet, die bis zu 40 Lagen glatter Muskelzellen aufweisen kann.

Arteriolen zweigen sich von den dünneren Arterien der muskulären Form ab. Auch Widerstandsgefäße genannt, können sie ihr Lumen zur Regulation des Blutstroms in den nachgeschalteten Kapillaren verändern. Sie haben ein relativ enges Lumen und im allgemeinen einen Durchmesser von weniger als 0.5 mm.

Grundsätzlich besteht die Arterienwand aller drei Typen aus drei morphologisch unterschiedlichen Schichten:

- Tunica intima, kurz Intima
- Tunica media, kurz Media
- Tunica adventitia, kurz Adventitia (Abb. 1)

Je nach Arterientyp ist der dreischichtige Wandaufbau unterschiedlich ausgeprägt.

Die Intima besteht aus einem einschichtigen Endothel, das die innere Oberfläche der Gefäße lückenlos auskleidet. Die rhomboiden Zellen sind in Richtung des Gefäßverlaufs angeordnet. Spärliches subendotheliales Bindegewebe mit gelegentlich eingelagerten Muskelzellen – auch Stratum subendotheliale genannt – ist ebenfalls in dieser Richtung angelegt. Dieses ermöglicht in geringem Umfang eine Beweglichkeit des Endothelrohres.



Bei Neugeborenen und Kindern ist die Intima eine dünne Zellschicht, die mit zunehmendem Alter durch die Einwanderung von glatten Muskelzellen an Dicke zunehmen kann (Ross und Glomset, 1973).

Im Rahmen des Stoff-, Flüssigkeits- und Gasaustausches agiert die Intima als

- Permeabilitätsbarriere, die den Substanz Austausch an der Arterienwand steuert
- antithrombotisch wirkende Oberfläche
- Quelle für vasokonstriktische und vasodilatatorische Moleküle wie Prostazyklin und Endothelin
- Syntheseort für Wachstumsfaktoren und Zytokine
- Modifikationsort für Lipoproteine
- Quelle für Matrixmoleküle (Ross, 1993a, b).

Die Media besteht aus konzentrisch angeordneten Schichten von glatten Muskelzellen, zwischen denen in unterschiedlicher Menge Elastin, Kollagen (Typ I und III) und Grundsubstanz (Proteoglykane) vorkommen.

Hauptaufgabe der Media ist die Regulation des Blutflusses in den Arterien.

Als Grenze zur Adventitia kann eine Lamina elastica externa ausgebildet sein, als Grenze zur Intima eine Lamina elastica interna.

Die Adventitia besteht im Prinzip aus Bindegewebe mit elastischen Fasern. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass das Kollagen in der Adventitia nur zum Typ I, das der Media sowohl zum Typ I als auch zum Typ III gehört. In der Adventitia verlaufen kleine Blut- und Lymphgefäße und einzelne Nervenzellen, die die Versorgung des Gefäßes von außen sicherstellen (Ross und Glomset, 1976; Robenek und Severs, 1992). Über die Adventitia ist das Gefäß in das umgebene Gewebe eingebettet.

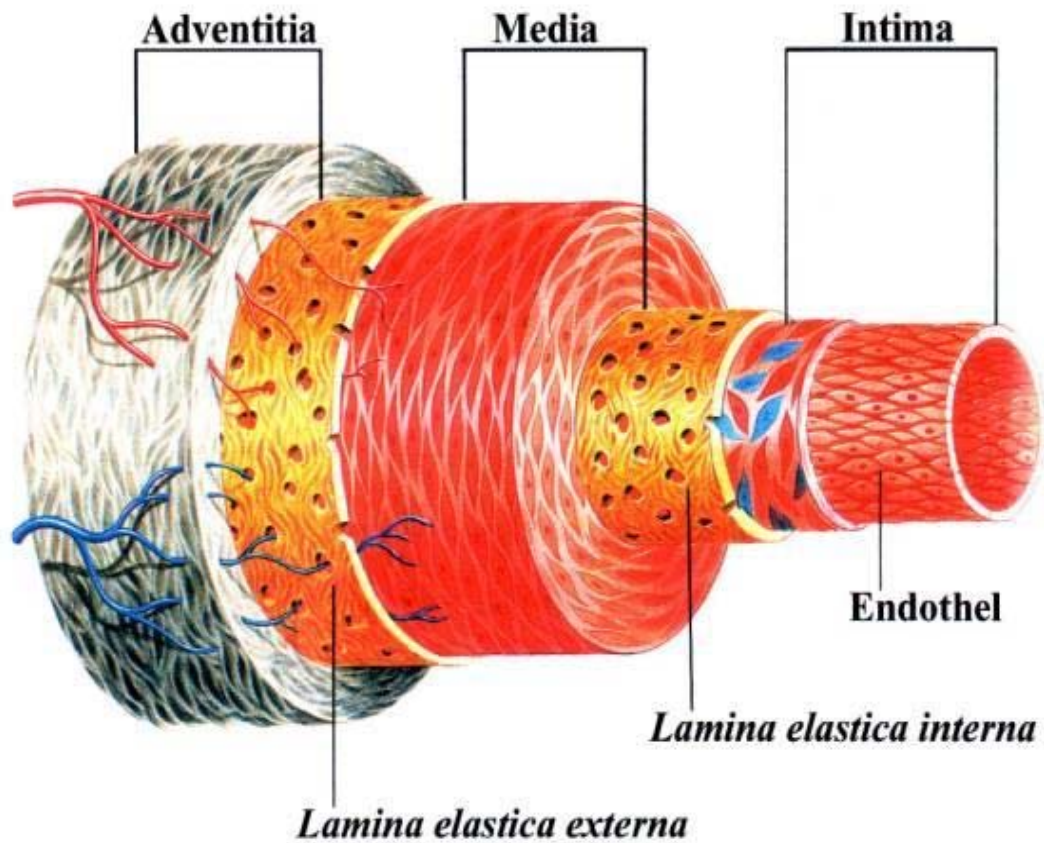


Abbildung 1: Prinzipieller Aufbau der Gefäßwand, dargestellt am Beispiel einer elastischen Arterie. Die Arterienwand besteht aus drei Schichten: Die Intima stellt die innerste Schicht dar, ihr benachbart ist die Media, außen befindet sich die Adventitia. Die Media wird von der Intima durch die Lamina elastica interna, von der Adventitia durch die Lamina elastica externa abgegrenzt. (Akkermann *et al.*, 1987).

## 1.2 Die Atherosklerose

### 1.2.1 Entstehung

Nach Definition der WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO) von 1957 versteht man unter der Atherosklerose eine „variable Kombination von Intimaveränderungen (der Arterien), bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen (Kalkablagerungen), verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (zitiert aus Buehling *et al.*, 2000)

Der Begriff Atherosklerose leitet sich ab aus den Worten Atherom = „Ansammlung von Lipiden innerhalb der Intima“ und Sklerose = „Verhärtung der Gefäße durch Zunahme der extrazellulären Matrix und Verkalkung“.

Häufig werden die Begriffe Atherosklerose und Arteriosklerose synonym gebraucht. Bei letzterem Terminus handelt es sich jedoch um einen Oberbegriff, der außer der Atherosklerose noch andere mit Sklerose einhergehende Erkrankungen, z.B. die Arteriosklerose Typ Mönckeberg und die Arteriolosklerose, einschließt. Dabei ist die Atherosklerose die am häufigsten auftretende Form der Arteriosklerose.

Die Atherosklerose und ihre Folgen wie Herzinfarkt, Schlaganfall, Angina pectoris und periphere Gefäßerkrankungen sind in den USA, Europa und Japan mit steigender Tendenz die Haupttodesursache (World Health Organisation, 1985).

Es handelt sich um einen chronischen multifaktoriellen Prozess, der im Kindesalter beginnt, aber erst in der dritten bis vierten Lebensdekade klinisch manifest wird, und von einer genetischen Disposition und einer Vielzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren abhängig ist. Zu den Risikofaktoren zählen arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Hyperurikämie, Nikotinabusus, Bewegungsmangel und Stress (Wahrburg, 1989). Als weitere Risikofaktoren werden eine Hypertriglyzeridämie, erhöhte Blutkonzentrationen von Lipoprotein (a), Homocystein und bestimmte Entzündungsparameter wie C-reaktives Protein (CRP) oder Fibrinogen sowie chronische Chlamydien- oder *Helicobacter pylori*-Infektionen diskutiert. Ob eine Verbesserung dieser Faktoren die Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen günstig beeinflusst, ist derzeit noch nicht bewiesen. Wie die einzelnen Faktoren auf zellulärer Ebene zur Atheroskleroseentstehung beitragen, ist noch nicht vollständig und abschließend geklärt.

Nicht alle Gefäßgebiete sind gleich anfällig für Atherosklerose. So ist das Venensystem trotz vergleichbarer Blutfettwerte im venösen wie im arteriellen Blut

atherosklerosefrei. Auch innerhalb der arteriellen Zirkulation entwickelt sich die Atherosklerose unterschiedlich: Während Herzkranzgefäße, Aorta, Karotiden und mittelgroße Arterien der Extremitäten häufig befallen sind (Munro und Cotran, 1988), bleiben die Arteria mammaria interna und die distalen Arterien fast immer atherosklerosefrei. Weiterhin sind häufig Gefäßabgänge und konvexe Gefäßinnenwände, wo der Blutstrom seine Richtung wechselt und es zu Verzweigungen kommt, betroffen (Ross, 1995b).

Die Veränderungen an den Arterien während der Atherosklerose können individuell sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Das Verständnis der Pathogenese der Atherosklerose ist in den letzten 20 Jahren revolutioniert worden. Wesentlich für das moderne Verständnis dieser chronischen Erkrankung haben die Arbeiten von Ross beigetragen, der in den 70er Jahren die „Response to injury“-Hypothese formulierte (Ross und Glomset, 1973). Diese Hypothese griff die Endothelverletzung als Ursprung der Atherosklerose auf und beschrieb ein multifaktorielles Geschehen, das auf Wechselbeziehungen zwischen dem Blutgefäßsystem und den zellulären Komponenten der Gefäßwand basiert. An verletzten Endothelstellen, an denen die Permeabilität gegenüber Plasmaproteinen, besonders Albumin, Fibrinogen und LDL, erhöht ist und der Cholesteringehalt in der Intima steigt, beginnt die Progression der Atherosklerose.

Im Verlauf der Zeit wurden weitere Faktoren, die die Pathogenese der Atherosklerose beeinflussen, ermittelt. Einige Autoren beschrieben Thrombosen, Immunmechanismen und Viren als wichtige Punkte im Zuge der Atherogenese (Munro und Cotran, 1988). Steinberg *et al.* (1989) bezeichneten eine Lipidinfiltration in die Intima als einen bedeutenden Faktor im atherosklerotischen Geschehen.

Mit der Nahrung aufgenommene Lipide werden im wässrigen Milieu des Blutes durch Lipoproteine transportiert. Der Proteinanteil dieser Lipoproteine hat die Aufgabe, die transportierten Lipide an ihren metabolischen Bestimmungsort zu dirigieren. Je nach Protein- und Lipidanteil variieren die Lipoproteine in ihrer Dichte, nach der fünf Klassen unterschieden werden (Brown und Goldstein, 1983). Aus derzeitiger Sicht ist das in den LDL gebundene Cholesterin an der Entstehung der Atherosklerose maßgeblich beteiligt. Es wird deshalb umgangssprachlich als das schlechte LDL-Cholesterin bezeichnet, da es nach der Synthese in der Leber in andere Organe und Gewebe gelangt und sich zum Teil in den Gefäßwänden ablagert, wenn alle Zellen ausreichend mit Lipiden versorgt sind. In der Gefäßwand verringert sich der Schutz der LDL vor chemischer Modifikation und sie werden oxidiert. Dieses so genannte modifizierte LDL kann von Makrophagen aufgenommen werden, die so zu

Schaumzellen transformieren (Brown und Goldstein, 1990; Glass und Witztum, 2001). Dem „schlechten“ LDL steht das „gute“ HDL gegenüber, welches Cholesterin zurück zur Leber transportiert.

Bei der Atherosklerose spielen außerdem die Migration und Proliferation sowie die Matrixproduktion von glatten Muskelzellen eine wichtige Rolle. Die Gefäßmuskelzellen teilen sich vorerst in der Media (Proliferation) und wandern schließlich in die Intima (Migration), wo sie erneut proliferieren können. Auch sie können modifiziertes LDL aufnehmen und zu lipidbeladenen Schaumzellen werden.

Weitere entscheidende Prozesse sind die Migration von Monozyten aus der Blutbahn in die Gefäßwand, deren Differenzierung zu Makrophagen, die unregulierte Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen und anschließende Transformation zu Schaumzellen (Ross, 1993a).

Diese verschiedenen Faktoren verdeutlichen die unterschiedlichen Aspekte des multifaktoriellen Krankheitsbildes Atherosklerose.

### 1.2.2 Entwicklungsstufen

Es werden drei verschiedene Grundtypen atherosklerotischer Läsionen unterschieden:

- die frühe Läsion, gekennzeichnet durch das Auftreten von Fettstreifen
- die fortgeschrittene Läsion, erkennbar an Fibrosen und der Bildung atherosklerotischer Plaques
- die komplizierte Läsion mit Ulzerationen und Blutungen

(Assmann, 1982).

#### 1.2.2.1 Frühe Läsionen

Erste Läsionen der Arterienwand können bereits im Kindesalter auftreten und sind durch Lipoproteine, die atherogen und chemotaktisch auf Makrophagen wirken, gekennzeichnet. Die Makrophagen liegen nach Lipidaufnahme als Schaumzellen verstreut in der Intima vor. Initialläsionen treten häufig an Stellen mit diffuser intimaler Verdickung auf, welche - schon ab der Geburt bei fast allen Menschen vorhanden - eine physiologische Reaktion auf Blutdruck und Scherkräfte der Arterienwand darstellen. Es kommt zu einer Ansammlung glatter Muskelzellen und extrazellulärer Matrix in der Intima, das Gefäßlumen wird jedoch nicht eingeengt (Munro und Cotran, 1988).

#### 1.2.2.1.1 Fettstreifen

Die ersten makroskopisch sichtbaren Veränderungen der Arterienwand im Zuge der Atherogenese sind die Fettstreifen. Es handelt sich um schmale, flache, gelb gefärbte, in Gefäßrichtung orientierte Gebilde, die durch subendotheliale Schaumzellaggregate aus Makrophagen, aber auch aus einigen lipidbeladenen glatten Muskelzellen charakterisiert sind (Ross, 1993a). Vereinzelt werden T-Lymphozyten in den Fettstreifen beobachtet.

Fettstreifen treten schon nach der Geburt auf und bedecken im Alter von zehn Jahren bis zu 10% der Aortenoberfläche (Campbell und Campbell, 1994). Der arterielle Blutstrom wird nicht behindert, da sie die Intima um weniger als 1 mm verdicken. Die Bedeutung der Fettstreifen im Rahmen der Atherogenese wird kontrovers diskutiert. Fagiotto und Ross (1984) konnten im Tiermodell zeigen, dass Fettstreifen immer zu fibrösen Plaques werden. Eine andere Studie ergab, dass sich einige Fettstreifen bei jungen Menschen nicht weiterentwickelten und somit kein eindeutiges Zeichen für eine fortschreitende Atherosklerose seien (Stary, 1989).

Fettstreifen sind durch eine entsprechende Diät rückbildungsfähig. Ist es jedoch bereits zu einer vermehrten Ablagerung von ECM-Komponenten gekommen, spricht man von einer intermediären Läsion. Eine Rückbildung ist dann nicht mehr möglich.

#### 1.2.2.1.2 Intermediäre Läsionen

Nach der Pubertät kann es zur Ausbildung intermediärer Läsionen, welche auch Lipidplaques genannt werden, kommen. In der Entwicklung stehen sie zwischen Fettstreifen und Atherom. Die intermediäre Läsion besteht aus sich verdichtenden, lipidbeladenen Makrophagen und glatten Muskelzellen, umgeben von Kollagenfibrillen, elastischen Fasern und Proteoglykanen (Ross, 1995a). Im Gegensatz zu den Fettstreifen enthalten sie diffus verteilte extrazelluläre Lipide (Stary *et al.*, 1994). An den Rändern der intermediären Läsion können Fissuren und Risse auftreten. Durch das Auftreten von Blutgerinnseln ist die intermediäre Läsion im Verlauf der Atherogenese die erste Form, bei der es zu klinischen Folgen wie Herzinfarkt und Schlaganfall kommen kann.

## 1.2.2.2 Fortgeschrittene Läsionen

### 1.2.2.2.1 Das Atherom

Atherome entstehen ab der dritten Lebensdekade in der Intima und zeichnen sich durch eine dichte Ansammlung von Lipiden, den so genannten Lipidkern, und eine Atheromkappe aus. Die Intimastruktur wird an der betroffenen Stelle aufgelöst. Der Lipidkern entsteht durch Zusammenfließen der einzelnen extrazellulären Lipidtropfen und der weiteren kontinuierlichen Lipiddiffusion aus dem Blutplasma (Stary *et al.*, 1995). Histologisch besteht der Lipidkern aus Lipidtropfen, Zelltrümmern und Schaumzellen. Auch Kalziumablagerungen und Cholesterinkristalle werden schon in frühen Jahren beobachtet. Ein solcher Herd hat makroskopisch eine gelbe Farbe und wird als Atherom oder als atherosklerotische Plaque bezeichnet. Die Atheromkappe wird aus glatten Muskelzellen, Kollagen, elastischen Fasern und Proteoglykanen gebildet und überzieht das Zentrum (Munro und Cotran, 1988). An den Rändern der Kappe sind Makrophagen, glatte Muskelzellen und T-Lymphozyten angesiedelt. Kapillaren sprossen aus der Adventitia ein, eine Neovaskularisation erfolgt vor allem an den Rändern der Plaque (Stary *et al.*, 1995). Die Arterienwand wird durch das Atherom verdickt. Ist beim Atherom die Endothelzellschicht noch intakt, besteht keine akute Thrombosegefahr.

### 1.2.2.2.2 Das Fibroatherom

Fibroatherome sind Plaques aus mehreren unregelmäßig übereinander liegenden Lipidkernen, die durch fibröses Gewebe voneinander getrennt sind. Der Lipidkern, der in nächster Nähe zur Media liegt, wurde zuerst gebildet. Von einer kalzifizierten Läsion spricht man, wenn bei einer Plaque neben fibrösem Gewebe die Mineralisation dominiert. Mineralien können an die Stelle der extrazellulären Lipide und Zelltrümmer treten. Kalzifizierte Läsionen findet man besonders in den unteren Extremitäten (Stary *et al.*, 1995). Mikroskopisch kann man die Oberfläche der Atheromkappe und die des Fibroatheroms häufig nicht unterscheiden, so dass beide Begriffe häufig als fibröse Plaque zusammengefasst werden.

### 1.2.2.2.3 Komplizierte Läsionen

Bekommen Atherome an der Oberfläche Risse und bilden sich Thromben, werden sie als komplizierte Läsionen bezeichnet. Histologisch können drei Formen unterschieden werden (Stary *et al.*, 1995): Bei der ersten Form bilden sich Risse in der Oberfläche, wobei sowohl mikroskopisch nachweisbare Fissuren in der Endothelzellschicht als auch makroskopisch sichtbare Ulzerationen auftreten können. Im zweiten Fall bilden sich auf der Plaqueoberfläche Hämatome und Hämorrhagien. Bei der dritten Form entstehen Thromben. Komplizierte Läsionen neigen zu Oberflächenrissen, insbesondere an Stellen, an denen viele Makrophagen-Schaumzellen angesiedelt sind. Die Läsion wird instabil, wenn die „Plaqueschultern“ dünn sind und viele Makrophagen enthalten (Fuster *et al.*, 1992). Ist die Plaquekappe dicht und gleichmäßig dick, handelt es sich um eine stabile Läsion. Im Bereich komplizierter Läsionen kann das Gefäßlumen so verringert werden, dass es zu einem plötzlichen Verschluss des Gefäßes kommen kann. Handelt es sich um Koronar- oder Hirngefäße, resultiert daraus ein Herzinfarkt oder Schlaganfall.



## 1.3 Lipidtropfen

### 1.3.1 Vorkommen und Zusammensetzung

Intrazelluläre Lipidansammlungen kommen in biologischen Systemen in zwei Hauptformen vor: Einerseits in Form von Phospholipiddoppelschichten, sogenannte Einheitsmembranen, andererseits in Form von Lipidtropfen (Murphy, 2001).

Nahezu alle Organismen, einschließlich Hefen, Pflanzen und Tieren sowie einige Prokaryonten, können neutrale Lipide in intrazellulären Lipidtropfen verpacken (Murphy, 1993; Huang, 1996; Napier *et al.*, 1996; Murphy und Vance, 1999). Lipidtropfen sind dynamische subzelluläre Strukturen, die für die Membran-Biosynthese, die Cholesterin-Homöostase, den Cholesterin-Metabolismus, den Lipidtransport und die Energiebalance erforderlich sind. Sie sind zusammengesetzt aus einem Kern aus neutralen Lipiden (Triacylglycerin, Diacylglycerin und Sterol-Ester), umgeben von einem Monolayer aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und spezifischen Populationen von Proteinen, die notwendig für Gestaltung und Funktion der Lipidtropfen sind (Murphy und Vance, 1999).

Zytoplasmatische Lipidtropfen kommen in nahezu allen Zellen an irgendeinem Punkt ihrer Entwicklung vor. Abhängig vom Zelltyp variiert die Anzahl der Lipidtropfen, die relative Masse des gespeicherten Cholesterins und Triacylglycerins sowie die Proteinzusammensetzung der Tropfen: Adipozyten speichern fast ausschließlich Triacylglycerin in großen Lipidtropfen, die eine Größe von 100 µm erreichen können und den Hauptenergiespeicher des Körpers bilden. Viele andere Zellen speichern Cholesterinester in kleinen Tropfen. Dieses Cholesterin wird für die Membransynthese verwendet.

Bisher ist wenig bekannt über den Zellmechanismus, der den Fluss neutraler Lipide in und aus Lipidtropfen kontrolliert. Es ist jedoch klar, dass die Prozesse, die den Lipidtransport in Adipozyten kontrollieren, eine zentrale Rolle im Energiemetabolismus des gesamten Körpers spielen.

Zytoplasmatische Lipidtropfen entstehen durch Verschmelzung neutraler Lipide zu lamellären Schichten innerhalb der Bilayer des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Murphy und Vance, 1999). Nach Erreichen einer kritischen Größe schnürt sich der Lipidtropfen auf der zytosolischen Seite der Membran des ER ab. Der hydrophobe Kern ist auf diese Weise von einem Monolayer aus Lipiden der Membran des ER umgeben, deren hydrophobes Ende zum Kern des Lipidtropfens und deren hydrophiles Ende zum Zytosol gerichtet sind (Abb. 2).

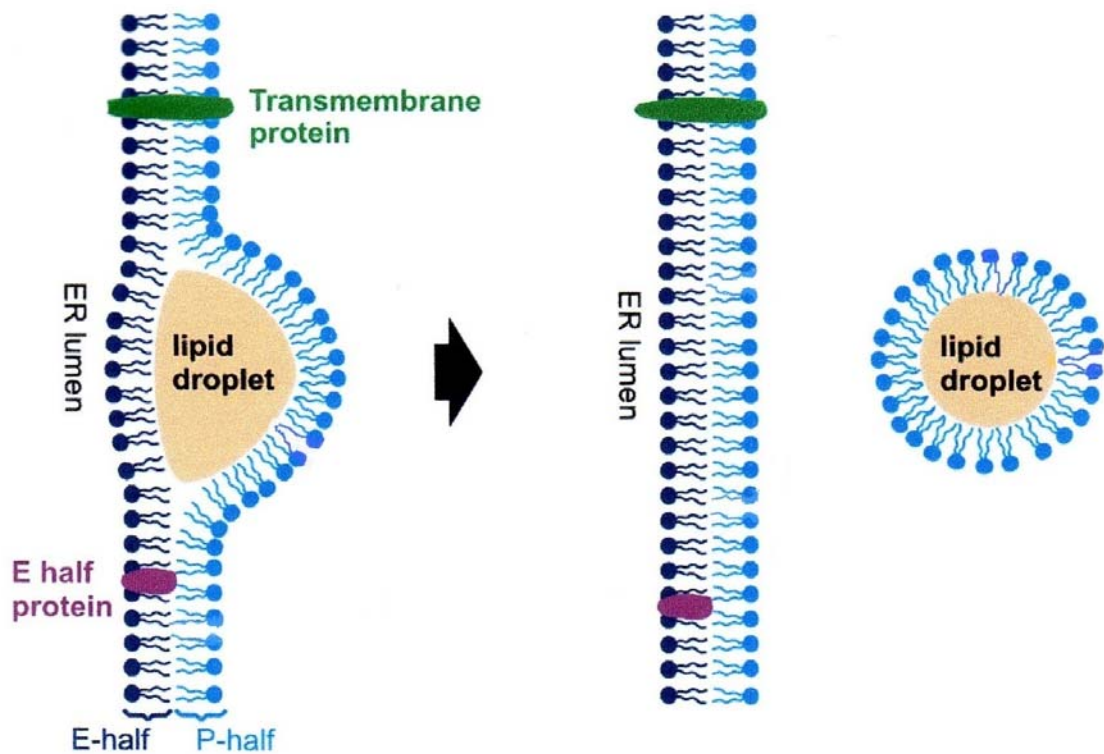


Abbildung 2: Gegenwärtige Hypothese der Lipidtröpfchenbildung (Robenek *et al.*, 2004).

Obwohl Lipidtröpfchen lange als inerte Strukturen betrachtet wurden, gibt es inzwischen zunehmend Beweise, dass sie aktive und unterschiedliche Rollen im Lebenszyklus von Zellen spielen. Kürzlich wurden sie in Zusammenhang gebracht mit der Erhaltung der intrazellulären Cholesterin-Balance und dem Transport von Lipiden durch Assoziation mit den Caveolinen (Pol *et al.*, 2001). Darüber hinaus werden die in den Lipidtröpfchen gespeicherten Lipide in bestimmten Zelltypen für unterschiedliche Zwecke genutzt: Spezialisierten Zellen der Nebennierenrinde, der Testes und Ovarien dienen sie als Substratquelle für die Synthese von Steroidhormonen (Freeman und Ascoli, 1982). Milch-Fetttröpfchen, welche Brustdrüsenepithelzellen von ihrer apikalen Oberfläche freisetzen, stammen direkt von aggregierten Lipidtröpfchen (Mather und Keenan, 1998) und sind eine Hauptquelle für Nährsubstrate von Säuglingen (Mather und Keenan, 1998; McManaman *et al.*, 2002). Darüber hinaus scheinen Lipidtröpfchen auch Ursprungsquelle für Fettsäuren zu sein, die in Hepatozyten als Triacylglycerin in Very Low Density Lipoproteine (VLDL) eingebaut werden (Gibbons *et al.*, 2000).

In anderen Zelltypen wie Leukozyten und Makrophagen stellt die Akkumulation von Lipidtropfen einen induzierbaren Prozess dar, der durch eine Vielzahl von entwicklungsbedingten Stimuli oder umweltbedingten Schäden getriggert werden kann und möglicherweise eine Rolle in der Entzündungsantwort spielt.

Die Fehlspeicherung neutraler Lipide steht im Zusammenhang mit einigen Erkrankungen des Menschen (Murphy und Vance, 1999; Londos *et al.*, 1999b). Hierzu gehören das Atherom, die Steatosis, Adipositas und einige Karzinome (Heid *et al.*, 1998; Murphy und Vance, 1999). Ein Fehltransport des Nir2 Proteins zu den Lipidtropfen könnte Veränderungen im Lipidtransport induzieren, die mit retinaler Degeneration, wie z. B. bei Mutationen von *Drosophila* beobachtet, korrelieren könnten (Litvak *et al.*, 2002). Wahrscheinlich üben Lipidtropfen einige wichtige Funktionen im Rahmen von viralen und parasitären Infektionen aus (Barba *et al.*, 1997; Charron und Sibley, 2002; Hope und McLauchlan, 2000; Hope *et al.*, 2002).

Die molekularen Mechanismen, welche in Bildung und Turnover der Lipidtropfen in Zellen und Geweben involviert sind, sind bisher nicht verstanden. Kontakte zwischen Intermediärfilamenten und Lipidtropfen sprechen dafür, dass Intermediärfilamente eine intrazelluläre Funktion bei der Ablagerung von Lipiden haben (Franke *et al.*, 1987; Almahbobi, 1995; Teichert-Kuliszewska *et al.*, 1996). Franke *et al.* (1987) beobachteten, dass Proteine der Intermediärfilamente, insbesondere Vimentin, käfigartige Strukturen um kleinere Lipidtropfen differenzierender 3T3-L1 Zellen zu bilden schienen. Als die Zellen reiften, nahm die Anzahl der Vimentin-Filamente einhergehend mit der Fusion der Lipidtropfen ab. Es gibt Anzeichen dafür, dass zumindest einige, wenn nicht die meisten Lipidtropfen bald nach ihrer Bildung in eine fibrilläre Kapsel eingeschlossen werden (Almahbobi und Hall, 1990; Almahbobi *et al.*, 1992; Almahbobi, 1995; Hall und Almahbobi, 1997). Diese Kapsel besteht aus einem Netzwerk aus Intermediärfilamenten, die über Adaptorproteine wie P200 an die Oberfläche von Lipidtropfen anheften (Wang *et al.*, 1997; Fong *et al.*, 1996; Fong und Wang, 1997; Wang und Fong, 1995). Die Bildung solch käfigartiger Strukturen könnte ein Mechanismus sein, der dazu dient, neugebildete Lipidtropfen so abzusondern, dass sie, vor Lipolyse geschützt, an das zytoskelettale Netzwerk angebunden werden und damit verfügbar sind, an anderen Teilen der Zelle eingesetzt zu werden. Fusion von Lipidtropfen in Adipozyten und Epithelzellen der Brustdrüse oder die Mobilisation von Cholesterin in steroidbildenden Zellen würde dann eine Auflösung oder Verteilung dieser fibrillären Hülle erfordern, eventuell über einen Calcium- oder Phosphorylierungs-abhängigen Prozess (Wang *et al.*, 1997; Valivullah *et al.*, 1988). In Epithelzellen der Brustdrüse ist der Übertritt der

Lipidtropfen vom Ort ihrer Bildung zum Ort ihrer Sekretion Colchicin-sensitiv und beinhaltet eine Beteiligung des Zytoskeletts (Knudson *et al.*, 1978; Patton, 1976; Morales *et al.*, 1982).

Zweifel an der Bedeutung des Vimentins wurden jedoch erhoben, weil ein offensichtlicher Phänotyp bei Mäusen, denen das Vimentin fehlte, nicht gezeigt werden konnte (Colucci-Guyon *et al.*, 1994).

Lipidtropfen sind umhüllt von spezifischen Populationen von Proteinen, welche notwendig für deren Bildung und Funktion sind (Murphy und Vance, 1999). Die Anwesenheit spezifischer Proteine auf den Oberflächen zytosolischer Lipidtropfen in Tieren wurde relativ spät entdeckt und der Analyse der Eigenschaften dieser Lipidtropfen-assoziierten Proteine wurde lange Zeit nur begrenzt Beachtung geschenkt. Die zurzeit am besten charakterisierten Proteine sind Perilipin, 1991 durch Greenberg *et al.* erstmalig beschrieben, und Adipophilin, 1997(b) durch Brasaemle *et al.* entdeckt.

### 1.3.2 Lipidtropfen-assoziierte Proteine

Bisher sind relativ wenige Lipidtropfen-assoziierte Proteine bekannt: In Säugerzellen sind die wichtigsten Perilipin (Greenberg *et al.*, 1991), Adipophilin (Brasaemle *et al.*, 1997b), TIP47/PP17 (Diaz und Pfeffer, 1998), Cyclooxygenase (Dvorak *et al.*, 1994), Flotilline (Reuter *et al.*, 2004), Caveolin-1 (Robenek *et al.*, 2004) und Caveolin-2 (Tsuchi-Sato *et al.*, 2002), in pflanzlichen Zellen Oleosin und Caleosin (Murphy, 2001).

Das Vorkommen spezifischer Proteine auf den Oberflächen zytosolischer Lipidtropfen in Tieren wurde erst spät entdeckt, 1991 für Perilipin (Greenberg *et al.*) und 1997(b) für Adipophilin (Brasaemle *et al.*).

Perilipin, Adipophilin und TIP47/PP17 bilden die PAT-Familie. PAT-Proteine sind charakterisiert durch ihre lipidbindenden Eigenschaften und durch zwei konservierte Domänen, PAT1 und PAT2 genannt. Auf die Proteine der PAT-Familie wird im Folgenden näher eingegangen.

Perilipin und Adipophilin teilen verschiedene Regionen von Sequenzhomologien miteinander. Zwei weitere Proteine, die ebenfalls substantielle Homologie mit Perilipin und Adipophilin haben, sind TIP47 und PP17. Möglicherweise sind beide Proteine identisch. Kürzlich sind in der Datenbank zwei zusätzliche Proteine von *Drosophila* und *Xenopus laevis* bekannt geworden, die ebenfalls homolog gegenüber den Lipidtropfen-assoziierten Proteinen von Säugern sein könnten (Abb. 3).

Perilipin A und B sind identisch über eine Überschneidung aus 394 Aminosäureresten und resultieren aus unterschiedlichem Spleissen desselben Genproduktes (Greenberg *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 2001). Adipophilin von Maus, Kuh und Mensch stimmen zu 80% überein und haben drei ausgedehnte Domänen hoher Sequenzähnlichkeit mit Perilipin in ihren amino-(N-)terminalen Hälften, welche sie ebenfalls mit TIP47/PP17 teilen. Adipophilin hat zudem zwei kleinere Perilipin-ähnliche Regionen: Die erste befindet sich im Zentrum des Proteins und wird mit Perilipin A und B geteilt. Die zweite befindet sich näher am Carboxyl-(C-)Terminus und wird nur mit Perilipin A geteilt. Insgesamt ist Adipophilin zu 25-30% mit Perilipin identisch. Sowohl Adipophilin als auch TIP47/PP17 fehlen einige Sequenzregionen verglichen mit Perilipin A. Adipophilin und TIP47/PP17 sind viel enger miteinander verwandt als jedes von ihnen mit Perilipin. Zusätzlich zu der C-terminalen Region, die sie beide mit Perilipin teilen, haben Adipophilin und TIP47/PP17 ausgedehnte homologe Regionen miteinander. Insgesamt ist Adipophilin über seine Sequenz aus 420-450 Aminosäuren hinweg zu 40-45% identisch mit TIP47/PP17. In der Sequenz

des TIP47/PP17 gibt es ein einzelnes Motiv, welches Adipophilin nicht besitzt, aber in Lokalisation und Sequenz einem Motiv des Perilipins sehr ähnlich ist.

Das *Xenopus fatvg*-Protein hat fast dieselbe Grösse wie Adipophilin und ist diesem über die gesamte Sequenz zu etwa 60% identisch, was stark vermuten lässt, dass es ein amphibisches Homologon des Adipophilins ist. Das *Xenopus fatvg* Protein ähnelt ebenfalls den anderen zwei Säugerproteinen TIP47/PP17 und Perilipin (Chan *et al.*, 1999). Das *Drosophila melanogaster* CG9057 Genprodukt hat auch signifikante Ähnlichkeiten zu Adipophilin und dem fatvg Protein, abgesehen von einer kurzen Region in seinem N-Terminus. Die überlappenden Regionen entlang ist das *Drosophila melanogaster* CG9057 Genprodukt sowohl dem Adipophilin als auch dem fatvg-Protein zu 23-25% identisch und zu über 40% ähnlich. Das *Drosophila melanogaster* CG9057 Genprodukt ist zu etwa 27% einem anderen *Drosophila* Genprodukt, dem CG10374, identisch.

Die Entdeckung von Proteinen von Amphibien und Insekten mit solch ausgedehnten Ähnlichkeiten zu bekannten Lipid-bindenden Proteinen lässt vermuten, dass alle diese Proteine in den Lipidstoffwechsel in Zellen involviert sein könnten (vergleiche Murphy, 2001).

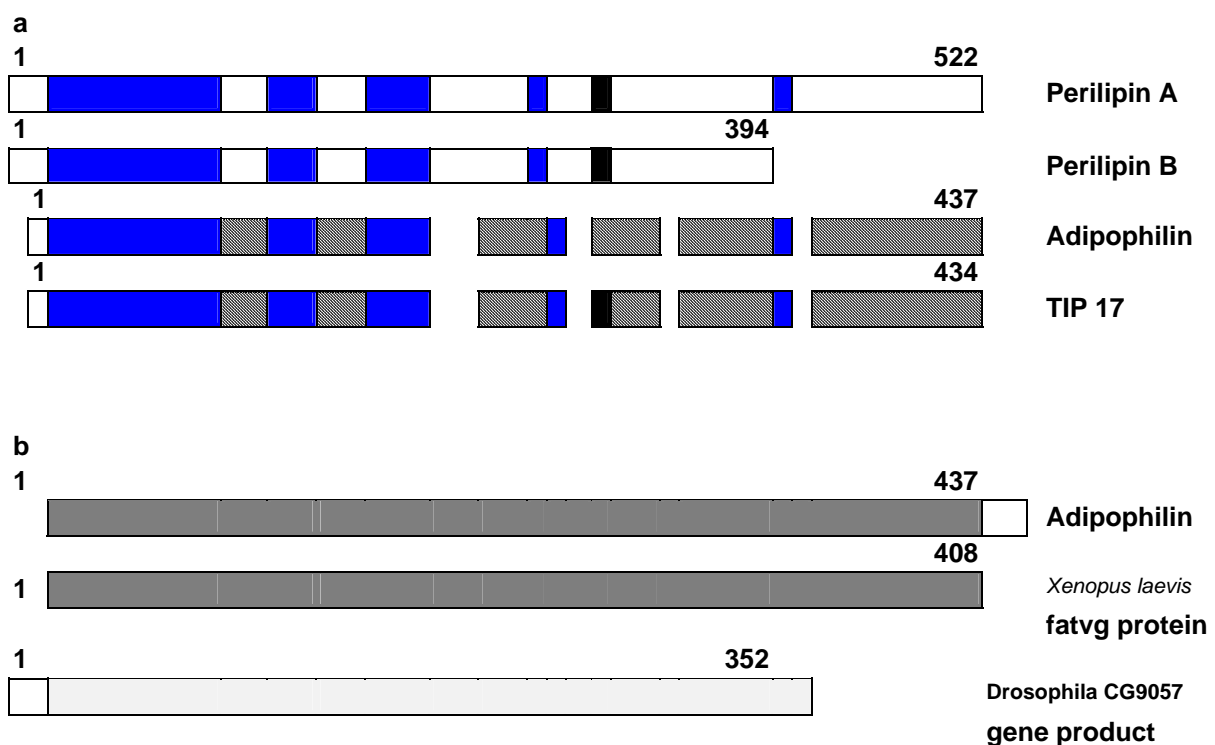


Abbildung 3: Aminosäuresequenzen der Proteine aus der PAT-Familie. (Verändert nach Murphy, 2001).

### 1.3.2.1 Perilipin

Die als erste identifizierten Lipidtropfen-spezifischen Proteine sind die Perilipine (Greenberg *et al.*, 1991; Greenberg *et al.*, 1993; Blanchette-Mackie *et al.*, 1995; Servetnick *et al.*, 1995; Londos *et al.*, 1995; Londos *et al.*, 1996; Brasaemle *et al.*, 1997a). Mitglieder dieser Proteinfamilie kommen in der Oberfläche von Lipidtropfen in differenzierten Adipozyten (Greenberg *et al.*, 1991) und steroidbildenden Zellen der Nebennierenrinde, der Testes und Ovarien (Servetnick *et al.*, 1995; Fong *et al.*, 2002) vor, aber wurden in anderen Zelltypen und anderen zellulären Kompartimenten nicht nachgewiesen (Abb. 4). Neue vorläufige Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe deuten jedoch darauf hin, dass Perilipin auch im Zellkern, in der Plasmamembran und im ER vorkommt.

Die Perilipine werden durch ein einziges Gen codiert. Die Translation alternativ gespleisster mRNAs produziert drei Isoformen des Proteins: Perilipin A, B und C (Greenberg *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 2001). Perilipin A ist mit 56 kDa die größte und überwiegende Isoform in Adipozyten und steroidbildenden Zellen (Servetnick *et al.*, 1995), Perilipin B (46 kDa) wird auf niedrigerem Level in beiden Zelltypen gefunden, und Perilipin C (42 kDa) wird ausschließlich in steroidbildenden Zellen exprimiert (Servetnick *et al.*, 1995).

Bisher ging man davon aus, dass die Perilipine an freien Ribosomen synthetisiert werden (Londos *et al.*, 1999b; Brasaemle *et al.*, 1997b) und posttranslational zu den wachsenden Lipidtropfen gelangen. In Anbetracht unserer Beobachtungen, dass Perilipine im ER vorkommen, ist diese Annahme vielleicht nicht mehr gültig.

Die Perilipine fungieren als „Torhüter“-Proteine auf den Oberflächen zytosolischer Lipidtropfen und kontrollieren Speicherung und Freisetzung von Triacylglycerin. Triacylglycerin verpackt in Lipidtropfen von Adipozyten ist der größte Energiespeicher des Körpers. Speicherung und Freisetzung von Triacylglycerin in Lipidtropfen von Adipozyten sind exakt regulierte Prozesse. Der Abbau von Triacylglycerin wird durch eine hormonsensitive Lipase vermittelt. Ansteigende Level systemischer Katecholamine triggern über eine Aktivierung adrenerger Beta-Rezeptoren auf der Plasmamembran der Adipozyten eine Signalkaskade, infolgeder die Adenylcyclase und die cAMP-abhängige Proteinkinase aktiviert werden. Die Proteinkinase phosphoryliert die hormonsensitive Lipase an multiplen Stellen, was zu einer Translokation der Lipase vom Zytosol auf die Oberfläche der Lipidtropfen führt (Sztalryd *et al.*, 2003; Egan *et al.*, 1992; Brasaemle *et al.*, 2000a; Clifford *et al.*, 2000) und die Lipolyse ermöglicht.

Nicht phosphoryliertes Perilipin bildet eine Oberflächenbarriere auf Lipidtropfen, welche Triacylglycerin vor der Lipolyse durch die hormonsensitive Lipase schützt (Souza *et al.*, 1998; Londos *et al.*, 1999a). Unter normalen Bedingungen und in Anwesenheit von Insulin (Egan *et al.*, 1990; Mooney und Bordwell, 1991) ist Perilipin gering phosphoryliert und reduziert den Zugang zytosolischer Lipasen zu gespeichertem Triacylglycerin (Martinez-Botas *et al.*, 2000; Tansey *et al.*, 2001; Tansey *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2002) durch einen bisher uncharakterisierten Mechanismus. Dies fördert die Speicherung von Triacylglycerin. Brasaemle *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die ektope Expression von Perilipin A in Fibroblasten zu vermehrter Speicherung von Triacylglycerin in Lipidtropfen führt gegenüber Kontroll-Zellen, denen das Perilipin fehlt. Ferner konnte gezeigt werden, dass der  $TNF\alpha$  über einen Mechanismus, der eine Reduktion der Perilipin-Expression und eine Neuverteilung des Proteins in der Zelle beinhaltet, zu gesteigerter Lipolyse in 3T3-L1 Adipozyten führt (Souza *et al.*, 1998). Eine Überexpression von Perilipin A und B in 3T3-L1 Adipozyten hindert  $TNF\alpha$  daran, die Lipolyse zu steigern (Souza *et al.*, 1998).

Phosphoryliertes Perilipin erlaubt über eine Modifikation seiner Oberfläche der hormonsensitiven Lipase den Zugang zum Lipidtropfen (Souza *et al.*, 1998; Londos *et al.*, 1995) und ermöglicht einen starken Anstieg der Lipolyserate (Souza *et al.*, 2002; Tansey *et al.*, 2003; Sztalryd *et al.*, 2003; Londos *et al.*, 1999a). Eine neuere Studie hat ergeben, dass die Anwesenheit der Perilipine auf den Oberflächen der Lipidtropfen erforderlich ist, damit die hormonsensitive Lipase an die Lipidtropfen andocken kann (Sztalryd *et al.*, 2003). Möglicherweise sind die Perilipine hormonsensitive Lipase-bindende Proteine. Darüber hinaus interferiert die Mutation der drei N-terminalen Stellen der Proteinkinase mit dem Andocken der hormonsensitiven Lipase (Sztalryd *et al.*, 2003), so dass die Phosphorylierung von Perilipin eine Rolle beim Andocken der Lipase spielen könnte. Hierfür enthält die Struktur des Perilipins wahrscheinlich eine Sequenz oder Domäne, die Lipasen bindet.

Die Anfangs-Aminosäuresequenz des Perilipins enthält sechs Proteinkinase-übereinstimmende Stellen. Garcia *et al.* (2003) konnten kürzlich zeigen, dass sowohl die N- als auch die C-Termini des Perilipin A wichtige Rollen in der Speicherung von Triacylglycerin durch Reduktion der Lipolyse spielen. 3T3-L1-Präadipozyten, welche Perilipin exprimieren, das an Teilen des N- oder C-Terminus gekürzt wurde, speichern weniger Triacylglycerin als Zellen, welche vollständiges Perilipin exprimieren. Perilipin B und C, denen der C-Terminus fehlt, sollten dann weniger



Einfluss auf die Speicherung von Triacylglycerin haben. Ein neuerer Bericht von Tansey *et al.* (2003) zeigte, dass der Umsatz von Triacylglycerin in ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, welche Perilipin B exprimieren, schneller abläuft, verglichen mit Zellen, denen Perilipin fehlt.

Dagegen scheint die N-terminale Domäne aus 105 Aminosäuren, die bei allen Mitgliedern der PAT-Familie von Lipidtropfen-assoziierten Proteinen vorkommt (Miura *et al.*, 2002; Greenberg *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 2001), hierfür entbehrlich zu sein.

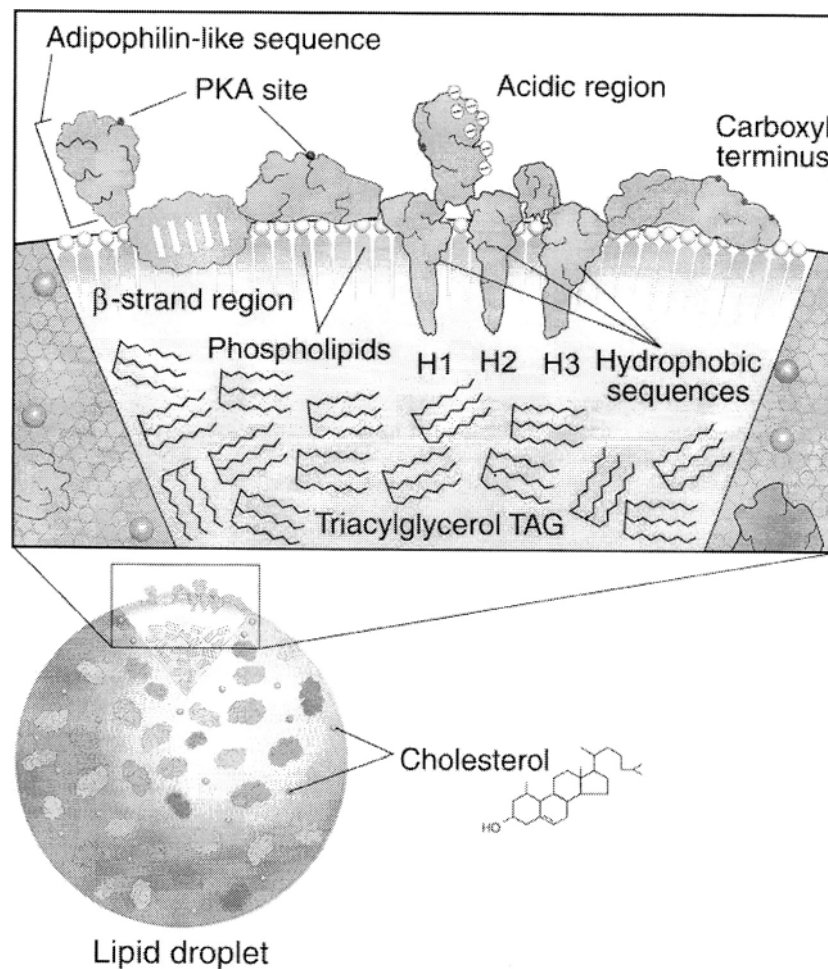


Abbildung 4: Hypothetisches Modell für die Assoziation von Perilipin A mit Lipidtropfen in Adipozyten (Brasaemle *et al.*, 2000b).

### 1.3.2.2 Adipophilin

Adipophilin – ursprünglich Adipose Differentiation-Related Protein (ADRP) genannt - wurde als erstes von Jiang *et al.* im Jahre 1992 identifiziert. Sie zeigten, dass ADRP mRNA am stärksten in Fettgewebe exprimiert wird und während der Adipozyten-

Differenzierung in Maus-1246-Zellen sehr früh induziert wird. Dies führte zu der Annahme, dass die Expression des Adipophilin auf Fettgewebe beschränkt ist (Jiang und Serrero, 1992).

Inzwischen weiß man, dass es sich um ein führendes Lipidtropfen-assoziiertes Protein handelt, welches in vielen Zelltypen von Säugern gefunden wird, einschließlich Hepatozyten, Adipozyten, Muskelzellen und Epithelzellen der Brustdrüse, entweder während der Entwicklung (Brasaemle *et al.*, 1997b) oder in den reifen Funktionszellen (Brasaemle *et al.*, 1997b; Londos *et al.*, 1999b; Heid *et al.*, 1998). Adipophilin ist einer der frühesten Marker der Adipozyten-Differenzierung, bei welcher seine mRNA 100-fach induziert wird innerhalb von 24 Stunden nach Beginn der Differenzierung der Präadipozyten (Jiang und Serrero, 1992). Darüber hinaus ist die vermehrte Expression des Adipophilin ein nützlicher Marker für pathologische Zustände, die gekennzeichnet sind durch zunehmende Akkumulation von Lipidtropfen (Heid *et al.*, 1998; Buechler *et al.*, 2001; Steiner *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999).

Das ubiquitäre Vorkommen des Proteins hat den Namen Adipose Differentiation-Related Protein unpassend erscheinen lassen, so dass 1998 erstmalig von Heid *et al.* der Name Adipophilin vorgeschlagen wurde.

Adipophilin bei Säugern ist ein Protein von ungefähr 400 bis 440 Aminosäureresten. Adipophilin hat offensichtlich keine Motive für die Bindung von Lipiden wie hydrophobe Regionen oder amphipatische  $\alpha$ -Helices, welche unter anderem in Apolipoproteinen gefunden wurden. Es ist unwahrscheinlich, dass Adipophilin – wie Perilipin - in vivo phosphoryliert wird, aber es kann sich posttranslationalen Modifikationen, einschließlich Acetylierung, unterziehen, welche seine Bindung an Lipidtropfen unterstützen könnten (Heid *et al.*, 1996). Verschiedene neuere Studien haben sich dem Transport und der Bindung des Adipophilins an Lipide mittels gekürzter Varianten zugewandt (McManaman *et al.*, 2003; Nakamura und Fujimoto, 2003). McManaman *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass Adipophiline, denen die Pat-Domäne oder die C-terminale Hälfte fehlt, korrekt zu Lipidtropfen gelangen und dort binden können (2003).

Adipophilin ist möglicherweise stärker an Lipidtropfen gebunden als Perilipin. In steroidbildenden Zellen der Nebenniere wurde Perilipin nach Aktivierung durch die Proteinkinase A rasch von den Lipidtropfen gelöst, während Adipophilin weiterhin fest anhaftete (Fong *et al.*, 2002).

Adipophilin wird auf den Oberflächen selbst der kleinsten Lipidtröpfchen in 3T3-L1-Zellen vor Induktion der Adipozyten-Differenzierung gefunden (Brasaemle *et al.*, 1997b). Wenn die Adipozyten-Differenzierung fortschreitet, bleibt Adipophilin etwa vier Tage auf der Oberfläche der sich vergrößernden Lipidtröpfchen bestehen, bis es ersetzt wird durch Perilipin (Brasaemle *et al.*, 1997b; Londos *et al.*, 1999b). Die Signifikanz dieser Überleitung ist unklar, aber Adipophilin ist assoziiert mit den frühen Stadien der Lipidtröpfchenbildung und kann in vielen Zelltypen persistieren. So wird Adipophilin in den Epithelzellen der Brustdrüse nicht durch Perilipin ersetzt (Brasaemle *et al.*, 1997b). Stattdessen wird es, assoziiert mit dem Milchfetttröpfchen, in den Milchkanal sezerniert (Heid *et al.*, 1996). Die ubiquitäre Verteilung des Adipophilins hat zu Spekulationen geführt, dass es eine Schlüsselrolle bei der Lipidtröpfchen-Biogenese in Säugern spielen könnte (Gao und Serrero, 1999). Weiterhin werden ihm Aufgaben zugeschrieben, wie z.B. Aufnahme von Fettsäuren (Gao und Serrero, 1999) und Sekretion von Milchlipiden (Mather und Keenan, 1998; McManaman *et al.*, 2002).

Adipophilin erhöht durch Zunahme der initialen Aufnahmerate spezifisch die Aufnahme langkettiger Fettsäuren, unabhängig, ob es sich um gesättigte, einfach ungesättigte oder mehrfach ungesättigte handelt (Serrero *et al.*, 2000). Auf die Aufnahme mittelkettiger Fettsäuren und Glucose hat Adipophilin jedoch keinen Effekt (Serrero *et al.*, 2000). Diese Daten lassen vermuten, dass Adipophilin spezifisch die Aufnahme langkettiger Fettsäuren vermittelt, und dass die Aufnahme mittelkettiger Fettsäuren über einen anderen Mechanismus abläuft. Obwohl der Transport langkettiger Fettsäuren durch die Zellmembran lange als passiver Prozess angesehen wurde (Noy *et al.*, 1986), lassen zunehmende Beweise die Vermutung zu, dass ein spezifischer und selektiver Transport für den transmembranösen Fluss der freien Fettsäuren verantwortlich ist (Schwieterman *et al.*, 1988; Abumrad *et al.*, 1981). Fettsäuren-bindendes Protein der Plasmamembran (FABPpm) (Stremmel *et al.*, 1985), Fettsäuren-Translocase (FAT) (Abumrad *et al.*, 1993), Fettsäuren-Transport Protein (FATP) (Schaffer und Lodish, 1994) und zwei andere vermeintliche Proteine (Trigatti *et al.*, 1991; Fujii *et al.*, 1987) konnten als Fettsäuren-Transporter in verschiedenen Geweben identifiziert werden. Die Eigenschaften von FABPpm, FAT und FATP als Fettsäuren-Transporter wurden weitgehend an Adipozyten, Hepatozyten und Myozyten untersucht (Schwieterman *et al.*, 1988; Sorrentino *et al.*, 1988; Schaffer und Lodish, 1994).

Neuere Studien haben die Verteilung von mit GFP-versehenem Adipophilin in humanen Zellkulturen untersucht und die Existenz zweier Populationen von Lipidtropfen-assoziiertem Adipophilin beobachtet (Targett-Adams *et al.*, 2003). Die eine Population bewegte sich rasch und stand anscheinend im Austausch mit anderen intrazellulären Lipid-Poolen. Die andere Population blieb in der Nähe des ER und war statischer. Es ist möglich, dass diese beiden Lipidtropfen-Poole in Transport und Langzeitspeicherung von Lipiden involviert sind.

Es wird angenommen, dass Adipophilin – wie Perilipin - an freien Ribosomen synthetisiert wird (Londos *et al.*, 1999b). Adipophilin wurde allerdings von unserer Arbeitsgruppe im ER, im Zellkern und in der Plasmamembran gefunden.

Adipophilin ist vielleicht in verschiedene Formen zellulärer Dysfunktionen des Lipidmetabolismus involviert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Adipophilin und die Lipidtropfen-Akkumulation durch oxidiertes Low-Density Lipoprotein (LDL) während der Schaumzellbildung in humanen Makrophagen stark induziert wird (Wang *et al.*, 1999). Die Schaumzellbildung ist eines der frühesten Ereignisse in der Ätiologie der Atherosklerose.

Corsini *et al.* (2003) konnten zeigen, dass Adipophilin ebenfalls induziert wird, wenn Keratinozyten Hautirritationen ausgesetzt werden, was zu einer Neuverteilung von Lipiden von intrazellulären Membranen zu zytosolischen Lipidtropfen führt.

Die molekularen Mechanismen für die Regulation der Adipophilin-Expression sind bisher wenig verstanden. Adipophilin mRNA Expression wird durch Indomethazin (Ye und Serrero, 1998) und langkettige freie Fettsäuren (Gao *et al.*, 2000) stimuliert. Von beiden weiß man, dass sie direkt an den Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) binden und als PPAR $\gamma$ -Agonisten agieren (Kliwer *et al.*, 1997). So könnte die Expression des Adipophilins durch Indomethazin und freie Fettsäuren ein sekundärer Effekt der Aktivierung des PPAR $\gamma$ -Pathways sein, welcher ein Schlüssel-Regulator der Adipogenese ist (Ye und Serrero, 1998).

#### 1.3.2.3 Tip47, PP17, S3-12 und andere Proteine der PAT-Familie

Die homologen N-terminalen Regionen von Adipophilin und Perilipin sind einer dritten Klasse von Proteinen sehr ähnlich, welche unterschiedlich als Tail-interacting 47 kDa Protein (TIP47) oder Placental tissue Protein 17 (PP17) bezeichnet werden.

Diese beiden Proteine sind tatsächlich zueinander identisch, aber wurden ursprünglich in unterschiedlichen Zellsystemen charakterisiert.

TIP47 ist ein Säuger-Protein, von welchem ursprünglich berichtet wurde, dass es an zytosolische Domänen des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors bindet und in deren Transport von Endosomen zum Golgi-Apparat involviert ist (Diaz und Pfeffer, 1998). Diese Sichtweise wurde in neuerer Zeit von Wolins *et al.* (2001) angefochten, welche zeigen konnten, dass TIP47 in immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an HeLa-Zellen nicht zusammen mit Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren lokalisiert ist.

In den letzteren Jahren gab es einige Berichte, dass TIP47 auch mit Lipidtropfen assoziiert sein kann (Wolins *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2002), obwohl dies auch angefochten wurde (Barbero *et al.*, 2001). Ohashi *et al.* (2003), Than *et al.* (2003) und Robenek *et al.* (2005) konnten die Anwesenheit von TIP47 auf Lipidtropfen bestätigen.

PP17 ist eine Klasse von humanen Schwangerschafts-zugehörigen Proteinen, welche Spleiss-Varianten eines einzelnen Genproduktes sind, das ein lösliches 48 kDa-Protein aus 434 Resten kodiert (Than *et al.*, 1998; 1999a).

Varianten von PP17 werden hochreguliert in Zervix-Karzinom-Patientinnen gefunden (Than *et al.*, 1998). Es wurde vorgeschlagen, dass die Induktion von TIP47/PP17 mit einer Infektion durch das Herpes simplex-Virus Typ II verbunden sein könnte, welches einer der Haupturheber in der Ätiologie des Zervix-Karzinoms ist (Than *et al.*, 1999b).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Variante PP17b mit Lipidtropfen in HeLa-Zellen assoziiert ist (Than *et al.*, 2003). Somit könnten PP17/TIP47 sowohl im Golgi-lysosomalen Transport als auch als Bestandteile von Lipidtropfen eine Rolle spielen.

S3-12 wurde wie Adipophilin ursprünglich in sich differenzierenden Säuger-Adipozyten gefunden (Scherer *et al.*, 1998). Es konnte jetzt gezeigt werden, dass S3-12 in einer den anderen PAT-Proteinen ähnlichen Weise an Lipidtropfen bindet (Wolins *et al.*, 2003). Seine Funktion und mögliche Interaktion mit anderen Mitgliedern der PAT-Familie ist noch nicht bekannt.

Ein Adipophilin-Homologon, das fatvg Protein, beschrieben Chan *et al.* in Oozyten des *Xenopus laevis* (1999). Das fatvg Protein ist zu 60% identisch mit Adipophilin über die gesamte Sequenz von 408 Aminosäuren. Es besteht kein Zweifel daran, dass dieses Protein ein Äquivalent des Adipophilin in Amphibien darstellt. Allerdings

kennt man seine exakte Funktion bisher nicht und weiß ferner nicht, ob es an subzelluläre Lipidstrukturen bindet.

Gronke *et al.* (2003) und Teixeira *et al.* (2003) berichten über ein PAT-ähnliches Protein, das *Drosophila melanogaster* CG9057 Genprodukt, welches sowohl Adipophilin und Perilipin als auch dem *Xenopus fatvg* Protein ähnelt, und für die Regulation des Lipidspeichers in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* verantwortlich ist.

## 1.4 Untersuchte Zellen

### 1.4.1 Adipozyten

Adipozyten sind Zellen des Fettgewebes, welche isoliert oder in kleinen Gruppen vorkommen. Meistens aber bilden sie so genannte Lämpchen, welche von Kollagenfasern umfasst werden.

Fettgewebe erfüllt verschiedene Aufgaben: Es dient als Energiespeicher, Wärme- und Kälteisolationsschicht, hat als Füllgewebe (Baufett) wichtige mechanische Schutz- und Polsterfunktion und vermag Östrogene zu synthetisieren.

Es wurde kürzlich vorgeschlagen, dass Fettgewebe heterogener sein könnte, als bisher vermutet: einerseits funktionieren Adipozyten als Langzeitenergiespeicher, andererseits agieren z.B. Adipozyten, die perinodalen, lymphoiden Zellen anliegen, als rasch verfügbare Kurzzeitspeicher der Triacylglycerin-Vorläufer von Eicosanoiden (Pond, 1999).

Aufgrund der Lokalisation und der Struktur der Fettzellen sowie aufgrund ihrer Farbe, Gefäßversorgung und Funktion können zwei Arten von Fettgewebe unterschieden werden:

- univakuoläres (weißes) Fettgewebe
- multivakuoläres (braunes) Fettgewebe (Abb. 5).

Das Fettgewebe des Erwachsenen ist überwiegend univakuolär. Mit Ausnahme von den Augenlidern, Ohrläppchen, Penis und Skrotum kommt es überall vor, ist jedoch alters- und geschlechtsspezifisch verteilt. Die Farbe hängt von der Ernährung ab, sie schwankt zwischen weiß und dunkelgelb. Besonderen Einfluss auf die Farbe nehmen die fettlöslichen Karotinoide.

Zellen des univakuolären Fettgewebes sind mit einem Durchmesser bis zu 100 µm vergleichsweise sehr groß. Isolierte univakuoläre Fettzellen enthalten einen großen Fetttropfen und sind rund, werden aber im Fettgewebe, wo sie dicht gepackt

zusammen liegen, polyedrisch. Ohne Membranabgrenzung füllen die eingelagerten Lipide (Paraplasma) nahezu den gesamten Zellraum aus und drängen Zytoplasma und Zellkern an die Zellperipherie. Der schmale Zytoplasmasaum zusammen mit dem Zellkern gibt der Zelle nach Fixierung die typische Siegelringform.

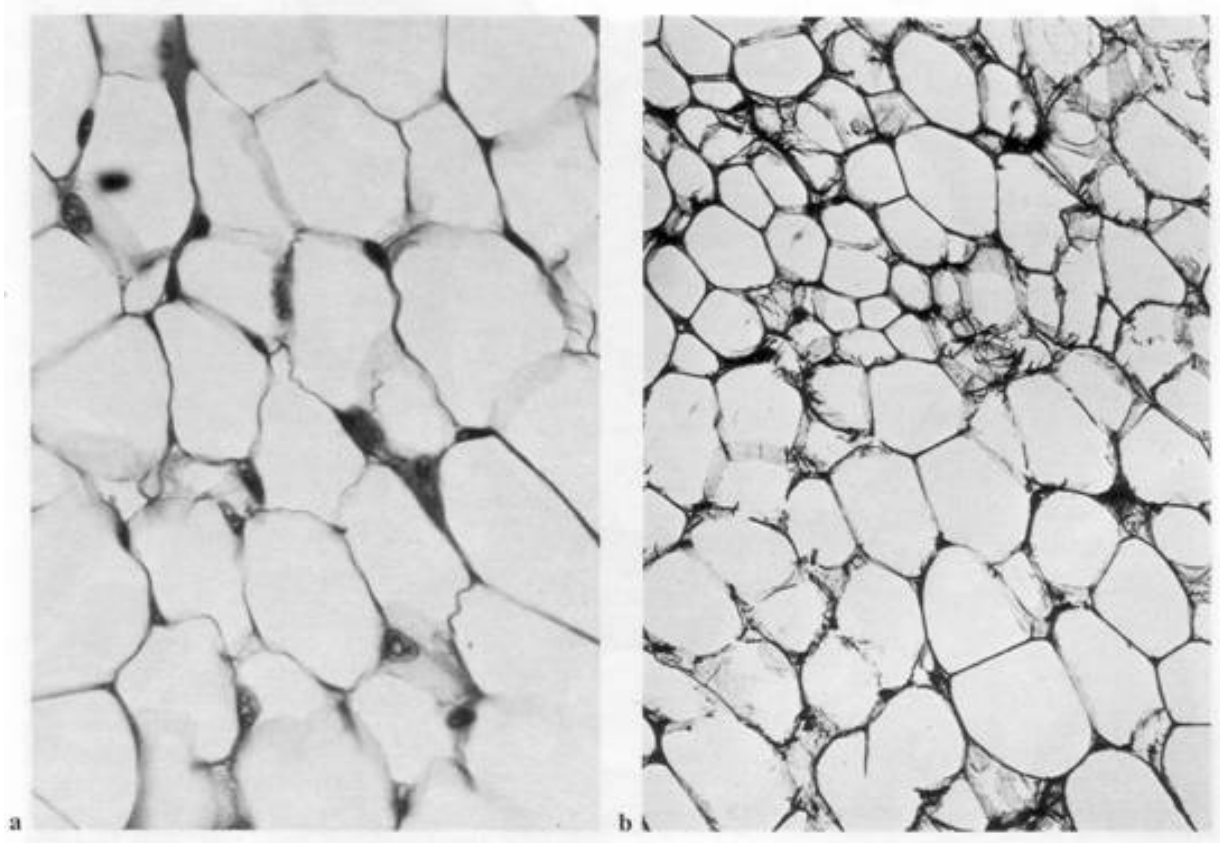


Abbildung 5: Univakuoläres Fettgewebe. a) HE Färbung Vergrößerung: x 320 b) Versilberung nach Gomori. Zu beachten sind die extrazellulär gelegenen retikulären Fasern. Vergrößerung: x 250 (Junqueira und Carneiro, 1996).

Multivakuoläres Fettgewebe fällt durch seine Eigenfarbe auf und wird deswegen auch als braunes Fettgewebe bezeichnet. Dies geht weitgehend auf die reichliche Kapillarisation und den Zytochromgehalt der vielen Mitochondrien im Zytoplasma der multivakuolären Fettzellen zurück (Abb. 6).

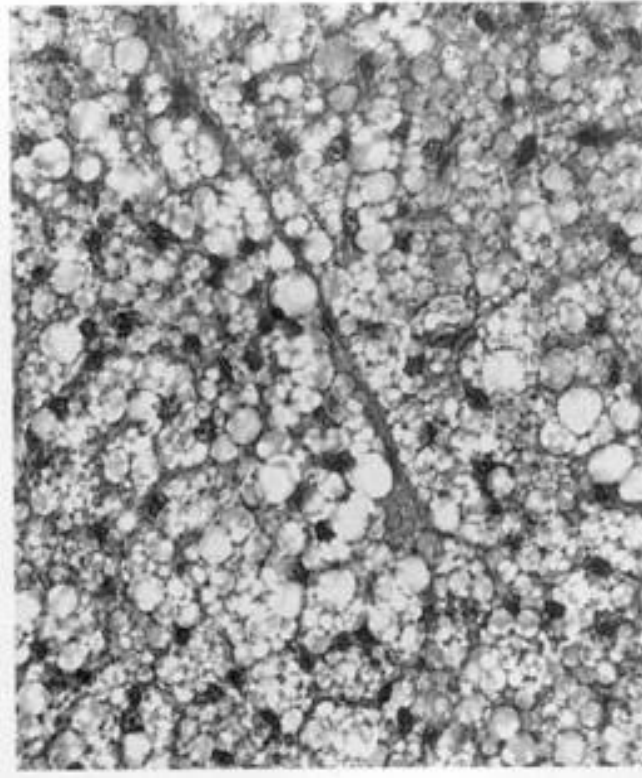


Abbildung 6: Mikrophotographie eines multivakuolären Fettgewebes (braunes Fettgewebe). Jede einzelne Fettzelle enthält zahlreiche kleine Fetttropfen. HE Färbung. Vergrößerung x 320 (Junqueira und Carneiro, 1996).

Braunes Fettgewebe ist nur in wenigen Körperregionen nachzuweisen, z.B. in der Nachbarschaft der Schilddrüse, an der Arteria carotis, am Nierenhilus, in der Axilla und im Nacken. Beim Säugling ist es umfangreicher als beim Erwachsenen und kann 2-5% des Körpergewichtes betragen. Es wird nach der Geburt nicht mehr gebildet, eine Umwandlung von braunem in weißes Fettgewebe kann beim Menschen nicht ausgeschlossen werden.

Multivakuoläre Fettzellen sind polygonal und kleiner (Durchmesser 15-25  $\mu\text{m}$ ) als die des univakuolären Fettgewebes. Ihr Zytoplasma enthält viele Fetttropfchen verschiedener Größe (Abb. 7).

Den zwei Formen von Fettgewebe wurden bisher unterschiedliche physiologische Funktionen zugeschrieben (Cousin *et al.*, 1993), obwohl die Existenz von Zwischenformen der Adipozyten zu der Annahme geführt hat, dass weiße und braune Fettzellen lediglich Extremformen eines einzelnen Kontinuums von Zelltypen sind (Pond, 1999).

Adipozyten stammen wahrscheinlich von Fibroblasten-ähnlichen Vorläuferzellen und - einmal gebildet - bleiben sie durch die gesamte Lebenszeit bestehen, wobei sie abhängig von ihrer Lipidbeladung schwellen und schrumpfen können. Das am



meisten genutzte Modell-System für die Studien der Adipozyten-Differenzierung sind Swiss 3T3-L1 Fibroblasten-Kulturen, wie sie erstmalig von Green und Kehinde beschrieben wurden (1975; 1976).

Die erste Stufe der Differenzierung ist die Bildung eines Adipoblasten, welcher die Fähigkeit verliert, sich zu teilen, und eine große Anzahl von kleinen Lipidtropfen von 1-2  $\mu\text{m}$  Größe akkumuliert. Adipoblasten entwickeln sich zu Präadipozyten, in welchen man viele Mitochondrien findet; die proliferierenden Lipidtropfen beginnen miteinander zu verschmelzen. In den reifen Adipozyten ist ein einzelner großer Lipidtropfen entstanden, der abhängig vom Ernährungszustand 25-200  $\mu\text{m}$  Durchmesser haben kann.

Braune Adipozyten stammen von ähnlichen Vorläuferzellen, aber im reifen Zustand enthalten sie zahlreiche viel kleinere Lipidtropfen von etwa 2-30  $\mu\text{m}$ . Die Fusion der Lipidtropfen ist wahrscheinlich ein regulierter zellspezifischer Prozess ist. Suter (1969) konnte zeigen, dass die Größe der Lipidtropfen in braunen Adipozyten von Ratten sich von 8-30  $\mu\text{m}$  auf 2-8  $\mu\text{m}$  reduzierte, nachdem man die warm akklimatisierten Tiere der Kälte ausgesetzt hatte.

Die relativ kleinen Lipidtropfen in braunen Adipozyten sind von einer großen Anzahl an Mitochondrien umgeben (Suter, 1969; Lever, 1957), die für die Erzeugung von Wärme in solchen Zellen (Lever, 1957; Zancanaro *et al.*, 1995) verantwortlich sind.

Bildung, Speicherung und Abgabe von Fetten sind bei Adipozyten reversible Prozesse. Fettspeichernde Zellen teilen sich nicht mehr. In vitro wandeln sich Adipozyten nach Abgabe ihrer Fettreserven in Vorläuferzellen um, die proliferieren und wieder differenzieren können.

Fettsäuren binden im Blut an Serumalbumine und gelangen durch Transzytose über das Endothel an die Membran der Adipozyten. Die Fettsäuren werden über die Plasmamembran aufgenommen und über Fettsäure-bindende Proteine ins Zytoplasma transportiert. Dort werden die Fettsäuren mit Glycerolphosphat aus dem Glukosemetabolismus zu Triglyceriden verestert.

Der Fettaufbau wird durch Insulin stimuliert, welches über Insulinrezeptoren die Aufnahme von Glucose in die Adipozyten steigert und die Rekrutierung von Glucosetransportern aus intrazytoplasmatischen Vesikeln in die Membran fördert.

Die Prozesse der Adipozyten-Differenzierung, Aufnahme von extrazellulären Fettsäuren zur Bildung von Triacylglycerin und der Lipolyse sind relativ gut charakterisiert, teilweise im Hinblick auf ihre hormonelle Regulation. Der Mechanismus der Lipidtropfenbildung, der Reifung und Mobilisation in Adipozyten ist jedoch noch weitgehend unverstanden.

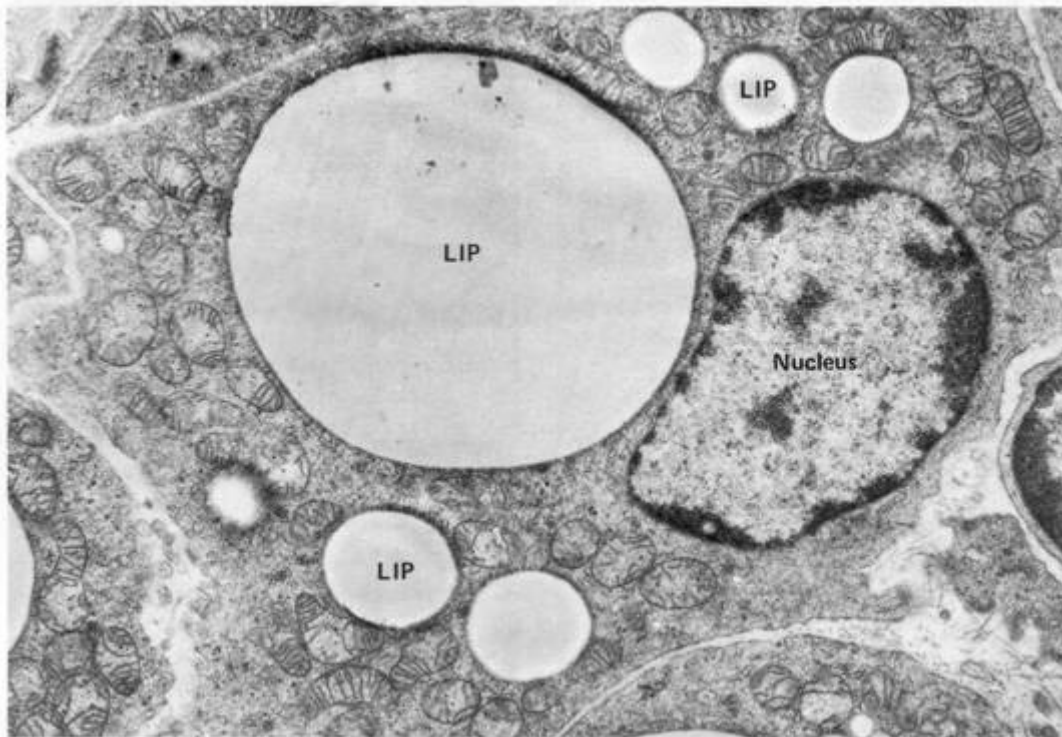


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer jungen Fettzelle. Das Zytoplasma enthält viele Fetttropfen (LIP). Vergrößerung: x 7500 (Junqueira und Carneiro, 1996).

#### 1.4.2 Makrophagen

Makrophagen treten im Körper weit verbreitet als mobile, vorübergehend sessile oder ortsgebundene Zellen auf. Migrationsaktive Makrophagen haben typischerweise eine unregelmäßige Oberfläche mit vielen Pseudopodien, während sessile Zellen eine glatte Oberfläche zeigen. Wenn das Zytoplasma mit Vakuolen, Vesikeln und Lysosomen angefüllt ist, deutet dies auf eine starke Phagozytoseaktivität hin. Ein deutlich entwickelter Golgi-Apparat und ein ausgeprägtes raues ER weisen auf Synthese- und Sekretionseigenschaften der Makrophagen hin (Robenek und Severs, 1992; Ross, 1993a).

Makrophagen spielen eine wichtige Rolle als antigenpräsentierende Zellen für T-Lymphozyten, eliminieren Noxen durch Phagozytose und werden als Syntheseort für verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren, Enzyme, Plasmaproteine und andere bioaktive Moleküle angesehen (Ross, 1993a; Raines *et al.*, 1996).

Makrophagen leiten sich von Monozyten ab. Monozyten entstehen im Knochenmark, verweilen dann 8-74 Stunden im Blut, treten durch die Wand von Kapillaren oder Venulen hindurch und gelangen schließlich ins Bindegewebe, wo sie zu Makrophagen werden. In manchen Organen nehmen die Makrophagen die Gestalt

besonderer Zellen an, z.B. in der Leber von Kupffer-Sternzellen und in der Lunge von Alveolarmakrophagen. Die Kenntnisse über die zelluläre Kommunikation und die zugrunde liegenden Signalprozesse der Einwanderung und Ausdifferenzierung der Monozyten in Geweben sind jedoch noch unvollständig.

Makrophagen spielen eine wichtige Rolle beim Neutralisieren und Entfernen von Fremdkörpern, wie z.B. Pathogenen und Zelltrümmern nach Verletzung. In den Körper eingedrungene Substanzen werden von Makrophagen in großer Menge phagozytiert. Die inkorporierten Stoffe werden zum Teil in Phagolysosomen enzymatisch abgebaut oder intrazellulär gespeichert. Eine Reihe von Membranrezeptoren steuert die Aufnahme dieser Stoffe in Makrophagen.

Zusätzlich zu ihrer Reinigungsfunktion sind Makrophagen eine reiche Quelle von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und könnten die Hauptmediatoren von Zellmigration und -proliferation in atherosklerotischen Läsionen sein (Ross, 1993a).

In der intakten Gefäßwand kommen Makrophagen nur vereinzelt vor (Stary, 1989). Mit Beginn und fortschreitender Progression der Atherosklerose nimmt deren Anzahl in der Gefäßwand stark zu. Im Verlauf der Atherogenese haften Monozyten, vermittelt durch verschiedene Adhäsionsmoleküle, an Endothelzellen. Der Migrationsprozess über das Endothel ist bis heute nicht vollständig geklärt. Von den Endothelzellen abgegebene chemoaktive Stoffe, wie z.B. das Monozyten-Chemoattraktive-Protein-1 (Takeya *et al.*, 1993) und modifiziertes Lipoprotein (Quinn *et al.*, 1987) werden als Migrationsstimulantien in Erwägung gezogen. Bei einer Endothelschädigung werden Adhäsionsmoleküle synthetisiert und es kommt zu einer erhöhten Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten.

Makrophagen sind außerdem die Hauptherkunftsquelle der Lipid-beladenen Schaumzellen, welche eine der frühesten Manifestationen der Atherosklerose darstellen (Ross, 1995a; Small, 1988; Goldstein *et al.*, 1979).

Makrophagen exprimieren Rezeptoren für LDL,  $\beta$ -VLDL und für modifizierte Lipoproteine, die sogenannten Scavenger-Rezeptoren. Über die LDL-Rezeptoren, auch Apoprotein B/E-Rezeptoren genannt, erfolgt die Bindung und Aufnahme von LDL. Bei Erreichen eines bestimmten Cholesterinlevels wird die Aufnahme gestoppt (Munro und Cotran, 1988). Die Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen über die Scavenger-Rezeptoren wird dagegen nicht reguliert, so dass die Makrophagen kontinuierlich modifizierte Lipoproteine aufnehmen. Die vielen Lipidtropfen im Zellinneren verleihen den Makrophagen im Licht- und Elektronenmikroskop ein schaumiges Aussehen, weshalb sie als Schaumzellen bezeichnet werden (Munro und Cotran, 1988). Makrophagen lassen sich auch *in vitro* durch Zugabe von

modifizierten Lipoproteinen zu Schaumzellen transformieren. Die meisten Schaumzellen verbleiben in der Intima und werden mit der Zeit nekrotisch. Einige Studien gehen davon aus, dass Schaumzellen wieder zurück in den Blutstrom wandern und damit Lipide aus der Gefäßwand entfernen können.

Makrophagen sind zusammen mit anderen Leukozyten wie Eosinophilen und Neutrophilen wichtige Stellen des Arachidonsäuremetabolismus. Die Derivate der Oxidation von Arachidonsäure schließen Eicosanoide wie Prostaglandine, Prostazykline und Thromboxane ein, die durch die Cyclooxygenase gebildet werden, sowie Leukotriene und Hydroxy-/Hydroperoxy-Fettsäuren, die durch die Lipoxygenase entstehen. Diese Mediatoren spielen wichtige Rollen in diversen zellulären Prozessen einschließlich Entzündung, Immunität, Tumorentstehung und Hämostase (Dvorak *et al.*, 1983a). Obwohl viele Lehrbücher voraussetzen, dass Phospholipide der Plasmamembran, angereichert mit Arachidonsäure, die Haupt- oder sogar einzige Quelle für diese Verbindungen sind, fanden sich in den letzten Jahren zunehmende Beweise, dass Triacylglycerin-reiche Lipidtropfen eine wichtigere Rolle als Phospholipide im Arachidonsäuremetabolismus spielen könnten (Dvorak *et al.*, 1983b).

Die Akkumulation von Lipidtropfen in Makrophagen ist seit langer Zeit sowohl im physiologischen Zustand (Dvorak *et al.*, 1983) als auch in verschiedenen pathologischen Zuständen (Schlesinger *et al.*, 1982) bekannt. Während Makrophagen unter normalen Bedingungen relativ wenige Lipidtropfen enthalten, sind diese umso zahlreicher in Makrophagen, die in Entzündung, Atherosklerose und Neoplasien involviert sind (Galli *et al.*, 1985). Dvorak *et al.* (1983) beobachteten, dass Stimulation der Phagozytose zu einer Bewegung der Lipidtropfen um die Phagolysosomen führte, in welche sie ihren Inhalt abgaben. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Lipidtropfen bei der Funktion von Makrophagen eine aktivere Rolle einnehmen als bisher angenommen (Murphy, 2001).

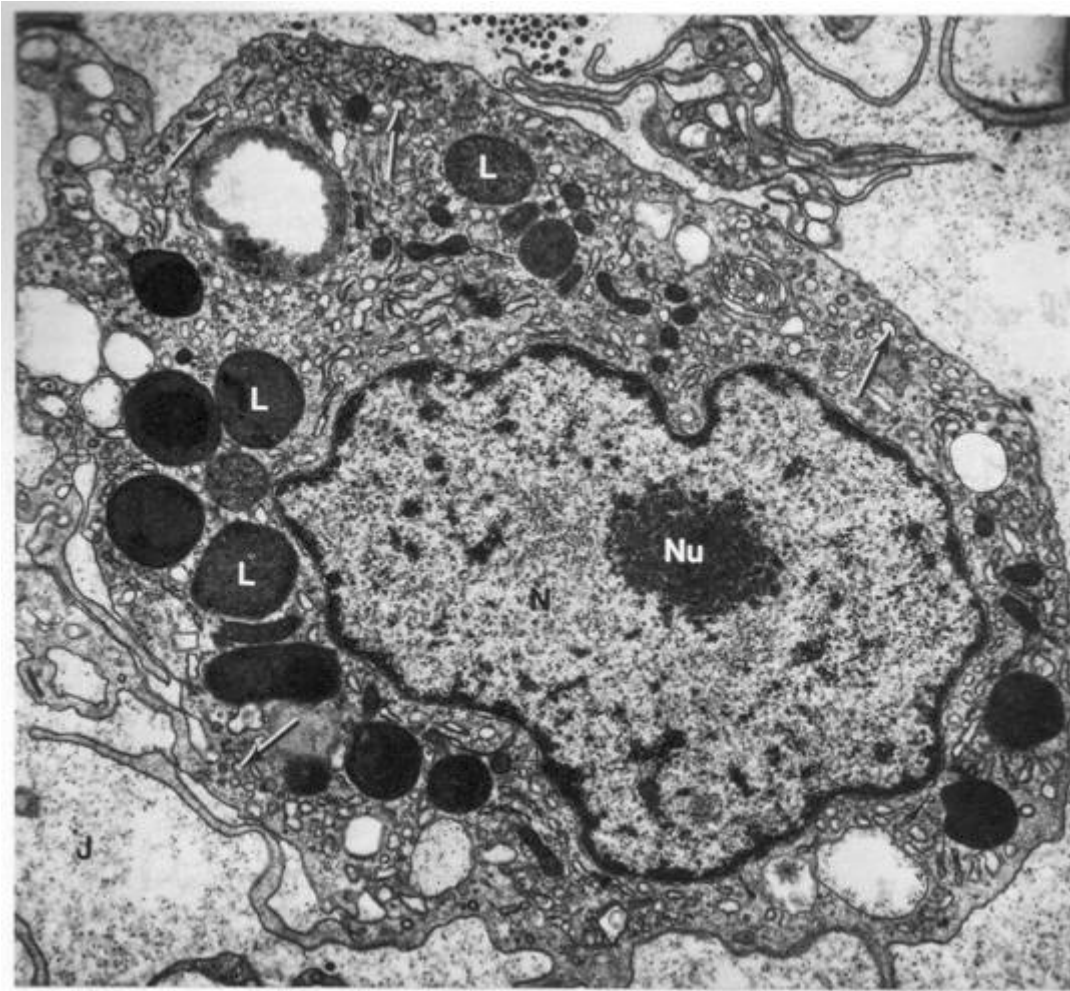


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Makrophagen (L sekundäre Lysosomen, N Zellkern, Nu Nukleolus). Die Pfeile weisen auf pinozytische Bläschen. Verkleinert von 15000-facher Vergrößerung (Junqueira und Carneiro, 1996).

## 1.4 Ziele der Arbeit

Lipidtropfen sind dynamische subzelluläre Strukturen, die für die Membran-Biosynthese, die Cholesterin-Homöostase, den Cholesterin-Metabolismus, den Lipidtransport und die Energiebalance erforderlich sind. Sie sind zusammengesetzt aus einem Kern aus neutralen Lipiden (Triacylglycerin, Diacylglycerin und Sterol-Ester), umgeben von einem Monolayer aus Phospholipiden und freiem Cholesterin. Lipidtropfen werden am ER gebildet.

Verschiedene Proteine sind mit der Oberfläche von Lipidtropfen assoziiert und werden als notwendig für Gestaltung und Funktion der Lipidtropfen erachtet. Die bisher am besten beschriebenen Lipidtropfen-assoziierten Proteine sind die Perilipine, eine Proteinfamilie, die durch unterschiedliches Spleißen eines einzelnen Genproduktes entstehen und Adipophilin, auch Adipose Differentiation-Related-Protein genannt.

Bisher wurde angenommen, dass die Lipidtropfen-assoziierten Proteine ausschließlich in dem den Lipidtropfen umgebenden Monolayer vorkommen.

Diese Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, neue Erkenntnisse über die Topographie und Dynamik der Proteine in Lipidtropfen zu gewinnen. Als Versuchszellen dienten:

- 1) Adipozyten
  - a. unter normalen Bedingungen
  - b. nach Behandlung mit acetyliertem Low Density-Lipoprotein
  - c. nach Behandlung mit Brefeldin A
- 2) Makrophagen unter normalen Bedingungen

Die Untersuchungen wurden im Wesentlichen mit Hilfe der Natrium Dodecyl Sulfat-(SDS-) Gefrierbruch-Immunzytochemie durchgeführt. Grundlage dieses Verfahrens bildet die elektronenmikroskopische Darstellung dieser Proteine in Platin/Kohle Replikas von Membranbruchflächen mittels primärer und sekundärer goldmarkierter Antikörper. Mit dieser Methode ist es möglich, das Verteilungsmuster der Proteine in Lipidtropfen zu vergleichen und ihr Vorkommen zu quantifizieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Isolierung und Kultur

##### 2.1.1.1 THP-1-Zellen

Die humane Monozytenzelllinie THP-1 wurde von der Fa. American Type Culture Collection (ATCC Inc.) bezogen. Nach dem Auftauen erfolgte eine Vermehrung der Zellen in Suspensionskultur mit RPMI 1640 (Invitrogen Inc.) als Kulturmedium. Das RPMI 1640-Kulturmedium wurde zuvor mit 10% (v/v) FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 20 mM L-Glutamin und 1% (v/v) nicht-essentiellen Aminosäuren versetzt. Die Zellzahl durfte einen Wert von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml nicht überschreiten. War dies doch der Fall, wurden die Zellen 5 min bei  $400 \times g$  abzentrifugiert, das Kulturmedium abgenommen und die Zellzahl auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Ausdifferenzierung der Monozyten erfolgte durch dreitägige Inkubation der Zellen mit 50 ng/ml PMA in Kulturmedium. Nach der Ausdifferenzierung und der damit einhergehenden Adhäsion der Zellen an den Kulturflaschenboden wurde das PMA-haltige Kulturmedium entfernt.

##### 2.1.1.2 3T3-L1-Zellen

Die Zellen wachsen als Präadipozyten sehr schnell. Sie wurden in einer Kulturflasche ( $75 \text{ cm}^2$ ) alle drei Tage gesplittet (1:10 bis 1:15 pro Flasche). Es musste darauf geachtet werden, dass die Kultur nicht konfluent wurde.

Zur Ausdifferenzierung wurde die Flasche so ausgesät, dass sie zu 10% mit Zellen bedeckt war. Als Differenzierungsmedium wurde DMEM, 15% FCS und 2mM Glutamin verwendet. Für ein besseres Wachstum der Zellen wurde Ciglitazone hinzugefügt. Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage.

Waren die Zellen lückenlos konfluent, wurde von Tag 1 gesprochen. Am Tag 3 wurde mit der Zugabe der Substanzen begonnen, die Zellen wuchsen nicht mehr. Es wurde Differenzierungsmedium,  $10 \mu\text{M}$  Ciglitazone ( $20 \text{ mM}$  in DMSO),  $0.5 \text{ mM}$  IBMX ( $100 \text{ mM}$  in DMSO),  $1 \mu\text{M}$  Dexamethason ( $1 \text{ mM}$  in DMSO) und  $10 \mu\text{g/ml}$  bovines Insulin ( $10 \text{ mg/ml}$ ) hinzugefügt. An Tag 5 und 7 wurden Differenzierungsmedium,  $10 \mu\text{g/ml}$  Insulin und  $10 \mu\text{M}$  Ciglitazone zugegeben. Nachdem die Zellen ausdifferenziert

waren, wurde Differenzierungsmedium zugegeben und die Zellen wurden nach 4-5 Tagen geerntet.

### 2.1.2 Experimente mit Brefeldin A

Brefeldin A wurde in Äthanol gelöst und als Stammlösung von 5 mg/ml bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Zellen wurden mit 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Brefeldin A für 2h, 8h und 16h behandelt. Anschließend wurden die Zellen für die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie vorbereitet, wie unter 2.2.2.3.2 beschrieben.

### 2.1.3 Experimente mit acetyliertem Low Density-Lipoprotein

Acetyliertes Low Density-Lipoprotein (AcLDL) wurde in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dem Medium hinzugefügt und über 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgewaschen und die Zellen für die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie, wie unter 2.2.2.3.2 beschrieben, vorbereitet.

### 2.1.4 Zellzählung

Mittels eines elektronischen Zählgerätes (Casy 1, Schärfe System, Reutlingen) wurden die Zellkonzentrationen bestimmt. Durch Messung des elektronischen Widerstandes in einer Messkapillare berechnet das Gerät neben der Anzahl auch das Volumen und den Durchmesser der Zellen.

## 2.2 Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopische Aufarbeitung der Zellen

### 2.2.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erfolgten an Monolayer-Kulturen. Besonders geeignet für diese Untersuchungen waren Zellkulturen, die auf sogenannten Lab-Tek (Greiner, Nürtigen) gewachsen waren. Lab-Tek sind Glasobjektträger, auf denen ein oder zwei Kunststoffrähmchen installiert sind, wodurch ein oder zwei Kammern entstehen. Für die Experimente wurden zweikammerige Lab-Tek verwendet. Pro Kammer wurden 50.000 Zellen ausgesät und über Nacht im Kulturmedium kultiviert. Am folgenden Tag waren die Zellen



angewachsen und subkonfluent. Sie wurden nach folgendem Schema für die Immunfluoreszenz inkubiert:

- Spülen mit PBS
- Fixieren und Permeabilisieren mit 4% Formaldehyd/0.5% Triton X-100 in PBS für 30 min bei Raumtemperatur
- Spülen mit PBS (3x10 min)
- Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in PBS/1% BSA) für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur
- Spülen mit PBS (3x10 min)
- Inkubation mit FITC-gekoppelten sekundären Antikörpern (verdünnt in PBS/1% BSA, die jeweilige Verdünnung erfolgte nach Angaben des Herstellers oder wurde in Vorversuchen ermittelt) für 1 h bei Raumtemperatur
- Spülen mit PBS (6x10 min)
- Eindeckeln der Präparate in 10% PBS, 90% Glycerin und 0.1% p-Phenylendiamin zur Vermeidung des schnellen Ausbleichens der Präparate

Die Fluoreszenz-Präparate sind bei 4°C ca. 4 Wochen haltbar.

Die Auswertung erfolgte an einem Axiophot 2 Mikroskop der Firma Zeiss (Jena) mit Epifluoreszenzeinrichtung (Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 200, Erregerfilterkombination BG 38/K445/TK 510, Sperrfilter K513, 450-490 nm).

Die Bestimmung der Immunmarkierung wurde durch folgende Kontrollen geprüft:

- Bestimmung der Autofluoreszenz
- Inkubation mit den sekundären FITC-markierten Antikörpern ohne vorherige Inkubation mit primären Antikörpern.

## 2.2.2 Elektronenmikroskopie

### 2.2.2.1 Standardaufarbeitung für Ultradünnschnitte

Die Zellen wurden in der Kulturschale mit Karnovsky's Reagenz 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Das Reagenz setzte sich zusammen aus 40 g Paraformaldehyd, 200 ml 25% Glutaraldehyd, 400 ml 0.2 M Natrium-Cacodylat, 0.5 g Kalziumchlorid auf 1 l Aqua dest. (pH 7.3). Anschliessend wurden die Zellen 30 min mit PBS gewaschen, 60 min mit 1.3% Osmium-Collidin-Tetroxid in 0.1 M Collidinpuffer (pH 7.3). Die Zellen wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. 30%, 50%, 70%, 90% und 96%iger Alkohol wurden jeweils 15 min, 100%iger Alkohol 2x20 min auf den Zellen belassen.

Die so entwässerten Zellen wurden mit Propylenoxid vom Schalenboden abgelöst und in Zentrifugenröhrchen überführt. Sie wurden 15 min in Propylenoxid stehengelassen und dann 10 min bei 1500 x g zentrifugiert. Das Propylenoxid wurde als Überstand abgesaugt, auf die pelletierten Zellen wurde ein 1:1 Propylenoxid-Epon-Gemisch gegeben. In diesem Gemisch blieben die Zellen bei Raumtemperatur 4 h stehen und wurden nach erneuter Zentrifugation (10 min bei 1500 x g) und Absaugen des Überstandes in BEEM-Kapseln überführt. In den BEEM-Kapseln befand sich bereits ein Tropfen Epon 812 (Luft, 1961). Die Zellen mussten möglichst als kompaktes Pellet in der Spitze der BEEM-Kapsel liegen, um später für das Schneidegerät gut zugänglich zu sein. Daher wurde zunächst in einer Heraeus-Christ-Zentrifuge 5-10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Kapseln randhoch mit Epon 812 aufgefüllt und 48 h bei 56°C polymerisiert.

Ultradünnschnitte wurden mit einer Schnittdicke von 60-90 nm mit einem Diamantmesser (Diatome, Biel, Schweiz) an einem Reichert OmU2-Ultramikrotom (Cambridge Instruments, Nussloch) hergestellt. Die Schnitte wurden auf Kupfernetzen (150 Maschen, 3.05 mm, Plano, Marburg) aufgenommen, die mit 0.3% Formvar in Chloroform befilmt waren, und wurden teilweise mit 4% Uranylacetat-Dihydrat 20 min und 2.6% Bleizitrat nach Reynolds (1963) 2 min kontrastiert.

#### 2.2.2.2 Kryoultramikrotomie

Die Kryoultramikrotomie erfolgte nach einer Methode von Tokuyasu (1980). Die kultivierten Zellen wurden vor oder nach dem Abschaben vom Schalenboden mit 5% Formaldehyd in 0.2 M PIPES-Puffer (pH 7.0) für 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen 3x10 min in PIPES-Puffer gewaschen und mit einer Lösung aus 1.6 M Saccharose und 25% Polyvinylpyrrolidon (M=10.000) für 20 min inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert, auf Silber-Pins montiert und, in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren, bis zur Verwendung aufbewahrt.

Die Ultradünnschnitte wurden bei -100°C (Kryokammer) und -90°C (Messer) mit einem Ultramikrotom FC4E der Firma Reichert-Jung angefertigt. Die Schnitte wurden auf Kupfernetzen, die mit Formvar befilmt waren, aufgenommen. Die immunzytochemische Markierung wurde durch Übertragen der Kupfernetze auf 20 µl Tropfen in folgender Weise durchgeführt:

- Spülen mit PBS (3x10 min)
- Inkubation mit den primären Antikörpern (verdünnt in PBS/1% BSA) für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur

- Spülen mit PBS (3x10 min)
- Inkubation mit goldmarkierten sekundären Antikörpern (verdünnt in PBS/1% BSA, die jeweilige Verdünnung erfolgte nach Angaben des Herstellers oder wurde in Vorversuchen ermittelt) für 1 h bei Raumtemperatur.
- Spülen mit Aqua dest. (5x10 min)
- Kontrastierung mit Uranylacetat-Dihydrat (pH 7.4) für 10 min
- Spülen mit Aqua dest. (3x10 min)
- Stabilisierung der Schnitte mit 1% Methylzellulose in 0.5% Uranylacetat-Dihydrat (3x1 min) bei 0°C.

### 2.2.2.3 Gefrierbruch als Methode zur Analyse von Membranen

Biomembranen trennen zwei wässrige Kompartimente voneinander. Zwischen dem Zytoplasma und dem extrazellulären Medium befindet sich die semipermeable Plasmamembran. Entsprechend begrenzen andere Membranen den Innenraum der Organellen vom Zytosol. Alle biologischen Membranen bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht (Abb. 8). Sie enthalten als wichtige Bestandteile Proteine, die den verschiedenen Membrantypen die jeweils charakteristischen Eigenschaften verleihen. Die spezifischen Funktionen von Membranen werden erst durch das jeweilige Muster ihrer Membranproteine festgelegt. In den meisten eukaryotischen Zellen bildet eine Vielzahl intrazellulärer Membranen gesonderte Kompartimente bzw. Organellen wie Zellkern, ER, Golgi-Apparat, Lysosomen, Mitochondrien etc, in denen jeweils bestimmte Aufgaben erfüllt werden. Jede Organellmembran verfügt über ein bestimmtes Muster von Proteinen, welche für die biologische Aktivität der Zelle unverzichtbar sind. Das Muster der mit den Membranen assoziierten Proteine ist vom Zelltyp und von der subzellulären Lokalisation der jeweiligen Membran abhängig.

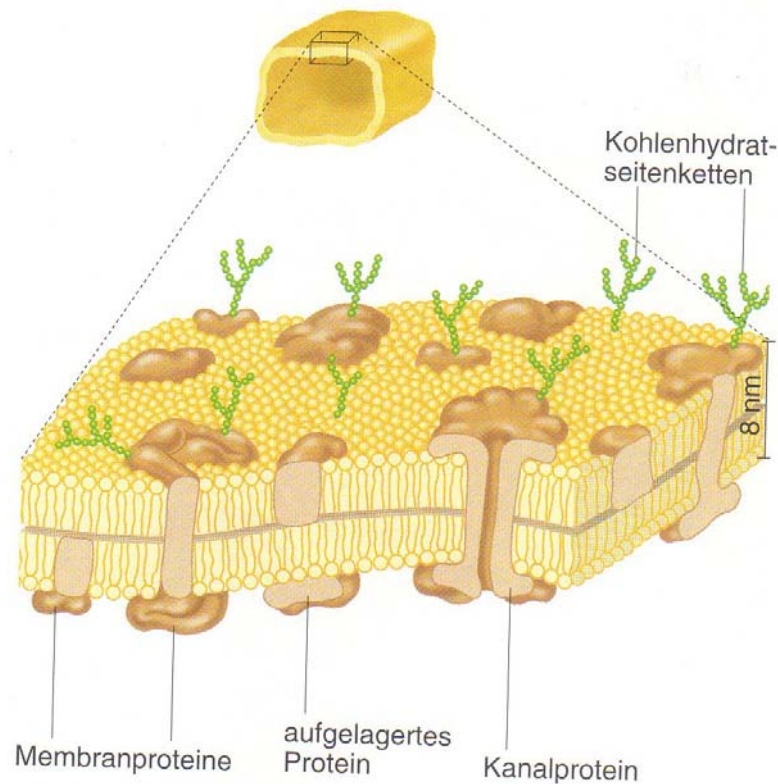


Abbildung 8: Modell der biologischen Membran. Bei tierischen Zellen ragen Ketten von Zuckermolekülen nach außen. Die Zucker (grün) sind mit einzelnen Proteinmolekülen (braun) bzw. Lipidmolekülen (gelb) verbunden (Linder, 1998).

#### 2.2.2.3.1 Konventionelle Gefrierbruchmethode

Die einzelnen Schritte der Gefrierbruchtechnik sind:

- Fixierung
- Gefrierschutz
- Gefrierbruch
- Platin/Kohle-Bedampfung
- Reinigung des Replikas mit Chlorbleiche
- Elektronenmikroskopie

Als Vorbereitung für die konventionelle Gefrierbruchmethode wurden die Zellen nach dem Abschaben vom Schalenboden mit Karnovsky's Reagenz bei Raumtemperatur fixiert und nach dem Auswaschen des Fixans für 2 h mit 30%igem Glycerin behandelt. Die Zellen wurden auf Gold-Objektträger montiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in der Gefrierätzanlage BA 300 (Balzers AG, Liechtenstein) gefriergebrochen. Die freigelegten Membranoberflächen wurden mit Platin in einem Winkel von  $38^\circ$  und mit Kohlenstoff in einem Winkel von  $45^\circ$  bedampft. Die mit einem Schwingquarz gemessenen Schichtdicken betragen für Platin 2 nm und für Kohle 20

nm. Nach dem Auftauen der Zellen wurde das Replika mit Hilfe von Chlorbleiche von den Zellresten befreit, gereinigt und auf unbefilmten Kupfernetzen aufgenommen.

#### 2.2.2.3.2 Natrium Dodecyl Sulfat-Gefrierbruch-Immunzytochemie

Die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie wurde nach der von Fujimoto (1995) entwickelten Methode durchgeführt. Im Prinzip unterscheidet sich diese Methode nur unwesentlich von der konventionellen Gefrierbruchtechnik (Abb. 9). Im Gegensatz zur herkömmlichen Gefrierbruchtechnik werden die Zellen bei der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie nicht fixiert. Abweichend von der Originalmethode haben wir die Zellen, bevor sie auf den Gold-Objektträgern montiert wurden, für 2-3 min in 30%igem Glycerin zentrifugiert. Der Gefrierbruch und die Bedampfung mit Platin/Kohle erfolgten wie bei der herkömmlichen Gefrierbruchtechnik. Für die Reinigung der Replikas wurde anstelle von Chlorbleiche 2.5% SDS benutzt. In der Regel wurden dafür 24-48 h benötigt. Die Immunzytochemie an den mit SDS gereinigten Replikas erfolgte in folgenden Schritten:

- Spülen in Aqua dest. (3 x 10 min)
- Inkubation mit primären Antikörpern (verdünnt in PBS/1% BSA) für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur
- Spülen in Aqua dest. (3 x 10 min)
- Inkubation mit sekundären goldmarkierten Antikörpern (verdünnt in PBS/1% BSA, die jeweilige Verdünnung wurde in Vorversuchen ermittelt) für 1 h bei Raumtemperatur
- Spülen in Aqua dest. (3 x 10 min)
- Inkubation mit sekundären goldmarkierten Antikörpern (verdünnt in PBS/1% BSA, die jeweilige Verdünnung wurde in Vorversuchen ermittelt) für 1 h bei Raumtemperatur
- Spülen in Aqua dest. (3 x 10 min)
- Aufnahme der markierten Replikas auf unbefilmte Kupfernetze

Die einzelnen Schritte der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie sind kurz zusammengefasst folgende:

- Keine Fixierung
- Kurzer Gefrierschutz (max. 3 min)
- Gefrierbruch
- Platin/Kohle-Bedampfung
- Reinigung der Replikas mit SDS

- Immunzytochemie
- Elektronenmikroskopie

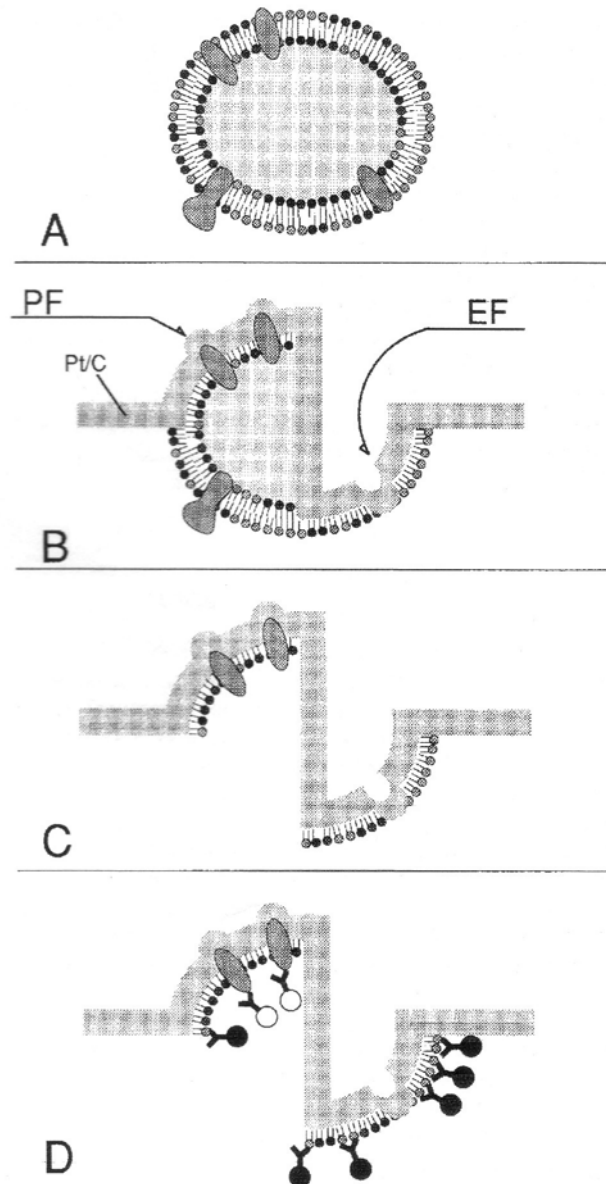


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Verlaufs des Gefrierbruchs und Immungoldmarkierung nach SDS-Reinigung des Replikas. A) Die Zelle ist gefroren. B) Der Gefrierbruch und die Platin/Kohle-Bedampfung (Pt/C) macht die exoplasmatische (EF) und die protoplasmatische (PF) Seite der Plasmamembran sichtbar. C) Mit SDS werden die nicht bedampften Zellen und Zellkomponenten aufgelöst, aber nicht die bedampften Membranbruchflächen. D) Das Replika wird mit primären und goldmarkierten sekundären Antikörpern inkubiert und markiert. (Fujimoto, 1997).

#### 2.2.2.4 Antikörper und Immungold

Für die immunzytochemischen Markierungen von Adipophilin an den Gefrierbrüchen wurde der monoklonale Maus anti-Adipophilin-Antikörper (AP 125, PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg) und für die immunzytochemische Markierung von Perilipin der polyklonale Meerschweinchen anti-Perilipin-Antikörper (GP29, PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg) verwendet. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde der an 12 nm kolloidales Gold gekoppelte Ziege anti-Maus-IgG (48057, Dianova, Hamburg) für Adipophilin und der Esel anti-Meerschweinchen IgG für Perilipin verwendet.

#### 2.2.2.5 Quantifizierung

Die Bestimmung der Anzahl der an die Membranbruchflächen gebundenen Goldpartikel wurde an Platin/Kohle-Replikas durchgeführt. Die Negativ-Fotografien in einer Vergrößerung von 16900 x wurden dazu mit Hilfe eines Vergrößerungsgerätes (Durst Laborator 1200) auf eine Endvergrößerung von 44000 x gebracht und auf ein Blatt Millimeterpapier projiziert. Auf dem Millimeterpapier wurden Felder mit jeweils 1.1 cm x 1.1 cm entsprechend einer Plasmamembranoberfläche von 0.063 µm<sup>2</sup> festgelegt. Die Auszählung der Goldpartikel in diesen Feldern wurde für jeden Zelltyp an mindestens 20 verschiedenen Zellen durchgeführt. Die Angabe der Anzahl der Goldpartikel erfolgte in Anzahl/1 µm<sup>2</sup>.

#### 2.2.2.6 Bilddokumentation

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Philips EM 201 bzw. 410 mit Kodak 4489-Filmsplatten hergestellt. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurde Kodak TMax 27 DIN bzw. Kodak GC400 benutzt. Bildabzüge wurden mit Agfa Brovira-Papier hergestellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die intrazelluläre Organisation einer Zelle nach Gefrierbruch

Für die elektronenmikroskopische Darstellung lassen sich die beiden Seiten einer Zellmembran durch Gefrierbruch trennen. Wenn eine gefrorene Probe mit Zellen/ Gewebe mit dem Messer eines Mikrotoms gebrochen wird, verläuft der Bruch durch den hydrophoben Innenteil der Membran und trennt die zwei Phospholipidschichten. Wesentlicher Vorteil dieser Methode ist die Flächendarstellung von Membraninnenansichten. Während die konventionelle Dünnschnitttechnik nur Schnittbilder liefert, in denen vorwiegend ein laminarer Schichtenaufbau der Membran sichtbar wird, lässt sich in Gefrierbruchreplikas bei ähnlichem Auflösungsvermögen ein wesentlich differenzierteres Membranbild beobachten.

Die beiden durch den Gefrierbruch freigelegten Plasmamembraninnenansichten tragen nach der Nomenklatur von Branton *et al* (1975) die Bezeichnung PF (protoplasmic face) für die ursprünglich zytoplasmatische Lipidschicht der Membran und EF (exoplasmic face) für die exoplasmatische Lipidschicht der Membran. Die Oberflächen der Plasmamembran werden als ES (external surface) und PS (protoplasmic surface) bezeichnet. Überträgt man die Nomenklatur auf die intrazellulären Membranen, so werden die Membranbruchflächen, die dem Zytoplasma, dem Karyoplasma oder der Mitochondrienmatrix anliegen, als PF bezeichnet. Die Membranbruchflächen, die dem Raum zwischen innerer und äußerer Kern- und Mitochondrienmembran sowie dem Lumen der Organellen anliegen, die mit einer Einheitsmembran ausgestattet sind (Vesikel, ER, Zisternen des Golgi-Apparates), werden als EF bezeichnet (Abb. 10).



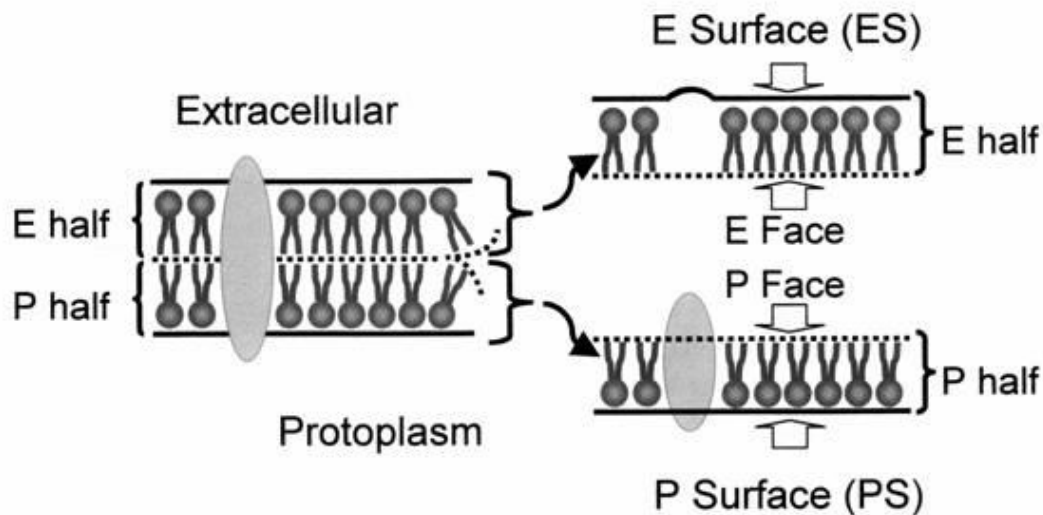


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Verlaufs eines Gefrierbruchs und Nomenklatur der Membranbruchflächen. Der Gefrierbruch spaltet die Phospholipiddoppelschicht in zwei Membraninnenansichten, die die Bezeichnung PF (protoplasmic face) und EF (exoplasmic face) tragen. Die Membranoberflächen werden als ES (external surface) und PS (protoplasmic surface) bezeichnet. (Severs und Shotton, 1995).

Folgt der Gefrierbruch der Plasmamembran einer Zelle, ist keine Einsicht in das Zytoplasma der Zelle möglich. Meistens verläuft der Gefrierbruch jedoch so, dass sowohl Membranflächen der Plasmamembran als auch Zellorganellen in den Replikas vorhanden sind.

Der runde bis elliptische Zellkern weist den charakteristischen Bau mit Doppelmembran, Kernplasma und -poren auf. Der Gefrierbruch kann hier entweder von einer zur anderen Membran springen oder einer Membran folgen. Nach dem Gefrierbruch ergeben sich drei mögliche Ansichten des Zellkerns:

- Verläuft der Bruch quer durch den Kern, entsteht ein Querbruch. Dieser ähnelt weitgehend einem Ultradünnschnitt, im Gegensatz zu diesem ist jedoch der Nukleolus nicht sichtbar, und der gesamte Kerninhalt erscheint im Gefrierbruch homogen.
- Wird der Kern herausgebrochen und bleiben nur die Membranen erhalten, ergibt sich eine konkave Ansicht. Es wird die P-Seite der äußeren und die E-Seite der inneren Kernmembran sichtbar.
- Verläuft der Bruch oberhalb des Kerns, entsteht eine konvexe Ansicht. Es wird die E-Seite der äußeren und die P-Seite der inneren Kernmembran sichtbar.

Die Grundsubstanz des Zytoplasmas erscheint im Gefrierbruch homogen. Einschlüsse, die nicht von einer Membran umgeben sind, sind im Gefrierbruch nicht sichtbar. Die Plasmamembran kann in Gefrierbruchbildern u. a. anhand von

charakteristischen Strukturen wie z.B. interzellulären Kontaktstellen (Gap junctions) identifiziert werden. Ferner sind auf den Membranbruchflächen intramembranöse Partikel (IMP) erkennbar, welche in die Lipiddoppelschicht inkorporierte Proteine darstellen. Die glatten Areale entsprechen einer Lipidschicht.

Da in dieser Arbeit Lipidtropfen und ihre assoziierten Proteine behandelt werden, wird im Folgenden das Augenmerk auf die Darstellung dieser Zellorganellen in Gefrierbrüchen gelegt. Lipidtropfen besitzen keine typische Membran in Form einer Lipiddoppelschicht, so dass die Nomenklatur nach Branton *et al* (1975) bei ihnen nicht angewendet werden kann. Man geht davon aus, dass ihre Oberfläche von der zytoplasmatischen Seite (P-Seite) der Membranen des ER stammt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Membranbrüchen enthalten die Oberflächen der Membranbrüche der Lipidtropfen allerdings in der Regel keine intramembranösen Partikel.

Während konventionelle Dünnschnitte kein Anzeichen für eine Innenstruktur von Lipidtropfen liefern, kann man in Gefrierbruch-Replikas von Lipidtropfen erkennen, dass das Innere dieser Organellen aus einer Vielzahl lamellärer Schichten besteht, die oft konzentrisch wie die Blätter einer Zwiebel angeordnet sind. Es kann hier manchmal schwierig sein, im Gefrierbruch die wirkliche Oberfläche des Lipidtropfens von einer darunter liegenden Schicht zu unterscheiden. Neben zwiebelschalenartig aufgebauten Lipidtropfen existieren Lipidtropfen, die eine amorphe Struktur besitzen. Die Schichten des Lipidtropfens nach Gefrierbruch ähneln denen von Membranbruchflächen, es ergeben sich unterschiedliche Ansichten und Erscheinungen des Lipidtropfens. Diese sind einerseits auf die Art und Weise des Bruches durch den Lipidtropfen zurückzuführen, andererseits aber auch auf die strukturelle Heterogenität innerhalb und unter den Lipidtropfen. Der Gefrierbruch spaltet die hydrophoben Schichten des Lipidtropfens ähnlich der Plasmamembran auf unterschiedlicher Höhe. Je nach Art des Bruches durch den Lipidtropfen entsteht eine der folgenden Ansichten des Lipidtropfens:

- konvex
- konkav
- quergebroschen.

### 3.2 Die Natrium Dodecyl Sulfat-Gefrierbruch-Immunzytochemie

Grundsätzlich ist die Feinstruktur der Membranbruchflächen in den Replikas nach der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie dieselbe wie die nach herkömmlicher Gefrierbruchmethode. Unterschiede ergeben sich dadurch, dass die Replikas bei der herkömmlichen Gefrierbruchtechnik mit Chlorbleiche, bei der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie dagegen mit SDS gereinigt werden. Erstere sollten frei von organischem Material sein, während bei der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie die Membranbruchflächen am Präparat haften bleiben sollten. Weiterhin werden bei der herkömmlichen Gefrierbruchtechnik die Zellen vor dem Gefrierbruch mit Karnovsky's Reagenz fixiert, wodurch Fette aus den Zellorganellen herausgelöst werden und später im elektronenmikroskopischen Bild nicht mehr sichtbar sind. Bei der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie findet dagegen keine Fixation statt.

Die Position des zu untersuchenden Proteins ist ebenso wie die Art des Bruchverlaufs durch dieses Protein entscheidend für eine erfolgreiche Immunmarkierung: Proteine, die sich nach dem Gefrierbruch auf der inneren Bruchfläche (PF) der Membran befinden, werden mit Antikörpern markiert, die gegen die zytoplasmatische Domäne gerichtet sind. Um Proteine auf der äußeren Bruchfläche (EF) der Membran darzustellen, werden Antikörper eingesetzt, die gegen die extrazelluläre Domäne des Proteins gerichtet sind.

Durch die Anwendung sekundärer goldmarkierter Antikörper erscheinen die so markierten Proteine in elektronenmikroskopischen Bildern als Punkte.

Bei Perilipin und Adipophilin handelt es sich um Proteine, die bisher nur auf der Oberfläche von Lipidtropfen gefunden wurden. Die Oberfläche von Lipidtropfen entspricht nicht der typischen Lipiddoppelschicht, sondern ist ein Monolayer, welcher von der zytoplasmatischen Seite (P-Seite) der Membranen des ER stammt.

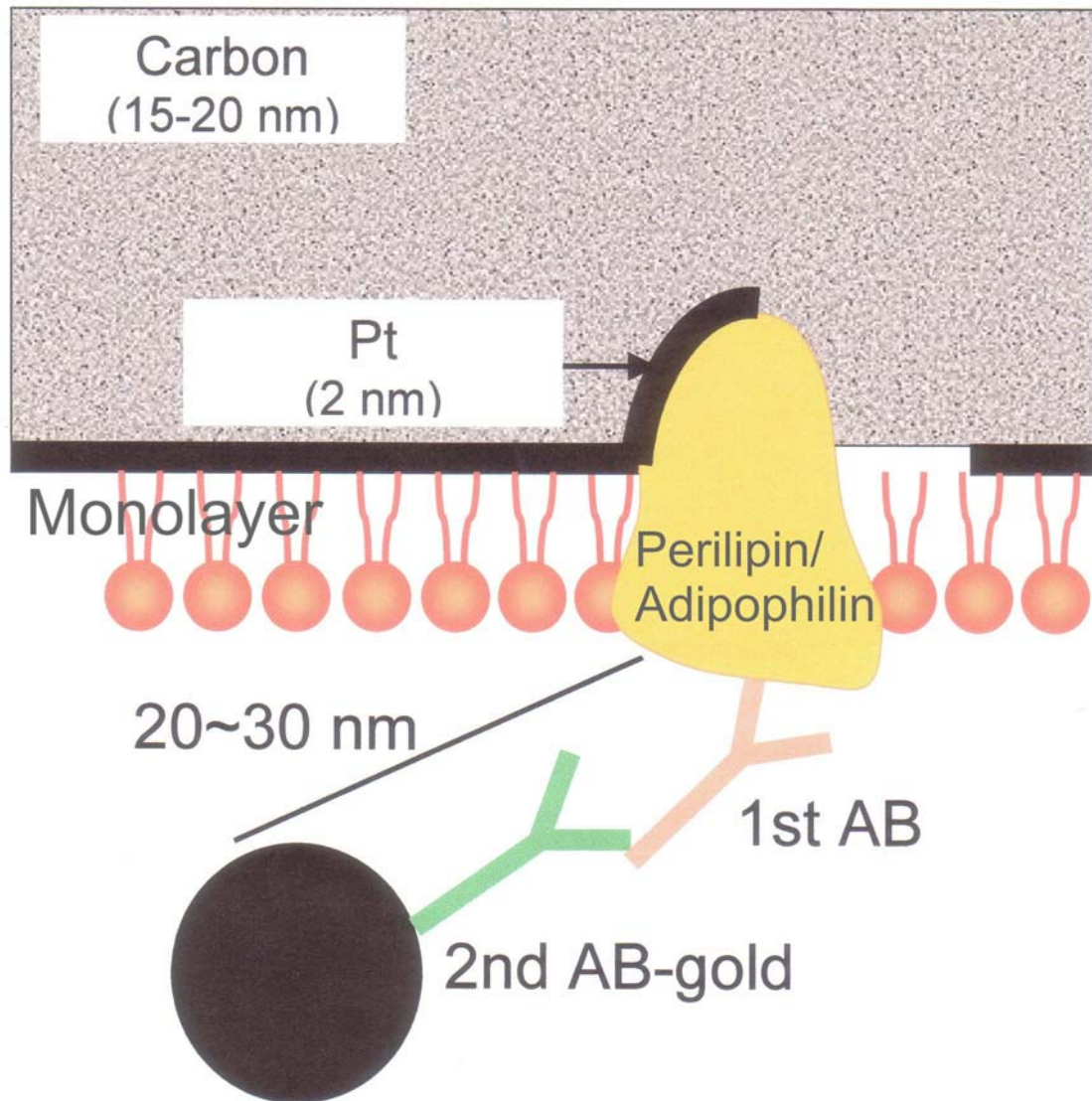


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines immungoldmarkierten Replikas. Perilipin und Adipophilin sind in der Oberfläche (Monolayer) des Lipidtropfens lokalisiert. Der Monolayer ist an das Platin (Pt)/ Kohle (Carbon) Replika gebunden. Durch die indirekte Immungoldmarkierung liegen die Goldpartikel ca. 20-30 nm vom Perilipin und Adipophilin entfernt. (Verändert nach Fujimoto, 1997).

### 3.3 Verteilung von Perilipin und Adipophilin in Lipidtropfen

#### 3.3.1 Der Lipidtropfen

Konventionelle Dünnschnitte von Lipidtropfen geben keinen Anhalt für eine Innenstruktur von Lipidtropfen (Abb. 12). Gefrierbruchreplikas von Lipidtropfen führen zu einer Vielzahl ganz unterschiedlicher Erscheinungen von Lipidtropfen. Dies ist – wie wir bereits unter 3.1 berichtet haben - einerseits abhängig von der Art des Gefrierbruches durch den Lipidtropfen, andererseits aber auch auf die strukturelle Heterogenität innerhalb und unter den Lipidtropfen zurückzuführen. Mit der Gefrierbruchmethode kann gezeigt werden, dass das Innere von Lipidtropfen aus einer Vielzahl lamellärer Schichten besteht, die oft konzentrisch ähnlich den Blättern einer Zwiebel angeordnet sind (Abb. 13, 16, 17).

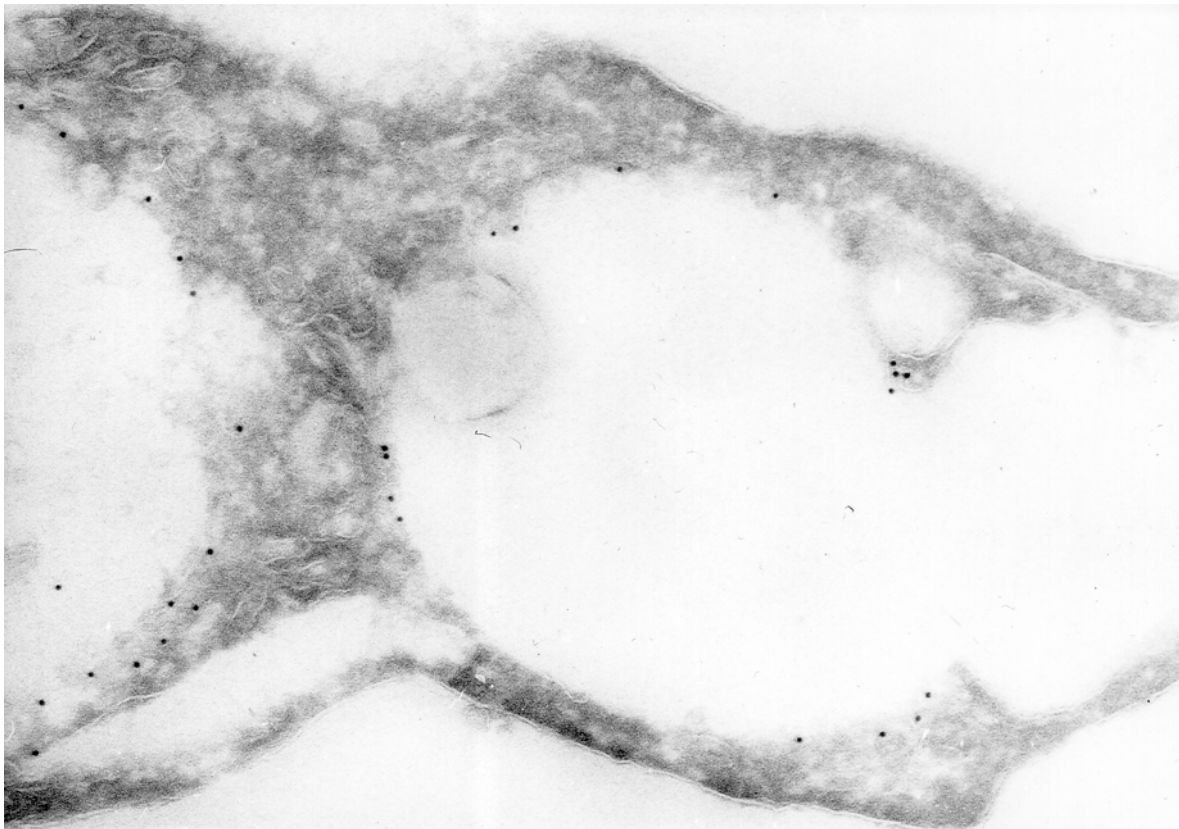


Abbildung 12: Kryoultradünnschnitt von Lipidtropfen in THP-1 Zellen. Eine Innenstruktur von Lipidtropfen ist nicht erkennbar. Zu sehen sind Goldpartikel nach Immunmarkierung von Adipophilin. Vergrößerung: x 37000.

### 3.3.2 Perilipin in Adipozyten

Nach Immungoldmarkierung erscheint das so markierte Perilipin in den Gefrierbruchreplikas als Punkte. Der benutzte Antikörper ist äußerst spezifisch, so dass der Background vernachlässigbar gering ist. Sowohl in konvex und konkav gebrochenen Lipidtropfen als auch in quer gebrochenen Lipidtropfen werden Markierungen für Perilipin gefunden. Daraus kann geschlossen werden, dass in den untersuchten 3T3-L1 Adipozyten Perilipin nicht nur in der Oberfläche des Lipidtropfens, sondern auch in seinem Kern vorkommt.

#### 3.3.2.1 Perilipin in unbehandelten Adipozyten

Goldpartikel nach Immunmarkierung von Perilipin werden sowohl in der Lipidtropfenoberfläche als auch in seinem Kern gefunden. Bezüglich Anzahl und Verteilungsmuster werden hier Unterschiede deutlich.

Zahlenmäßig überwiegen bei weitem die Goldmarkierungen in der Lipidtropfenoberfläche gegenüber denen im Kern.

In der Oberfläche der Lipidtropfen sind konsequent in allen untersuchten Zellen zahlreiche Markierungen zu finden, welche netzartig über die gesamte Hülle ausgebreitet sind. Die Markierungen sind hierbei

- mehr oder weniger gleichmäßig verteilt
- in Gruppen und Reihen angeordnet oder einzeln verstreut liegend.

Eine Konzentration oder ein völliges Fehlen in bestimmten Arealen der Lipidtropfenoberfläche kann nicht gezeigt werden.

Der größte Teil der Zellen zeigt auch im Lipidtropfenkern Markierungen für Perilipin. Diese sind deutlich weniger zahlreich als in der Lipidtropfenoberfläche. Daneben existieren Zellen, die vernachlässigbar geringe oder gar keine Markierungen aufweisen. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass jedes Gefrierbruchbild nur eine kleine Fraktion des gesamten Lipidtropfens darstellt.

Ein netzartiges Verteilungsmuster wie in der Lipidtropfenoberfläche ist im Kern nicht zu finden. Hier kommen die Immungoldmarkierungen einzeln verstreut oder in Gruppen liegend vor.

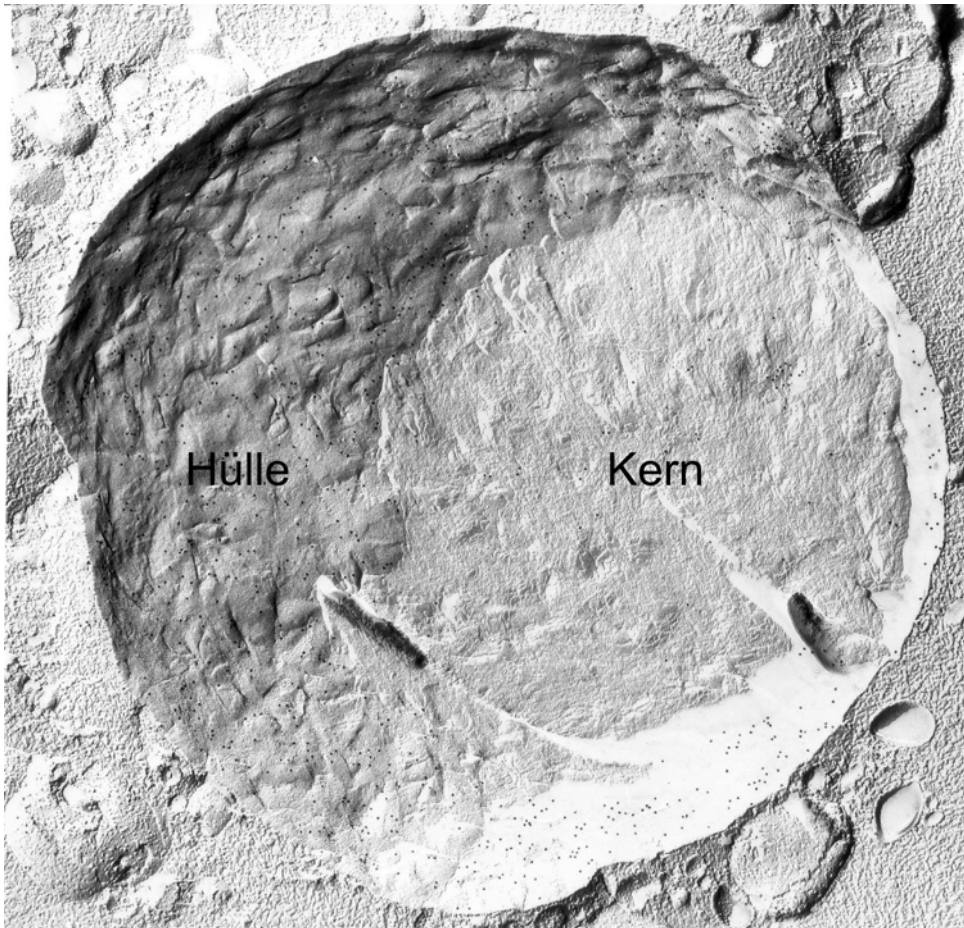


Abbildung 13: Gefrierbruch-Replika eines Lipidtropfens in einem unbehandelten Adipozyten. Goldpartikel nach Immunmarkierung von Perilipin sind in unterschiedlicher Anzahl sowohl im Kern als auch in der Oberfläche (Hülle) des Lipidtropfens zu finden. Vergrößerung: x 40500.

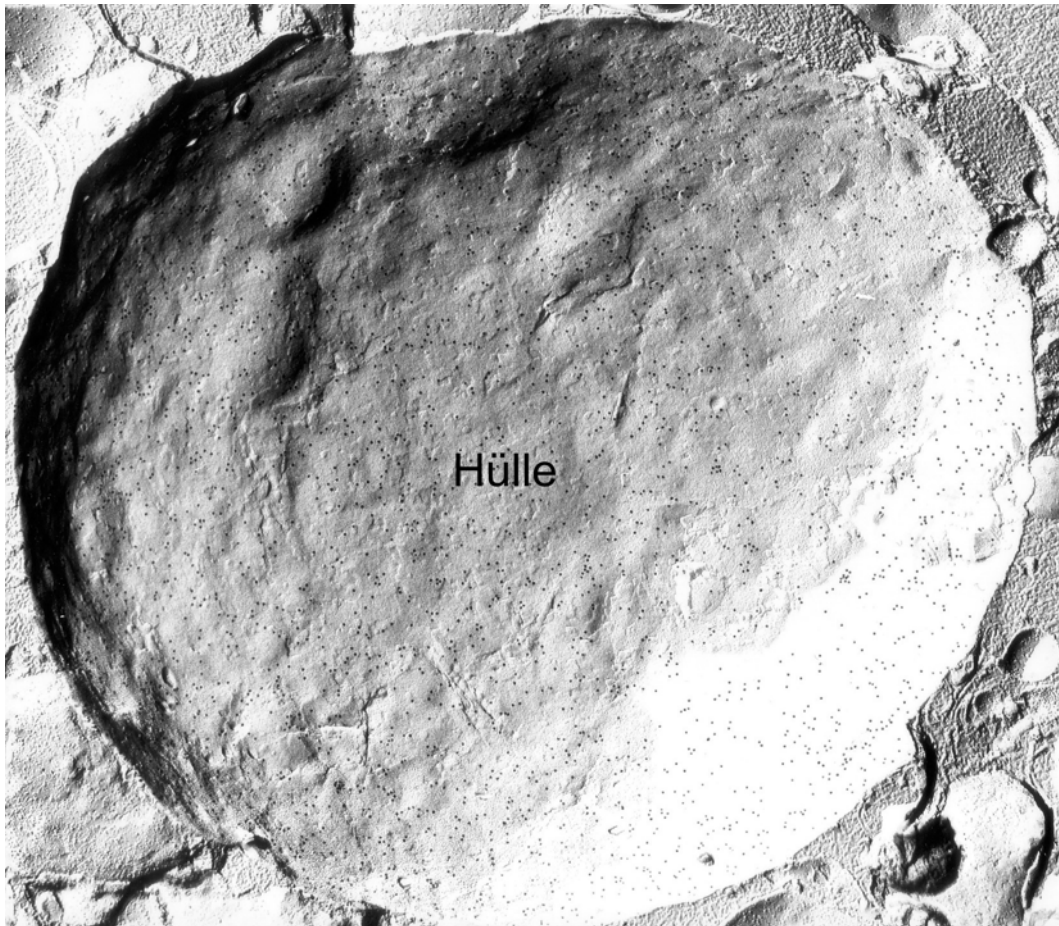


Abbildung 14: Gefrierbruch-Replikas eines Lipidtropfens in einem unbehandelten Adipozyten und Immunmarkierung von Perilipin. Die Goldpartikel sind netzartig über die Oberfläche (Hülle) des Lipidtropfens verteilt. Vergrößerung: x 37000.

Die quantitative Analyse hat ergeben, dass in der Oberfläche der Lipidtropfen  $224,92 \pm 10,32$  Goldpartikel/ $1 \mu\text{m}^2$  und im Kern  $8,89 \pm 3,65$  Goldpartikel/ $1 \mu\text{m}^2$  als immunzytochemischer Nachweis für Perilipin vorhanden sind. Somit wird unser Eindruck, dass die Markierungen in der Lipidtropfenoberfläche überwiegen, bestätigt.



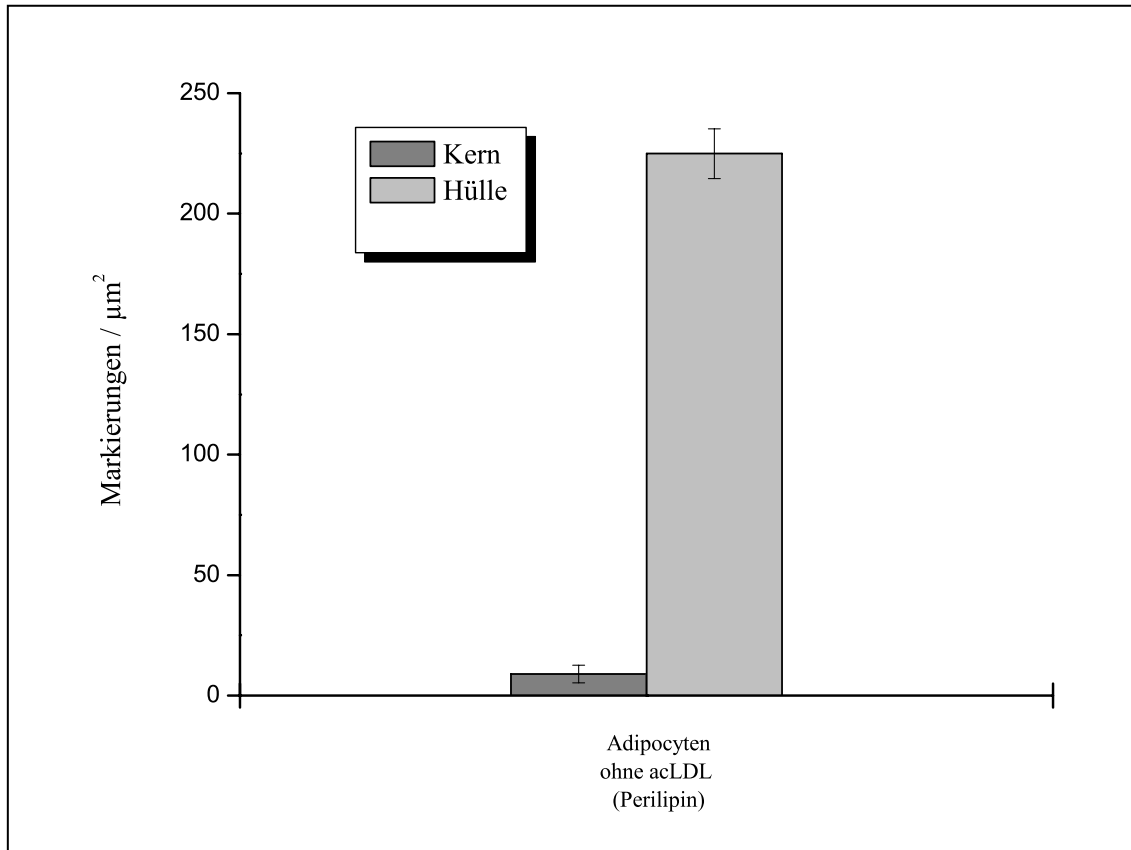


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Anzahl der Goldpartikel pro  $1 \mu\text{m}^2$  als immunzytochemischer Nachweis für Perilipin in Lipidtropfen von unbehandelten Adipozyten.

### 3.3.2.2 Perilipin in Adipozyten nach Zugabe von AcLDL

In den mit AcLDL behandelten Adipozyten sind ebenfalls Markierungen für Perilipin in der Lipidtropfenoberfläche und im Kern zu finden. Anzahl und Verteilungsmuster entsprechen dem unter 3.3.1.1 genannten.

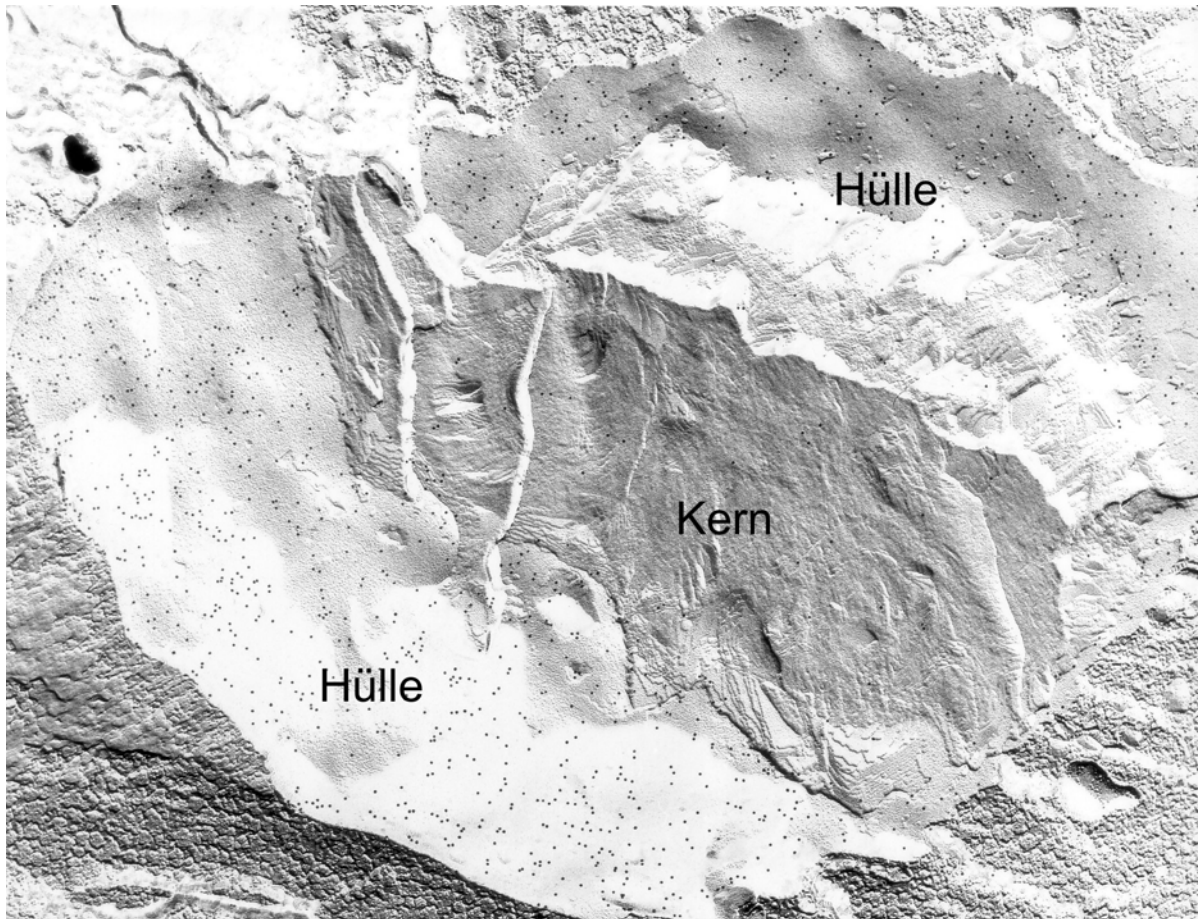


Abbildung 16: Gefrierbruch-Replika eines Lipidtropfens in einem mit AcLDL behandelten Adipozyten. Goldpartikel nach Immunmarkierung von Perilipin sind in unterschiedlicher Anzahl sowohl im Kern als auch in der Oberfläche (Hülle) des Lipidtropfens zu finden. Vergrößerung: x 39000.

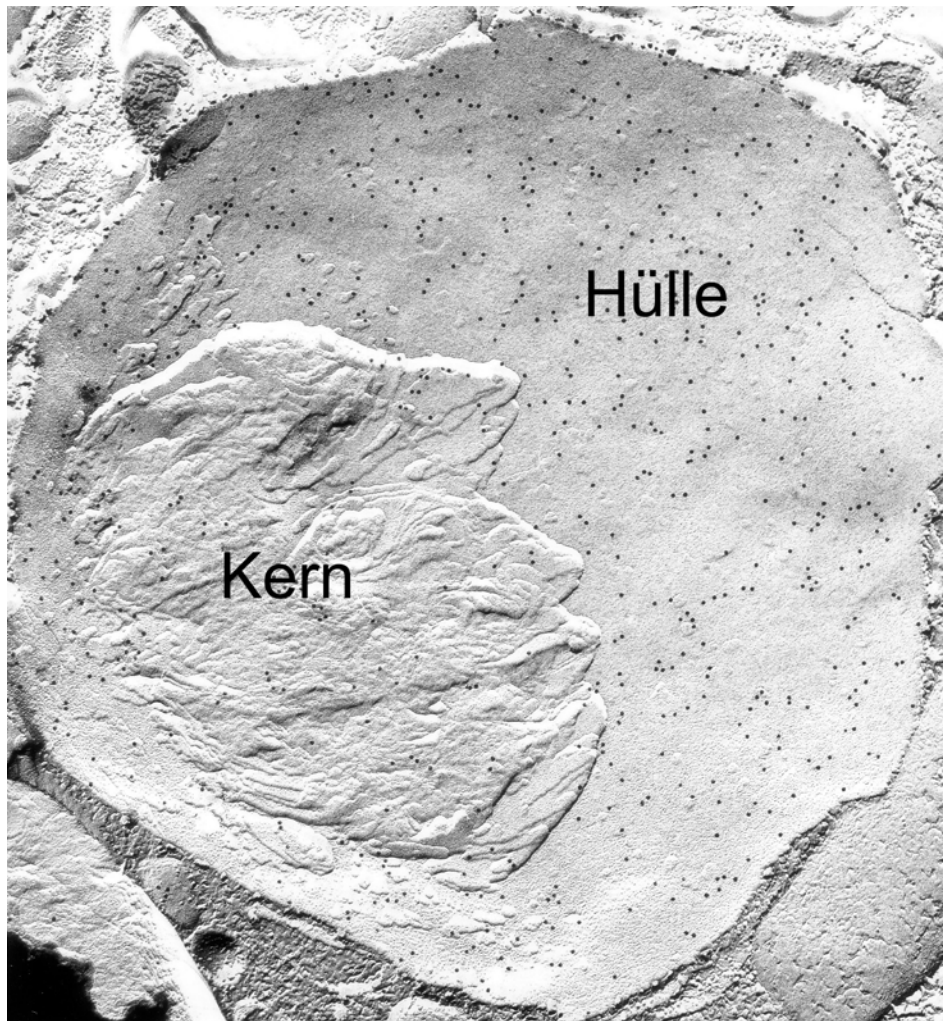


Abbildung 17: Gefrierbruch-Replika eines Lipidtropfens in einem mit AcLDL behandelten Adipozyten und Immunmarkierung von Perilipin. Zu erkennen ist eine netzartige Verteilung der Goldpartikel in der Oberfläche (Hülle) des Lipidtropfens. Der Lipidtropfenkern weist eine deutlich geringere Immungoldmarkierung auf. Vergrößerung: x 57500.

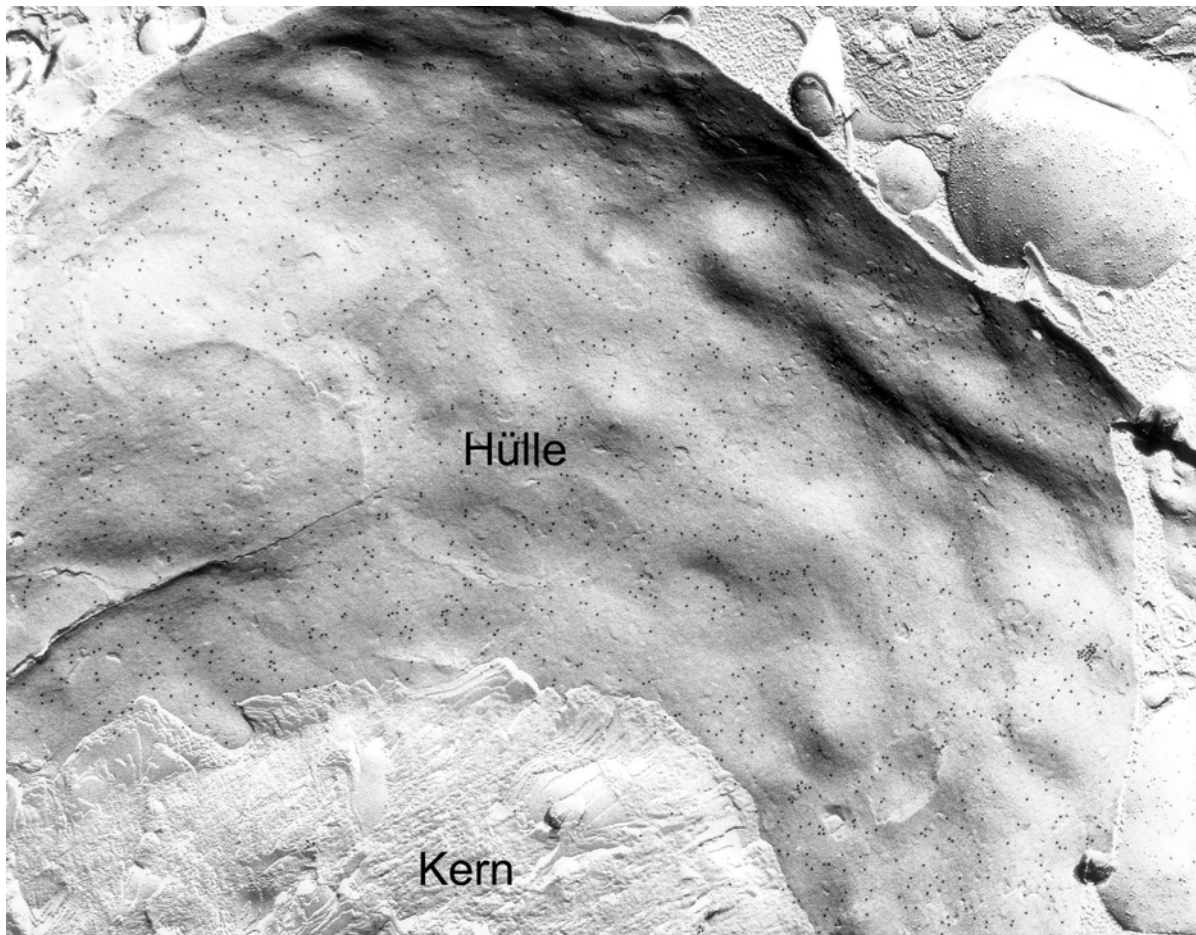


Abbildung 18: Gefrierbruch-Replika eines Lipidtropfens in einem mit AcLDL behandelten Adipozyten und Immunmarkierung von Perilipin. Zu erkennen ist eine netzartige Verteilung der Goldpartikel in der Oberfläche (Hülle) des Lipidtropfens. Der Lipidtropfenkern weist eine deutlich geringere Immungoldmarkierung auf. Vergrößerung: x 37000.

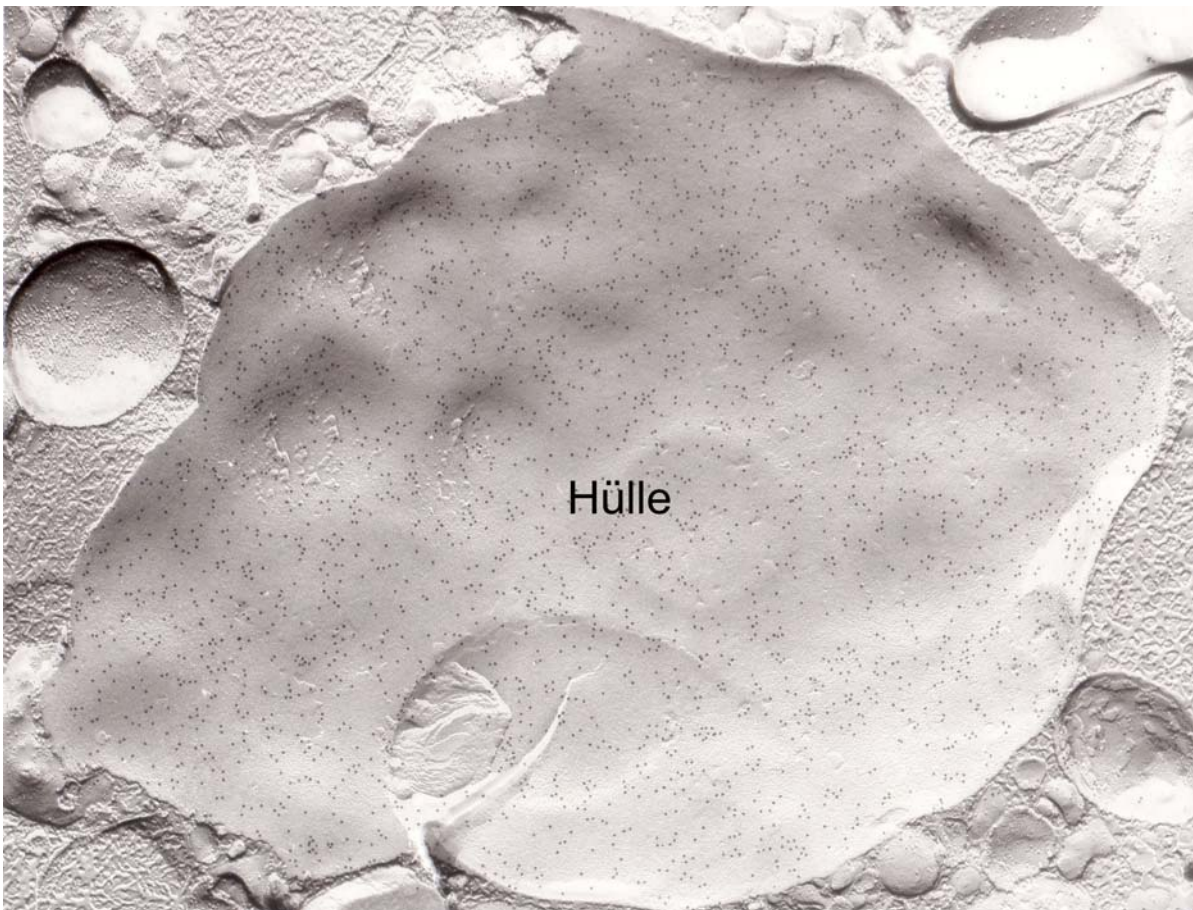


Abbildung 19: Gefrierbruch-Replika eines Lipidtropfens in einem mit AcLDL behandelten Adipozyten. Die Goldpartikel nach Immunmarkierung von Perilipin sind netzartig über die gesamte Oberfläche (Hülle) des Lipidtropfens verteilt. Ein kleiner Abschnitt des Kerns zeigt geringe Markierung für Perilipin. Vergrößerung: x 40500.

Die quantitative Analyse hat  $19.37 \pm 9.52$  Goldmarkierungen/ $1 \mu\text{m}^2$  im Kern und  $177.78 \pm 4.29$  Goldmarkierungen/ $1 \mu\text{m}^2$  in der Oberfläche der mit AcLDL behandelten Adipozyten ergeben. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen von unbehandelten Adipozyten, so ist die Anzahl der Goldpartikel im Kern bei mit AcLDL behandelten Adipozyten mit  $19.37 \pm 9.52/1 \mu\text{m}^2$  mehr als doppelt so hoch wie bei unbehandelten Adipozyten mit  $8.89 \pm 3.65/1 \mu\text{m}^2$ . Dagegen ist die Anzahl der Goldpartikel in der Oberfläche bei den unbehandelten Adipozyten mit  $224.92 \pm 10.32/1 \mu\text{m}^2$  höher als bei mit AcLDL behandelten Zellen mit  $177.78 \pm 4.29/1 \mu\text{m}^2$ .

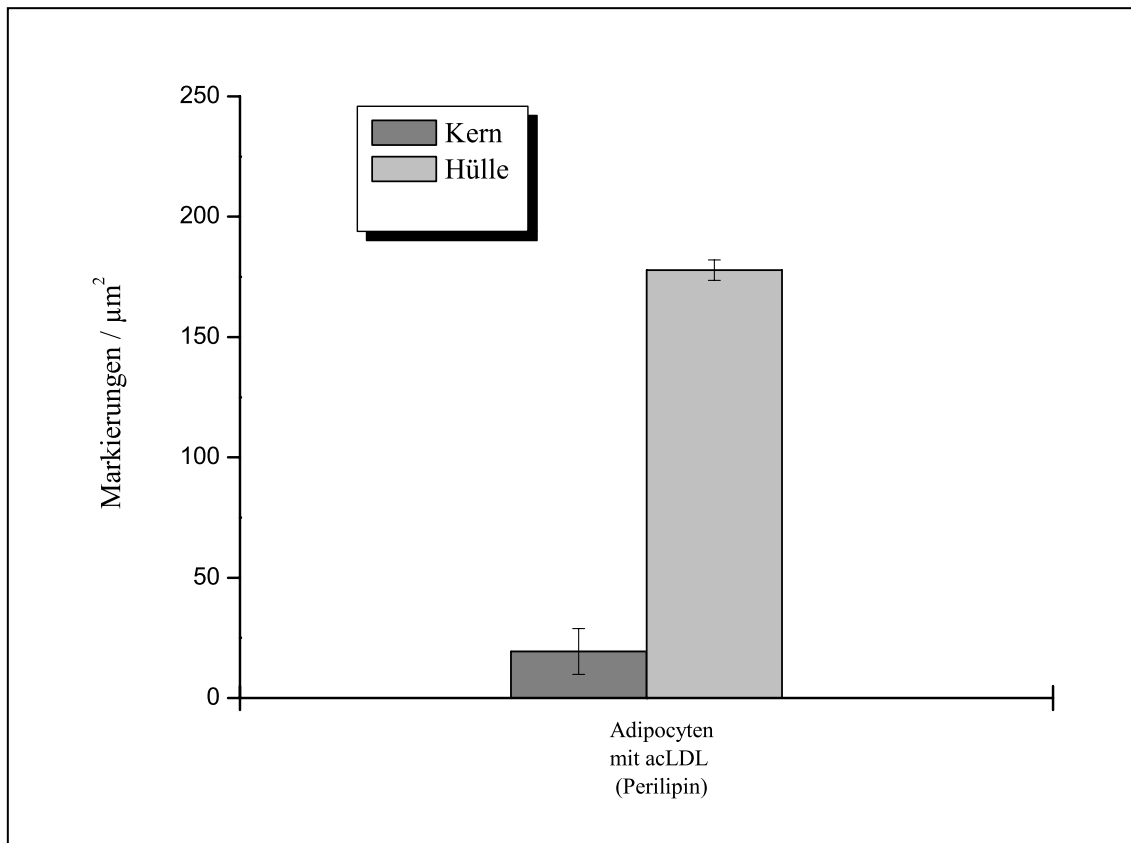


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Anzahl der Goldpartikel pro  $1 \mu\text{m}^2$  als immunzytochemischer Nachweis für Perilipin in Lipidtropfen von Adipozyten nach Zugabe von acLDL.

### 3.3.2.3 Perilipin in Adipozyten nach Zugabe von Brefeldin A

Brefeldin A ist eine kleine hydrophobe Verbindung, die von dem Pilz *Penicillium brefeldianum* produziert wird. Brefeldin A hat eine dramatische Wirkung auf die Morphologie des Golgi-Apparates (Misumi *et al.*, 1986; Lippincott-Schwartz *et al.*, 1991; Orci *et al.*, 1991; Pavelka und Ellinger, 1993). Nach Behandlung der Säugerzellen mit Brefeldin A zerfällt der Golgi-Apparat innerhalb weniger Sekunden in viele kleine Vesikel, die mit dem ER verschmelzen. Mit diesen morphologischen Veränderungen geht einher, dass der Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat blockiert ist (Fujiwara *et al.*, 1988; Doms *et al.*, 1989; Chege und Pfeffer, 1990; Alcade *et al.*, 1992; Strous *et al.*, 1993; Chardin und McCormick, 1999). Diese Eigenschaften machen Brefeldin A zu einem effizienten Inhibitor der Sekretion, und es hat daher für die Untersuchung der Sekretionsvorgänge in der Zelle große Bedeutung erlangt.

Ziel dieses Experimentes war es, Perilipin in den untersuchten 3T3-L1-Adipozyten anzureichern.

Gemäß unseren Erwartungen lassen sich intensive Immungoldmarkierungen sowohl in der Lipidtropfenoberfläche als auch im Lipidtropfenkern beobachten. Die Anzahl der Goldmarkierungen übersteigt deutlich die in mit AcLDL behandelten und in unbehandelten Adipozyten. Deutliche Unterschiede zwischen den mit Brefeldin A behandelten Zellen einerseits und den unbehandelten und mit AcLDL behandelten Zellen lassen sich im Lipidtropfenkern beobachten: Hier kommt es zu einer dramatischen Zunahme der Immungoldmarkierungen, welche netzartig verteilt sind.



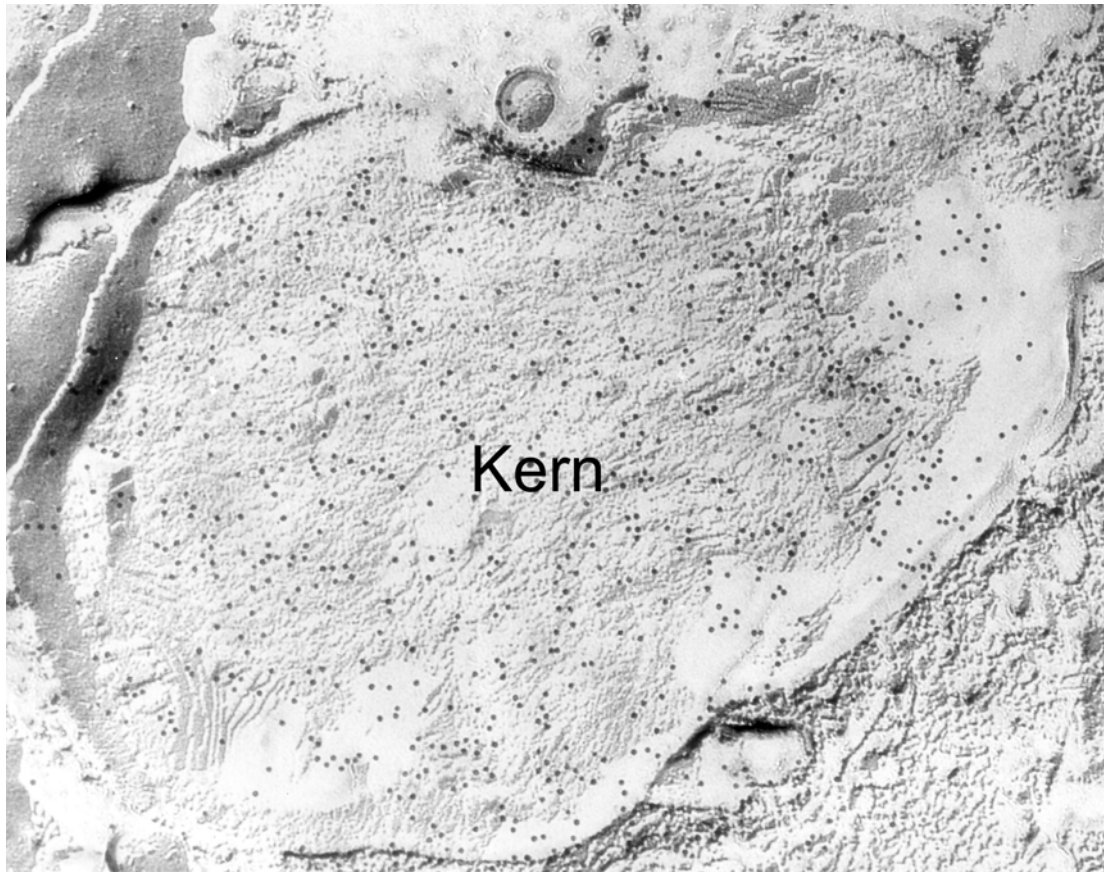


Abbildung 21: Gefrierbruch-Replika eines Lipidtropfens in einem mit Brefeldin A behandelten Adipozyten. Goldpartikel nach Immunmarkierung von Perilipin sind in großer Anzahl im Kern zu finden. Vergrößerung: x 78000.



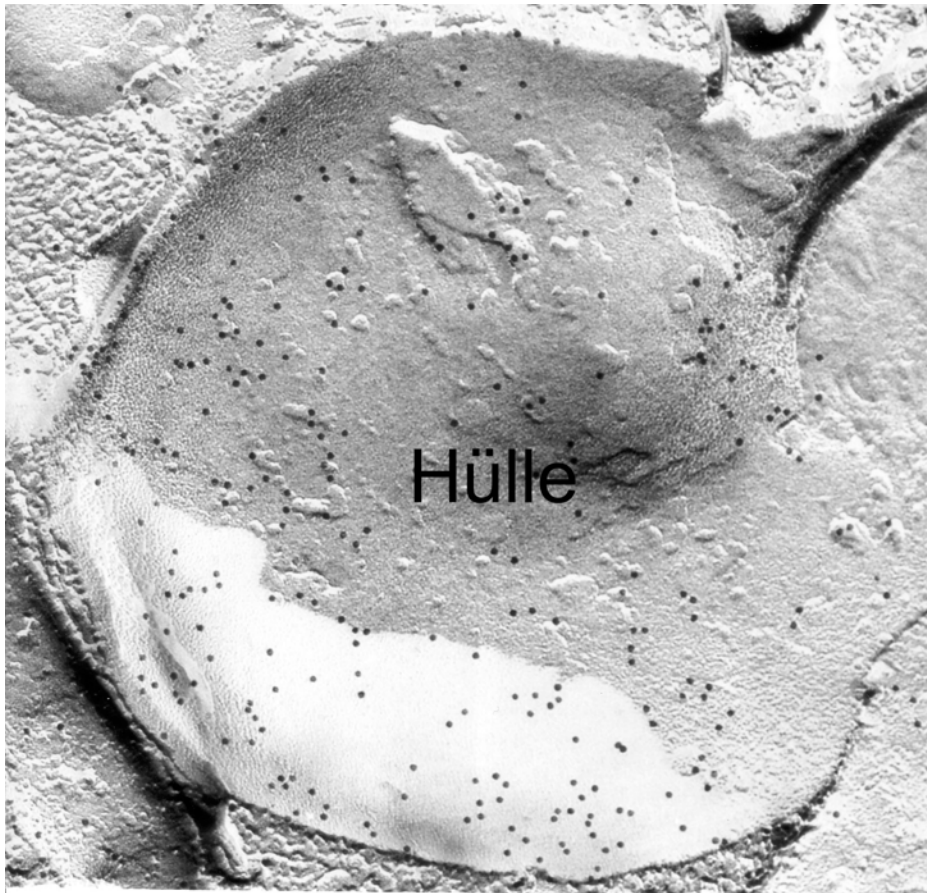


Abbildung 22: Gefrierbruch-Replika eines Lipidtropfens in einem mit Brefeldin A behandelten Adipozyten. Goldpartikel nach Immungoldmarkierung von Perilipin sind netzartig in der Oberfläche (Hülle) des Lipidtropfens verteilt. Vergrößerung: x 96500.

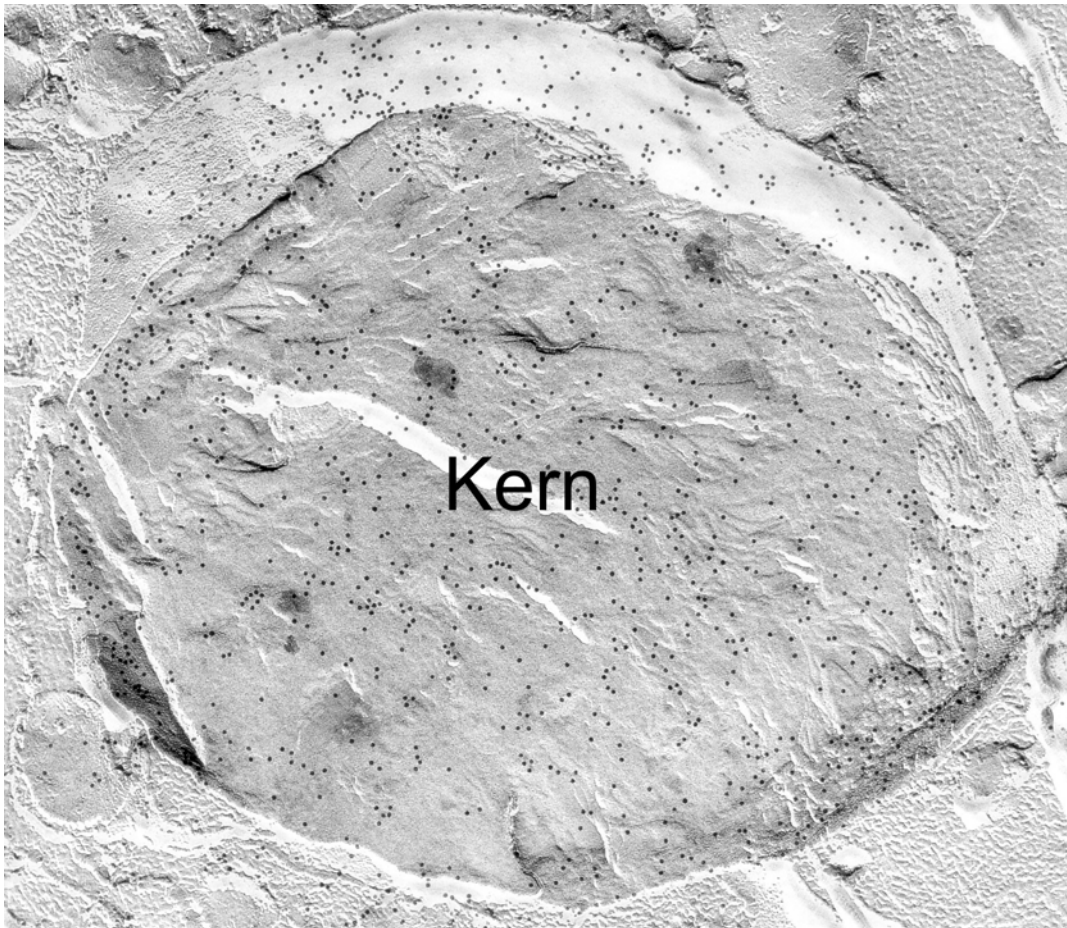


Abbildung 23: Gefrierbruch-Replika eines Lipidtropfens in einem mit Brefeldin A behandelten Adipozyten und Immunmarkierung von Perilipin. Auffällig ist die große Anzahl und netzartige Verteilung der Goldpartikel im Lipidtropfenkern. Vergrößerung: x 61000.

Die quantitative Analyse hat  $167.30 \pm 10$  Goldmarkierungen/ $1 \mu\text{m}^2$  im Kern und  $297.46 \pm 20.32$  Goldmarkierungen/ $1 \mu\text{m}^2$  in der Oberfläche von Lipidtropfen als immunzytochemischer Nachweis für Perilipin ergeben. Verglichen mit unbehandelten Adipozyten und mit AcLDL behandelten Adipozyten ist in mit Brefeldin A behandelten Adipozyten die Anzahl der Goldmarkierungen im Kern demnach um ein Mehrfaches höher und auch in der Oberfläche deutlich höher.

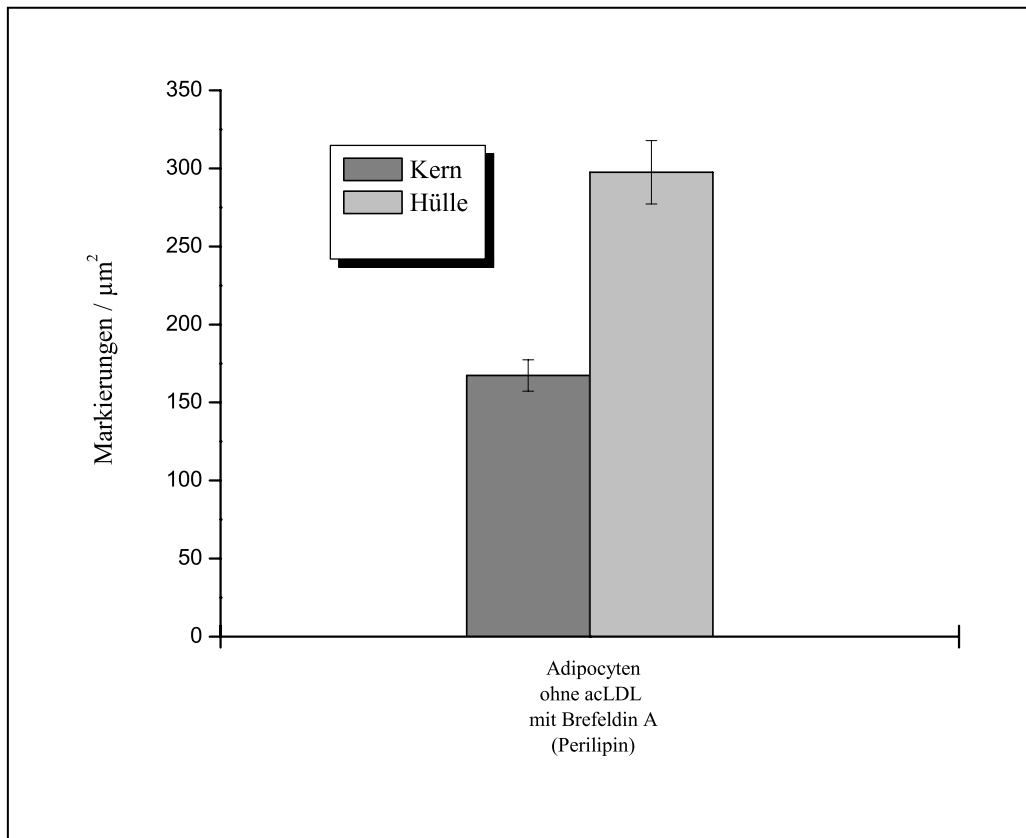


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Anzahl der Goldpartikel pro  $1 \mu\text{m}^2$  als immunzytochemischer Nachweis für Perilipin in Adipozyten nach Zugabe von Brefeldin A.

### 3.3.3 Adipophilin in Makrophagen

Durch die Anwendung sekundärer goldmarkierter Antikörper gegen Adipophilin erscheint das so markierte Adipophilin in den Gefrierbruchreplikas als Punkte. Die benutzten Antikörper sind äußerst spezifisch, so dass der Background vernachlässigbar gering ist.

In Lipidtropfenpopulationen der untersuchten THP-1 Zellen werden Immungoldmarkierungen für Adipophilin nachgewiesen. Es finden sich sowohl Markierungen in der Lipidtropfenoberfläche als auch im Lipidtropfenkern.

In der Lipidtropfenoberfläche finden sich deutliche Immungoldmarkierungen, welche netzartig verstreut sind.

In den Lipidtropfenkernen sind die Goldpartikel sehr unregelmäßig verteilt: Einige Kerne weisen eine deutliche Markierung für Adipophilin auf. In anderen Kernen ist die Markierung für Adipophilin jedoch vernachlässigbar gering oder sie sind sogar vollständig unmarkiert. Die Goldpartikel liegen zum Teil in Gruppen zusammen oder finden sich einzeln verstreut im Lipidtropfenkern. Daneben existieren Lipidtropfen, in

denen sich die Markierungen in Arealen des Kernes konzentrieren, während andere Kernbereiche vollkommen frei sind.

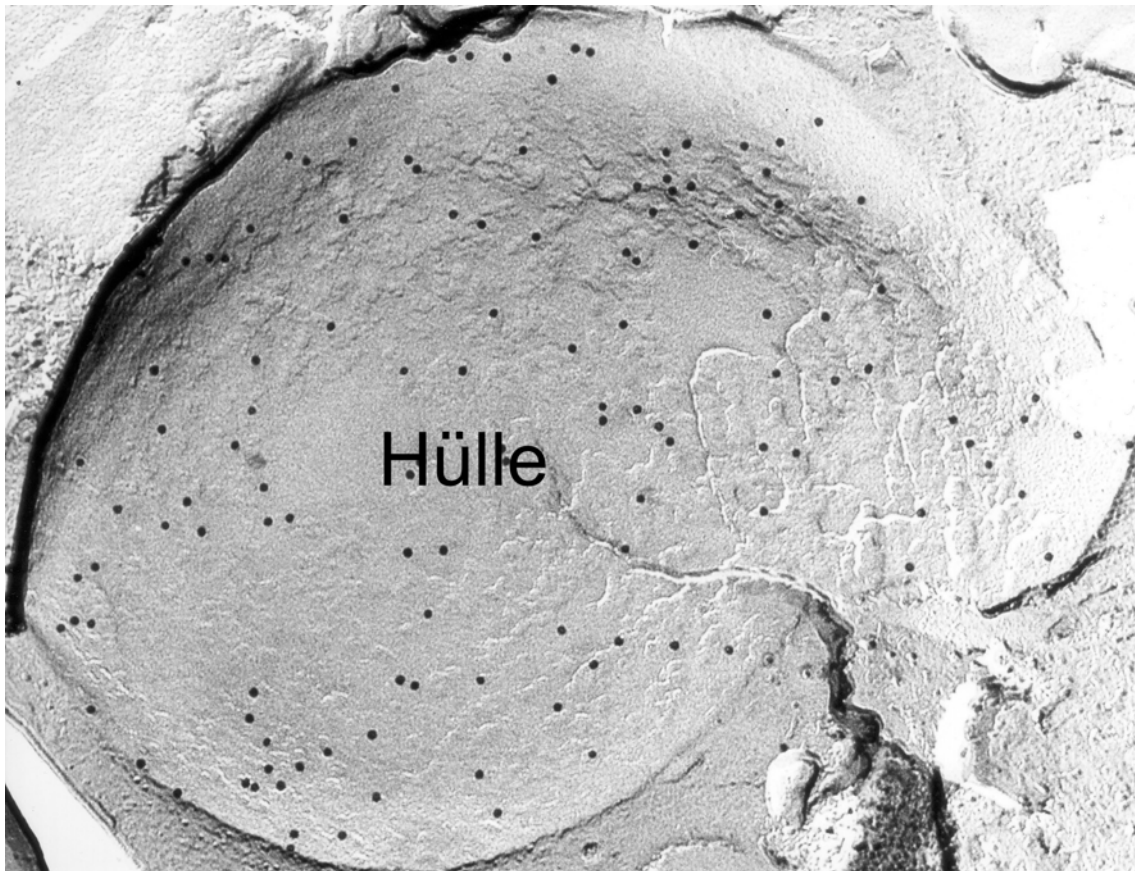


Abbildung 25: Gefrierbruch-Replika eines Lipidtropfens in einer THP-1 Zelle. Über die gesamte Oberfläche (Hülle) verteilt sind Goldpartikel nach Immunmarkierung von Adipophilin. Vergrößerung: x 110000.

Die Abbildungen zeigen bereits, dass die Anzahl der Goldpartikel nach Immunmarkierung von Adipophilin in der Oberfläche höher ist als im Kern. Dieser Eindruck wird durch die quantitative Analyse bestätigt: Diese hat ergeben, dass in der Oberfläche  $136.19 \pm 14.29$  Goldpartikel/  $1 \mu\text{m}^2$  und im Kern  $50 \pm 3.97$  Goldpartikel/  $1 \mu\text{m}^2$  als immunzytochemischer Nachweis für Adipophilin vorhanden sind.

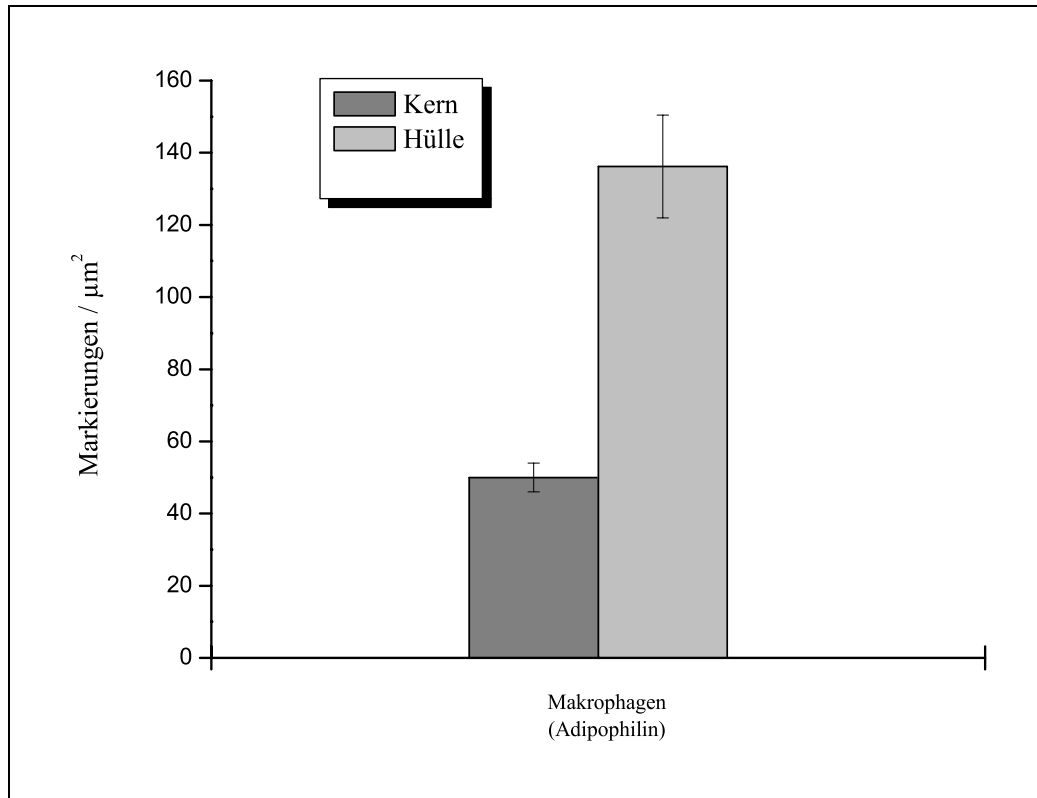


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Anzahl der Goldpartikel pro 1 µm² als immunzytochemischer Nachweis für Adipophilin in Makrophagen.

### 3.4 Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse

Das folgende Schema (Abb. 27) fasst die quantitativen Ergebnisse zur Verteilung des Perilipin in 1. unbehandelten Adipozyten, 2. mit AcLDL behandelten Adipozyten und 3. mit Brefeldin A behandelten Adipozyten zusammen.

Bei der Ordnung der Anzahl der Goldpartikel/1  $\mu\text{m}^2$  als immunzytochemischer Nachweis für Perilipin lassen sich folgende Gesetzmäßigkeiten erkennen: Es finden sich sowohl Goldpartikel in der Lipidtropfenoberfläche der Adipozyten als auch in Lipidtropfenkernen. Insgesamt sind die Goldpartikel in der Oberfläche deutlich zahlreicher als im Kern. Die meisten Goldpartikel pro 1  $\mu\text{m}^2$  sind in den mit Brefeldin A behandelten Adipozyten (167.30  $\pm$  10 im Kern, 297.46  $\pm$  20.32 in der Oberfläche) zu finden. Vor allem die Anzahl der Goldpartikel im Kern ist hier um ein Mehrfaches höher als bei unbehandelten (8.89  $\pm$  3.65) und mit AcLDL behandelten (19.37  $\pm$  9.52) Adipozyten. Unbehandelte Adipozyten zeigen mit 8.89  $\pm$  3.65 im Kern weniger Goldmarkierungen pro 1  $\mu\text{m}^2$  als die mit AcLDL behandelten Zellen (19.37  $\pm$  9.52), in der Oberfläche besitzen sie mit 224.92  $\pm$  10.32 jedoch mehr Goldpartikel pro 1  $\mu\text{m}^2$  als mit AcLDL behandelte Zellen (177.78  $\pm$  4.29).

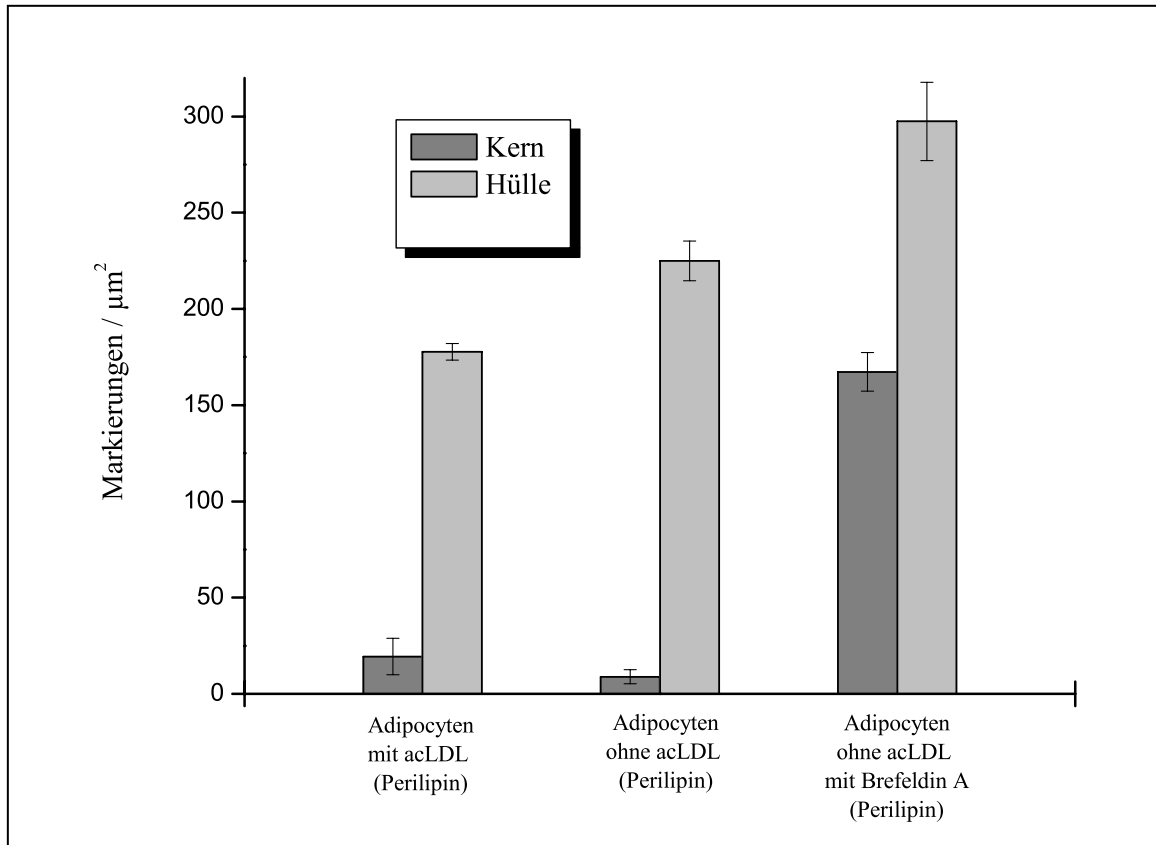


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Anzahl der Goldpartikel pro 1  $\mu\text{m}^2$  als immunzytochemischer Nachweis für Perilipin in Lipidtropfen von Adipozyten ohne Zugabe von acLDL, nach Zugabe von acLDL und nach Zugabe von Brefeldin A.

Die Ordnung der Anzahl der Goldpartikel/1  $\mu\text{m}^2$  als immunzytochemischer Nachweis für Adipophilin lässt erkennen, dass diese sowohl in der Oberfläche der Lipidtropfen als auch im Lipidtropfenkern vorkommen. In der Oberfläche ist die Anzahl der Goldpartikel/1  $\mu\text{m}^2$  mit  $136.19 \pm 14.29$  mehr als doppelt so hoch wie im Kern ( $50 \pm 3.97$ ).

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Gefrierbruch-Immunzytochemie: Methodische Aspekte

Nahezu alle Organismen, einschließlich Hefen, Pflanzen und Tieren sowie einige Prokaryonten, können neutrale Lipide in intrazellulären Lipidtropfen verpacken. Lipidtropfen sind dynamische subzelluläre Strukturen, die für die Membran-Biosynthese, die Cholesterin-Homöostase, den Cholesterin-Metabolismus, den Lipidtransport und die Energiebalance erforderlich sind. Sie sind zusammengesetzt aus einem Kern aus neutralen Lipiden (Triacylglycerin, Diacylglycerin und Sterol-Ester), umgeben von einem Monolayer aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und spezifischen Populationen von Proteinen, die als notwendig für Gestaltung und Funktion der Lipidtropfen erachtet werden.

Seitdem mehrere Lipidtropfen-assoziierte Proteine identifiziert werden konnten, sind Lipidtropfen und ihre Proteine Mittelpunkt intensiver Forschungen geworden. Es wird daher immer wichtiger, angemessene Methoden zur Untersuchung dieser Organellen und ihrer zugehöriger Proteine zu entwickeln.

Die konventionelle Lichtmikroskopie stellt eine klassische Methode der morphologischen Charakterisierung von Zellen dar und ist seit Jahrzehnten Grundlage einer pathologisch-anatomischen Beurteilung. Obwohl Lipidtropfen durch Lichtmikroskopie leicht sichtbar sind, wurden nur wenige standardisierte mikroskopische Methoden entwickelt. Der Grund hierfür dürfte sein, dass diese Technik auf eine zweidimensionale Analyse begrenzt ist und kaum Aussagen funktioneller Natur zulässt. Diese werden heutzutage hauptsächlich mit biochemischen oder molekularbiologischen Methoden erbracht. Solche Analysen erfordern meist eine vollständige Homogenisierung des Zellmaterials, wobei die Verbindung von Funktion und Struktur weitgehend verloren geht und Aussagen zur Funktion innerhalb zellulärer Kompartimente oder an bestimmten Strukturen nur sehr eingeschränkt möglich sind.

In den letzten Jahren fanden neben der Postembedding-Immunzytochemie an Kryoultradünnschnitten immunfluoreszenzmikroskopische Methoden ihre Anwendung in Studien zur Lokalisation von Proteinen in Zellen, so dass sich hier rasch eine Reihe standardisierter Methoden entwickelte. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen erfordern eine spezifische Färbung von Lipidtropfen. Hier wurden bisher Nile Rot (Greenspan *et al.*, 1985), Sudan III (Aoki *et al.*, 1997) und Öl Rot O (Koopman *et al.*, 2001) eingesetzt, die jedoch alle mit Nachteilen behaftet sind.



Nile Rot fluoresziert im grünen (Fluoreszein) und roten (Rhodamin) Spektrum, so dass seine Fluoreszenz durch verlängerte Ablichtung gestillt werden muss. Das für Sudan II und Öl Rot O als Lösung verwendete Ethanol und Isopropanol führt zu einer Deformierung von Lipidtropfen (Fukumoto und Fujimoto, 2002).

Die Einführung der Gefrierbruchmethode (Steere, 1957; Moor und Mühlethaler, 1963; Branton *et al.*, 1975; Branton und Moor, 1964) hat die Untersuchung der Membranstruktur revolutioniert. Die breite Anwendung dieser Methode seit etwa drei Jahrzehnten hat zur Entdeckung einer Fülle ungeahnter Details der Membranarchitektur geführt und neue Perspektiven zum Verständnis der Beziehungen zwischen Membranstruktur und ihren Funktionen eröffnet.

Die Voraussetzung für das Verständnis der Beziehungen zwischen Membranstruktur und -funktion ist die chemische Identifizierung der in gefriergebrochenen Membranen sichtbaren Komponenten, welche diese Methode allein angewandt nicht liefern konnte.

Technische Verbesserungen und Innovationen haben bei gleichzeitiger Entwicklung anderer biophysikalischer, biochemischer und biologischer Methoden den Rahmen der ursprünglichen Technik wesentlich erweitert. Erste Schritte waren die Applikation von Ferritin-konjugierten Antikörpern, Membranrekonstruktionsmethoden und Gefrierätzautoradiographie. Weitere Fortschritte sind durch die Einführung zytochemischer Methoden erzielt worden: Die Kombination von Gefrierbruch mit zytochemischer Markierung individueller Membranmoleküle, die sogenannte Gefrierbruchzytochemie, kann Aussage geben über die chemische Natur und Topologie von Membrankomponenten. Neuere Versuche waren a) Markierung von Zellsuspensionen vor Herstellung der Replikas (Pinto da Silva und Branton, 1970; Pinto da Silva und Kan, 1984) und b) Markierung gefriergebrochener Membranen nach Platin/Kohlebedampfung (Dinchuk *et al.*, 1987; Gruijters *et al.*, 1987; Andersson und Pinto da Silva, 1988; Fujimoto, 1995). Diese Verfahren waren jedoch nur anwendbar zur Markierung äußerer Membranhälften und ermöglichten keine zytochemische Charakterisierung innerer Membranhälften. Zudem ließen sie sich ausschließlich an isolierten Zellen anwenden, nicht aber an Gewebestücken. Aufgrund dieser Einschränkungen haben diese Techniken keine breite Anwendung gefunden.

Fujimoto (1995) beschrieb einen völlig neuen Ansatz für die Kombination der Gefrierbruchmethode mit immunzytochemischen Verfahren. Bei diesem Verfahren wird die Gefrierbruchtechnik mit immunzytochemischer Markierung von individuellen Membranmolekülen kombiniert. Diese Methode erlaubt die direkte Markierung von

Membranproteinen in Platin/Kohle Replikas. Wesentliches Merkmal dieser Methode ist die Verwendung des Detergens Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) anstelle von Chlorbleiche für die Platin/Kohle Replikas. Fujimoto konnte zeigen, dass durch die Behandlung der Platin/Kohle Replikas mit SDS fast alle zellulären Komponenten entfernt werden – ähnlich wie mit der herkömmlichen Chlorbleiche - außer denen jedoch, die in direktem Kontakt mit dem Platin/Kohle Replika sind; dies sind die Membranbruchflächen mit den inkorporierten Proteinen. Die Membranproteine bleiben in den Replikas erhalten und sind für eine immunzytochemische Darstellung zugänglich.

Die von Fujimoto entwickelte SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie ist allen bisherigen Verfahren überlegen.

Mit dieser Methode können Membranproteine selektiv mit spezifischen Antikörpern markiert werden (Fujimoto, 1995; Fujimoto *et al.*, 1997a, b; Robenek *et al.*, 2003, 2004, 2005). Weiterhin können mit Hilfe dieser Methode und spezifischen Antikörpern die Verteilung von Phospholipiden in verschiedenen Zellen und intrazellulären Membranen sowie die exakte Topologie integraler Membranproteine dargestellt werden (Fujimoto *et al.*, 1997a, b).

Im Gegensatz zur Originalmethode von Fujimoto (1995) benutzen wir, bevor die Zellen tiefgefroren werden, eine kurze, maximal 3 min dauernde Behandlung mit Glycerin aus folgenden Gründen: Da wir Gefrierbrüche in der uns zur Verfügung stehenden Balzers Gefrierbruchanlage nur mit Hilfe eines Messers durchführen können, entstehen große Druckkräfte auf den zu schneidenden bzw. brechenden Eisblock. Der Zusatz von Glycerin wirkt stabilisierend und verstärkt die Haftung des Eisblocks an die Unterlage, so dass er nicht so leicht weggebrochen wird. Weiterhin bewirkt die Behandlung der Proben mit Glycerin eine geringere Eiskristallbildung und damit einen besseren ultrastrukturellen Erhalt und eine detailliertere Darstellung der Organellen, insbesondere der Membranen kleiner Organellen und Vesikel.

Bei der immunelektronenmikroskopischen Lokalisierung von Proteinen stellt die notwendige Fixierung der Zellen oder Gewebe ein großes Problem dar. In immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen an Lipidtropfen und ihren zugehörigen Proteinen wurden einerseits die Aldehyde Formaldehyd und Glutaraldehyd eingesetzt (Blanchette-Mackie *et al.*, 1995; Brasaemle *et al.*, 2000a,b), andererseits Alkohole wie Methanol (Jiang und Serrero, 1992; Heid *et al.*, 1998) und Azeton (Barba *et al.*, 1997; Frolov *et al.*, 2000; Atshaves *et al.*, 2001). Durch die Glutaraldehydfixierung erreicht man aufgrund der intensiven Quervernetzung zellulärer Proteine eine gute Erhaltung der Zellstruktur; allerdings geht dabei in der

Regel die Antigenizität verloren. Die Formaldehydfixierung dagegen erhält die Struktur der Zellen bei weitem nicht so gut wie die Glutaraldehydfixierung, bietet jedoch den Vorteil, dass bei akzeptabler Darstellung der Struktur auch die Antigenizität – zumindest für einige Proteine – erhalten bleibt. Azeton und Methanol sind für Studien an Lipidtropfen weniger geeignet (DiDonato und Brasaemle, 2003). Azeton extrahiert zelluläre Lipide, Methanol extrahiert die Mehrheit zellulärer Phospholipide und bewirkt eine Fusion von Lipidtropfen.

Die Formaldehydfixierung ist somit die am besten geeignete Fixierungsmethode für die Immunelektronenmikroskopie von Zellen und Geweben.

Mindestens eine Formaldehydfixierung von Zellen und Geweben ist auch für die Kryoultramikrotomie und anschließende Postembedding-Immunzytochemie, die sich bisher am besten von allen immunzytochemischen Techniken in der Elektronenmikroskopie bewährt, erforderlich. Der Grund hierfür liegt darin, dass man zum Unterdrücken von Eiskristallartefakten beim Einfrieren eine 2,3 M Saccharoselösung als Frostschutz verwendet. Eine solch hochkonzentrierte Lösung kann jedoch nur an durch chemische Fixierung stabilisierten Zellen und Geweben angewendet werden. Hierzu genügen Aldehyde in vergleichsweise schwachen Konzentrationen, welche in vielen Fällen die Antigenizität nicht störend beeinflussen.

Die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie bietet erstmals die Möglichkeit, zumindest kultivierte Zellen durch vollständigen Verzicht auf chemische Fixierung bei optimaler Strukturhaltung immunzytochemisch analysieren zu können. Mit dieser Methode wird neben optimaler Strukturhaltung auch eine ultrastrukturelle Darstellung hochempfindlicher antigener Bindungsstellen erreicht, die sonst selbst schon bei schwacher chemischer Fixierung zerstört würden. Durch diese Methode kann außerdem eine dem Naturzustand recht nahekommende Erhaltung der Ultrastruktur der Zellen erreicht werden. Denn durch die schnelle Gefrierfixation werden nicht nur die Protein- und Lipidkomponenten erhalten, sondern sie verbleiben auch in ihrer ursprünglichen Lokalisation.

Kolloidale Goldpartikel haben sich für die Immunmarkierung intrazellulärer Proteine wie Adipophilin und Perilipin speziell für die Anwendung bei Platin /Kohle Replikas aufgrund ihres hohen Eigenkontrastes als ideale Marker erwiesen. Sie können darüber hinaus in unterschiedlichen Größen hergestellt werden und sind leicht mit Antikörpern zu koppeln. Sie sind hochspezifisch und sehr sensibel, so dass sie für eine quantitative Analyse eingesetzt werden können.

Bisher ist die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie weitgehend nur anwendbar auf kultivierte Zellen oder Zellen in Suspensionskultur. Membranproteine in komplexen

Gewebestücken lassen sich nicht darstellen. Dies hängt mit dem SDS-Reinigungsvorgang zusammen. Für die Reinigung der Replikas mit SDS ist es notwendig, die Präparate kräftig zu schütteln. Selbst bei Zellkulturen gelingt die Reinigung dabei oft nur unvollständig. Gewebestücke widersetzen sich der Reinigung mit SDS noch stärker und es kommt dabei zu starker Fragmentierung der fragilen Replikas. Diese Fragmente sind meist so klein, dass sie sich nur mühsam auf Netze aufnehmen lassen. Außerdem kommt es zu einem Verlust der histologischen Orientierung in den Replikafragmenten (Rash *et al.*, 1998).

## 4.2 Lokalisation von Perilipin und Adipophilin in Lipidtropfen

Wir haben die Verteilung der PAT-Proteine Perilipin in Adipozyten und Adipophilin in Makrophagen untersucht. Die Kenntnis von der intrazellulären Lokalisation dieser Proteine ist von entscheidender Bedeutung, um Aussagen zu ihrer Funktion machen zu können. Sowohl Perilipin als auch Adipophilin wurden bisher als ausschließlich in den Oberflächen von Lipidtropfen vorkommende Proteine beschrieben (Londos *et al.*, 1999b; Murphy, 2001).

Wir haben als neues elektronenmikroskopisches Verfahren die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie eingesetzt, welche alle bisher für die Lokalisation von Perilipin und Adipophilin verwendeten Verfahren an Auflösungsvermögen, Spezifität und Präzision übertrifft. Mit dieser Methode konnten wir nachweisen, dass beide Proteine nicht – wie bisher angenommen - ausschließlich in der Oberfläche von Lipidtropfen vorkommen, sondern auch Bestandteil des Lipidtropfenkerns sind (Abb. 28, 29).

Wir vermuten, dass das bisherige Fehlschlagen, Perilipin und Adipophilin im Kern von Lipidtropfen nachzuweisen, auf die dazu verwendeten Methoden zurückzuführen ist. Wie bereits unter 4.1 erläutert, erfordern die Postembedding-Immunzytochemie an Kryoultradünnschnitten, die herkömmliche Gefrierbruchtechnik und die Immunfluoreszenzmikroskopie eine vorherige chemische Fixierung und/oder die Anwendung von Lösemitteln während der Aufbereitung. Fixierung von Zellen könnte 1.) die Antigenizität von Perilipin und Adipophilin vermindert haben, so dass sie mittels Antikörper erschwert nachweisbar waren.

2.) durch Extraktion intrazellulärer Lipide die Struktur von Lipidtropfen verändert haben und somit den Nachweis von Perilipin und Adipophilin im Lipidtropfenkern unmöglich gemacht haben.

Auch von alkoholischen Lösungen, wie sie für die Farbstoffe Sudan III und Öl Rot O im Rahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet werden, ist inzwischen bekannt, dass sie Einfluss auf die Struktur von Lipidtropfen nehmen.

Durch Verzicht auf die Fixierung der Zellen bei der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie wurde eine hervorragende Immungoldmarkierung als immunzytochemischer Nachweis für Perilipin und Adipophilin in den untersuchten Zellen erzielt.

Die quantitative Analyse hat ergeben, dass die Menge an Perilipin und Adipophilin in den Lipidtropfenkernen der untersuchten Zellen stark variieren kann, ja das sogar teilweise keine Markierungen zu finden sind.

Dies könnte einerseits bedeuten, dass nicht alle Lipidtropfenkerne Perilipin oder Adipophilin enthalten.

Eine andere Erklärung für das Fehlen dieser PAT-Proteine in einigen Lipidtropfenkernen könnte die Behandlung mit Glycerin vor dem Einfrieren der Zellen sein. Fukumoto und Fujimoto (2002) konnten zeigen, dass Glycerin zu einer Deformierung und Fusion von Lipidtropfen führen kann.

Ausserdem muss bedacht werden, dass jede Bruchfläche in den Replikas nur einen kleinen Teil des gesamten Lipidtropfens widerspiegelt.

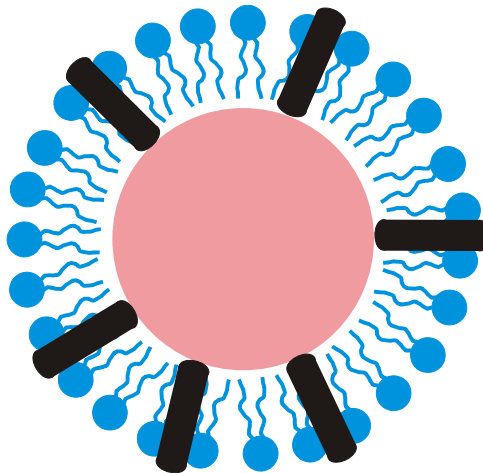


Abbildung 28: Gegenwärtige Hypothese der Lokalisation von Perilipin und Adipophilin ausschließlich in der Oberfläche von Lipidtropfen.

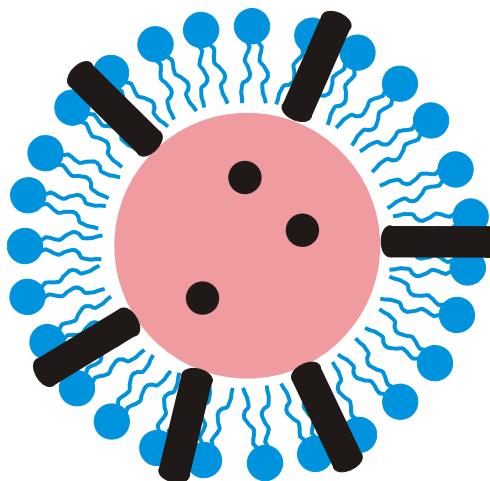


Abbildung 29: Die in dieser Arbeit nachgewiesene Lokalisation von Perilipin und Adipophilin sowohl in der Oberfläche als auch im Kern von Lipidtropfen.

### 4.3 Transport von Perilipin und Adipophilin zu Lipidtropfen

Über den Transport von Perilipin und Adipophilin ist bisher wenig bekannt. Wie diese Proteine zu Lipidtropfen gelangen, ist gegenwärtig Gegenstand intensiver experimenteller Forschung und theoretischer Spekulationen. Die Erkenntnis, dass beide PAT-Proteine nicht nur mit der Oberfläche von Lipidtropfen assoziiert sind, sondern zudem Bestandteil des Lipidtropfenkerns sind, wirft die Frage auf, wie sie durch die Lipidtropfenhülle transportiert werden und Zugang zum Lipidtropfenkern erlangen.

#### 4.3.1 Transportsequenzen

Perilipine sollen posttranslational zu den wachsenden Lipidtropfen gelangen. Innerhalb der primären Aminosäuresequenz des Perilipin muss es demnach ein oder mehrere Signale geben, die seinen Transport zu den Lipidtropfen vermitteln. Verschiedene Studien haben sich mit Signalen innerhalb der Aminosäuresequenz beider Proteine beschäftigt, die für den Transport der Proteine zu Lipidtropfen verantwortlich sein könnten. (Garcia *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2004; McManaman *et al.*, 2003; Nakamura und Fujimoto, 2003; Targett-Adams *et al.*, 2003). Garcia *et al.* (2003) haben zeigen können, dass die zentrale Domäne des Perilipin A, welche 25% der Aminosäuresequenz ausmacht, erforderlich ist, um das Protein zu den Lipidtropfen zu schicken. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass innerhalb der zentralen 25% des Perilipin A drei hydrophobe Sequenzen an Position 243-260 (H1), 320-342 (H2) und 349-364 (H3) sowie eine azide Sequenz an Position 291-318 vorhanden sind. Diese Sequenzen enthalten alle Informationen für den Transport des Perilipin zum Lipidtropfen und seine Verankerung im Lipidtropfen (Subramanian *et al.*, 2004).

Eine Fusion dieser zentralen Region mit dem Green-Fluorescent Protein führte beim Jellyfisch *Aequorea Victoria* zum Transport des Green-Fluorescent Proteins zu Lipidtropfen (Garcia *et al.*, 2003).

Die selektive Deletion einer dieser Sequenzen hat keinen Effekt, aber eine kombinierte Zerstörung von H1, H2 und H3 verhindert einen effektiven Transport des Perilipins zu Lipidtropfen und seine dortige Verankerung. Vermutlich ist H1 oder H2 für einen optimalen Transport des Perilipin zu Lipidtropfen und eine stabile

Assoziation mit dem Lipidtropfen verantwortlich. Während mutiertes H3 in Abwesenheit von H1 und H2 keinen effektiven Transport des Perilipin zu Lipidtropfen bewirken kann, sind mutierte Varianten von H1 oder H2 in Abwesenheit von H3 dazu in der Lage.

Es ist bekannt, dass auch einige andere Lipidtropfen-assoziierte Proteine über Signale innerhalb hydrophober Sequenzen zu Lipidtropfen gelangen: Hierzu gehören die Oleosine in Pflanzensamen (Murphy, 2001; Huang, 1996), das Hepatitis C-Kernprotein (Hope und McLauchlan, 2000) sowie das GB Virus B-Protein (Hope *et al.*, 2002) und die Familie der Caveoline (Fujimoto *et al.*, 2001; Ostermeyer *et al.*, 2004).

Interessanterweise wird der Transport von Adipophilin zu Lipidtropfen nicht über hydrophobe Sequenzen vermittelt, sondern über zahlreiche Signale, die diskontinuierlich innerhalb der primären Aminosäuresequenz des Proteins verbreitet sind (McManaman *et al.*, 2003; Nakamura und Fujimoto, 2003; Targett-Adams *et al.*, 2003). Die lange gehegte Vermutung, dass die PAT-Domäne, die Perilipin, Adipophilin und TIP47 gemein ist, für den Transport der Proteine zu Lipidtropfen verantwortlich sein könnte, konnte kürzlich widerlegt werden (McManaman *et al.*, 2003).

Bisher hat man keine übereinstimmende Sequenz finden können, die alle Proteine gemeinsam besitzen und die als spezifisches Transportsignal identifiziert werden kann.

#### 4.3.2 Transportmechanismen

Unter 1.3.1 beschrieben wir bereits, dass Lipidtropfen innerhalb der Bilayer des ER durch Verschmelzung neutraler Lipide zu lamellären Schichten entstehen. Perilipin wurde im ER nicht gefunden. Über eine Form des Adipophilin mit geringerem Molekulargewicht, welche mit dem ER assoziiert sein könnte, wurde berichtet (Heid *et al.*, 1996). Weiterhin wurde das Vorkommen von Adipophilin in der Plasmamembran Adipophilin-exprimierender COS-7 Zellen beschrieben (Gao and Serrero, 1999). Neue vorläufige Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass Perilipin und Adipophilin im Zellkern, in der Plasmamembran und im ER vorkommen. Daher ist es fraglich, ob die Proteine – wie bisher angenommen - an freien Ribosomen synthetisiert werden (Londos *et al.*, 1999b; Brasaemle *et al.*,



1997b) und dann von einem zytosolischen Ort der Synthese zu den Lipidtropfen gelangen.

Heid *et al.* (1996) und Brown (2001) schlugen vor, dass Adipophilin über laterale Diffusion von den Membranen des ER auf die Oberfläche der Lipidtropfen gelangen könnte. Es ist bekannt, dass Adipophilin sich posttranslationalen Modifikationen einschliesslich Acylierung unterziehen kann, welche seine Bindung an Lipidtropfen unterstützen können. Es wurde vorgeschlagen, dass Perilipin über hormonell induzierte Phosphorylierung – unter 1.3.2.1 näher beschrieben - Zugang zur Lipidtropfenoberfläche erlangen könnte. Welche genau die Mechanismen sind, über die die PAT-Proteine an die Oberfläche des Lipidtropfens gelangen, und wie sie von dort in den Kern gelangen, kann zur Zeit noch nicht erklärt werden.

## 5. Zusammenfassung

Nahezu alle Organismen, einschließlich Hefen, Pflanzen und Tieren sowie einige Prokaryonten, können neutrale Lipide in intrazellulären Lipidtropfen verpacken. Lipidtropfen sind dynamische subzelluläre Strukturen, die für die Membran-Biosynthese, die Cholesterin-Homöostase, den Cholesterin-Metabolismus, den Lipidtransport und die Energiebalance erforderlich sind. Sie sind zusammengesetzt aus einem Kern aus neutralen Lipiden (Triacylglycerin, Diacylglycerin und Sterol-Ester), umgeben von einem Monolayer aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und spezifischen Populationen von Proteinen, die als notwendig für Gestaltung und Funktion der Lipidtropfen erachtet werden. Die bisher am besten beschriebenen Lipidtropfen-assoziierten Proteine sind die Perilipine und Adipophilin.

Bisher wurde angenommen, dass die Lipidtropfen-assoziierten Proteine ausschließlich in dem den Lipidtropfen umgebenden Monolayer vorkommen.

Diese Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, neue Erkenntnisse über das Vorkommen und die Verteilung der Lipidtropfen-assoziierten Proteine Perilipin und Adipophilin in Lipidtropfen zu gewinnen. Als Objekte dienten kultivierte Adipozyten und Makrophagen. Für die Analysen wurde im Wesentlichen die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie eingesetzt. Diese Methode bietet erstmals die Möglichkeit, Zellen durch vollständigen Verzicht auf chemische Fixierung bei optimaler Strukturhaltung immunzytochemisch zu analysieren. Sie ist allen bisherigen Verfahren an Auflösungsvermögen, Spezifität und Präzision bei weitem überlegen. Mit Hilfe der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie konnten wir Perilipin und Adipophilin nicht nur in der Oberfläche von Lipidtropfen der untersuchten Zellen nachweisen, sondern erstmalig auch in deren Kern.

## 6. Literaturverzeichnis

ABUMRAD NA, EL MAGHRABI MR, AMRI EZ, LOPEZ E, GRIMALDI PA, 1993. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 268:17665-17668.

ABUMRAD NA, PERKINS RC, PARK JH, PARK CR, 1981. Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *J Biol Chem* 256:9183-9191.

AKKERMANN JWN, NIEUWENHUIS HK, SIXMA JJ, 1987. *Thrombose und Arteriosklerose*. Biberach an der Riss: Thomae GmbH.

ALCADE J., BONAY P., ROA A., VILARO S., Sandoval, IV, 1992. Assembly and disassembly of the Golgi complex: two processes arranged in a cis-trans direction. *J Cell Biol* 116, 69-83.

ALMAHBOBI G, 1995. Adhesion of intermediate filaments and lipid droplets in adrenal cells studied by field emission scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res* 281:387-390.

ALMAHBOBI G, HALL PF, 1990. The role of intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *J Cell Sci* 97:679-687.

ALMAHBOBI G, WILLIAMS LJ, HALL PF, 1992. Attachment of steroidogenic lipid droplets to intermediate filaments in adrenal cells. *J Cell Sci* 101:383-393.

ANDERSSON FC, PINTO DA SILVA P, 1988. Fracture-flip: new high-resolution images of cell surfaces after carbon stabilization of freeze-fractured membranes. *J Cell Sci* 90:531-541.

AOKI T, HAGIWARA H, FUJIMOTO T, 1997. Peculiar distribution of fodrin in fat-storing cells. *Exp Cell Res* 234:313-320.

ASSMANN G, 1982. *Lipidstoffwechsel und Atherosklerose*. Stuttgart: Schattauer Verlag.

ATSHAVES BP, STOREY SM, MCINTOSH AL, PETRESCU AD, LYUKSYUTOVA OI, GREENBERG AS, SCHROEDER F, 2001. Sterol carrier protein-2 expression

modulates protein and lipid composition of lipid droplets. *J Biol Chem* 276:25324-25335.

BARBA G, HARPER F, HARADA T, KOHARA M, GOULINET S, MATSUURA Y, EDER G, SCHAFF Z, CHAPMAN MJ, MIYAMURA T, BRECHOT C, 1997. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1200-1205.

BARBERO P, BUELL E, ZULLEY S, PFEFFER SR, 2001. TIP47 is not a component of lipid droplets. *J Biol Chem* 276:24348-24351.

BLANCHETTE-MACKIE EJ, DWYER NK, BARBER T, COXEY RA, TAKEDA T, RONDINONE CM, THEODORAKIS JL, GREENBERG AS, LONDOS C, 1995. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res* 36:1211-1226.

BRANTON D, BULLIVANT S, GILULA NB, KARNOVSKY MJ, MOOR H, MUHLETHALER K, NORTHCOTE DH, PACKER L, SATIR B, SATIR P, SPETH V, STAEHLIN LA, STEERE RL, WEINSTEIN RS, 1975. Freeze-etching nomenclature. *Science* 190:54-56.

BRANTON D, MOOR H, 1964. Fine structure in freeze-etched *Allium cepa* L. root tips. *J Ultrastruct Res* 11:401-411.

BRASAEMLE DL, BARBER T, KIMMEL AR, LONDOS C, 1997a. Post-translational regulation of perilipin expression. Stabilization by stored intracellular neutral lipids. *J Biol Chem* 272:9378-9387.

BRASAEMLE DL, BARBER T, WOLINS NE, SERRERO G, BLANCHETTE-MACKIE EJ, LONDOS C, 1997b. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 38:2249-2263.

BRASAEMLE DL, LEVIN DM, ADLER-WAILES DC, LONDOS C, 2000a. The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochim Biophys Acta* 1483:251-262.

BRASAEMLE DL, RUBIN B, HARTEN IA, GRUIA-GRAY J, KIMMEL AR, LONDOS C, 2000b. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem* 275:38486-38493.

BROWN DA, 2001. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol* 11:446-449.

BROWN MS, GOLDSTEIN JL, 1990. Atherosclerosis. Scavenging for receptors. *Nature* 343:508-509.

BROWN MS, GOLDSTEIN JL, 1983. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 52:223-261.

BUECHLER C, RITTER M, DUONG CQ, ORSO E, KAPINSKY M, SCHMITZ G, 2001. Adipophilin is a sensitive marker for lipid loading in human blood monocytes. *Biochim Biophys Acta* 1532:97-104.

BUEHLING KJ, LEPENIES J, WITT K, 2000. Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie. München, Jena: Urban & Fischer

CAMPBELL JH, CAMPBELL GR, 1994. Cell biology of atherosclerosis. *J Hypertens Suppl* 12:129-132.

CHAN AP, KLOC M, ETKIN LD, 1999. fatvg encodes a new localized RNA that uses a 25-nucleotide element (FVLE1) to localize to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development* 126:4943-4953.

CHARDIN P, MCCORMICK F, 1999. Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* 97:153-155.

CHARRON AJ, SIBLEY LD, 2002. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 115:3049-3059.

CHEGE NW, PFEFFER SR, 1990. Compartmentation of the Golgi complex: brefeldin-A distinguishes trans-Golgi cisternae from the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 111:893-899.

CLIFFORD GM, LONDOS C, KRAEMER FB, VERNON RG, YEAMAN SJ, 2000. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* 275:5011-5015.

COLUCCI-GUYON E, PORTIER MM, DUNIA I, PAULIN D, POURNIN S, BABINET C, 1994. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell* 79:679-694.

CORSINI E, VIVIANI B, ZANCANELLA O, LUCCHI L, VISIOLI F, SERRERO G, BARTESAGHI S, GALLI CL, MARINOVICH M, 2003. Induction of adipose differentiation related protein and neutral lipid droplet accumulation in keratinocytes by skin irritants. *J Invest Dermatol* 121:337-344.

COUSIN B, CASTEILLA L, DANI C, MUZZIN P, REVELLI JP, PENICAUD L, 1993. Adipose tissues from various anatomical sites are characterized by different patterns of gene expression and regulation. *Biochem J* 292:873-876.

DIAZ E, PFEFFER SR, 1998. TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* 93:433-443.

DIDONATO D, BRASAEMLE DL, 2003. Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* 51:773-780.

DINCHUK JE, JOHNSON TJ, RASH JE, 1987. Postreplication labeling of E-leaflet molecules: membrane immunoglobulins localized in sectioned, labeled replicas examined by TEM and HVEM. *J Electron Microsc Tech* 7:1-16.

DOMS RW, RUSS G, YEWDELL JW, 1989. Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 109:61-72.

DVORAK AM, DVORAK HF, PETERS SP, SHULMAN ES, MACGLASHAN DW, JR., PYNE K, HARVEY VS, GALLI SJ, LICHTENSTEIN LM, 1983. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol* 131:2965-2976.

DVORAK AM, MORGAN ES, TZIZIK DM, WELLER PF, 1994. Prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase): ultrastructural localization to nonmembrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human eosinophils and 3T3 fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol* 105:245-250.

EGAN JJ, GREENBERG AS, CHANG MK, LONDOS C, 1990. Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 265:18769-18775.

EGAN JJ, GREENBERG AS, CHANG MK, WEK SA, MOOS MC, JR., LONDOS C, 1992. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of

hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8537-8541.

FAGIOTTO A, ROSS R, 1984. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 4:341-356.

FONG TH, WANG SM, 1997. Dissection of the signaling mechanism for capsule detachment of lipid droplets in rat adrenocortical cells. *J Cell Biochem* 65:67-74.

FONG TH, WANG SM, LIN HS, 1996. Immunocytochemical demonstration of a lipid droplet-specific capsule in cultured Leydig cells of the golden hamsters. *J Cell Biochem* 63:366-373.

FONG TH, YANG CC, GREENBERG AS, WANG SM, 2002. Immunocytochemical studies on lipid droplet-surface proteins in adrenal cells. *J Cell Biochem* 86:432-439.

FRANKE WW, HERGT M, GRUND C, 1987. Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell* 49:131-141.

FREEMAN DA, ASCOLI M, 1982. Studies on the source of cholesterol used for steroid biosynthesis in cultured Leydig tumor cells. *J Biol Chem* 257:14231-14238.

FROLOV A, PETRESCU A, ATSHAVES BP, SO PT, GRATTON E, SERRERO G, SCHROEDER F, 2000. High density lipoprotein-mediated cholesterol uptake and targeting to lipid droplets in intact L-cell fibroblasts. A single- and multiphoton fluorescence approach. *J Biol Chem* 275:12769-12780.

FUJII S, KAWAGUCHI H, YASUDA H, 1987. Fatty acid binding protein in kidney of normotensive and genetically hypertensive rats. *Hypertension* 10:93-99.

FUJIMOTO K, 1997. SDS-digested freeze-fracture replica labeling electron microscopy to study the two-dimensional distribution of integral membrane proteins and phospholipids in biomembranes: practical procedure, interpretation and application. *Histochem Cell Biol* 107:87-96.

FUJIMOTO K, 1995. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci* 108:3443-3449.

FUJIMOTO K, NAGAFUCHI A, TSUKITA S, KURAOKA A, OHOKUMA A, SHIBATA Y, 1997a. Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J Cell Sci* 110:311-322.

FUJIMOTO K, NODA T, FUJIMOTO T, 1997b. A simple and reliable quick-freezing/freeze-fracturing procedure. *Histochem Cell Biol* 107:81-84.

FUJIMOTO T, KOGO H, ISHIGURO K, TAUCHI K, NOMURA R, 2001. Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell. *J Cell Biol* 152:1079-1085.

FUJIWARA T, ODA K, YOKOTA S, TAKATSUKI A, IKEHARA Y, 1988. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263:18545-18552.

FUKUMOTO S, FUJIMOTO T, 2002. Deformation of lipid droplets in fixed samples. *Histochem Cell Biol* 118:423-428.

FUSTER V, BADIMON L, BADIMON JJ, CHESEBRO JH, 1992. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 326:242-250.

GALLI SJ, DVORAK AM, PETERS SP, SCHULMAN ES, MACGLASHIN DW, ISOMURA T, PYNE K, HARVEY VS, HAMMEL I, LICHTENSTEIN LM, DVORAK HF, 1985. Prostaglandins, leukotrienes, lipoxins, mechanism of action, clinical applications. New York: Plenum Press, 65-74.

GAO J, SERRERO G, 1999. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J Biol Chem* 274:16825-16830.

GAO J, YE H, SERRERO G, 2000. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids. *J Cell Physiol* 182:297-302.

GARCIA A, SEKOWSKI A, SUBRAMANIAN V, BRASAEMLE DL, 2003. The central domain is required to target and anchor perilipin A to lipid droplets. *J Biol Chem* 278:625-635.



GIBBONS GF, ISLAM K, PEASE RJ, 2000. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta* 1483:37-57.

GLASS CK, WITZTUM JL, 2001. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 104:503-516.

GOLDSTEIN JL, HO YK, BASU SK, BROWN MS, 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:333-337.

GREEN H, KEHINDE O, 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5:19-27.

GREEN H, KEHINDE O, 1976. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7:105-113.

GREENBERG AS, EGAN JJ, WEK SA, GARTY NB, BLANCHETTE-MACKIE EJ, LONDOS C, 1991. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* 266:11341-11346.

GREENBERG AS, EGAN JJ, WEK SA, MOOS MC, JR., LONDOS C, KIMMEL AR, 1993. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:12035-12039.

GREENSPAN P, MAYER EP, FOWLER SD, 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100:965-973.

GRONKE S, BELLER M, FELLERT S, RAMAKRISHNAN H, JACKLE H, KUHNLEIN RP, 2003. Control of fat storage by a *Drosophila* PAT domain protein. *Curr Biol* 13:603-606.

GRUIJTERS WT, KISTLER J, BULLIVANT S, GOODENOUGH DA, 1987. Immunolocalization of MP70 in lens fiber 16-17-nm intercellular junctions. *J Cell Biol* 104:565-572.

HALL PF, ALMAHBOBI G, 1997. Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *Microsc Res Tech* 36:463-479.

- HEID HW, MOLL R, SCHWETLICK I, RACKWITZ HR, KEENAN TW, 1998. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res* 294:309-321.
- HEID HW, SCHNOLZER M, KEENAN TW, 1996. Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane. *Biochem J* 320:1025-1030.
- HOPE RG, MCLAUCHLAN J, 2000. Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol* 81:1913-1925.
- HOPE RG, MURPHY DJ, MCLAUCHLAN J, 2002. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem* 277:4261-4270.
- HUANG AH, 1996. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol* 110:1055-1061.
- JIANG HP, HARRIS SE, SERRERO G, 1992. Molecular cloning of a differentiation-related mRNA in the adipogenic cell line 1246. *Cell Growth Differ* 3:21-30.
- JIANG HP, SERRERO G, 1992. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7856-7860.
- JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J, 1996. *Histologie*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- KLIEWER SA, SUNDSETH SS, JONES SA, BROWN PJ, WISELY GB, KOBLE CS, DEVCHAND P, WAHLI W, WILLSON TM, LENHARD JM, LEHMANN JM, 1997. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4318-4323.
- KNUDSON CM, STEMBERGER BH, PATTON S, 1978. Effects of colchicine on ultrastructure of the lactating mammary cell: membrane involvement and stress on the Golgi apparatus. *Cell Tissue Res* 195:169-181.

KOOPMAN R, SCHAART G, HESSELINK MK, 2001. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol* 116:63-68.

LEVER JD, 1957. The fine structure of brown adipose tissue in the rat with observations on the cytological changes following starvation and adrenalectomy. *Anat Rec* 128:361-377.

LINDER H, 1998. *Biologie*. Hannover: Schroedel Verlag GmbH.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, YUAN L, TIPPER C, AMHERDT M, ORCI L, KLAUSNER RD, 1991. Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 67:601-616.

LITVAK V, SHAUL YD, SHULEWITZ M, AMARILIO R, CARMON S, LEV S, 2002. Targeting of Nir2 to lipid droplets is regulated by a specific threonine residue within its PI-transfer domain. *Curr Biol* 12:1513-1518.

LONDOS C, BRASAEMLE DL, GRUIA-GRAY J, SERVETNICK DA, SCHULTZ CJ, LEVIN DM, KIMMEL AR, 1995. Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Trans* 23:611-615.

LONDOS C, BRASAEMLE DL, SCHULTZ CJ, ADLER-WAILES DC, LEVIN DM, KIMMEL AR, RONDINONE CM, 1999a. On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann N Y Acad Sci* 892:155-168.

LONDOS C, BRASAEMLE DL, SCHULTZ CJ, SEGREST JP, KIMMEL AR, 1999b. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol* 10:51-58.

LONDOS C, GRUIA-GRAY J, BRASAEMLE DL, RONDINONE CM, TAKEDA T, DWYER NK, BARBER T, KIMMEL AR, BLANCHETTE-MACKIE EJ, 1996. Perilipin: possible roles in structure and metabolism of intracellular neutral lipids in adipocytes and steroidogenic cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20 Suppl 3:S97-101.

LU X, GRUIA-GRAY J, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, LONDOS C, KIMMEL AR, 2001. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins

derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm Genome* 12:741-749.

MARTINEZ-BOTAS J, ANDERSON JB, TESSIER D, LAPILLONNE A, CHANG BH, QUAST MJ, GORENSTEIN D, CHEN KH, CHAN L, 2000. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat Genet* 26:474-479.

MATHER IH, KEENAN TW, 1998. Origin and secretion of milk lipids. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:259-273.

MCMANAMAN JL, PALMER CA, WRIGHT RM, NEVILLE MC, 2002. Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression and localization in the mouse mammary gland: evidence of a role in lipid secretion. *J Physiol* 545:567-579.

MCMANAMAN JL, ZABARONICK W, SCHAACK J, ORLICKY DJ, 2003. Lipid droplet targeting domains of adipophilin. *J Lipid Res* 44:668-673.

MISUMI Y, MISUMI Y, MIKI K, TAKATSUKI A, TAMURA G, IKEHARA Y, 1986. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 261:11398-11403.

MIURA S, GAN JW, BRZOSTOWSKI J, PARISI MJ, SCHULTZ CJ, LONDOS C, OLIVER B, KIMMEL AR, 2002. Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 277:32253-32257.

MOONEY RA, BORDWELL KL, 1991. Counter-regulation by insulin and isoprenaline of a prominent fat-associated phosphoprotein doublet in rat adipocytes. *Biochem J* 274:433-438.

MOOR H, MÜHLETHALER K, 1963. Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J Cell Biol* 17, 609-628.

MORALES CR, DOMITROVIC HA, SAMPIETRO J, 1982. Influence of colchicine on lactating mammary gland of the cow and rat with special reference to the exocytosis and to the milk fat globule secretion. *Anat Histol Embryol* 11:56-64.

MUNRO JM, COTRAN RS, 1988. The pathogenesis of atherosclerosis: Atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 58:249-261.

- MURPHY DJ, 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 40:325-438.
- MURPHY DJ, 1993. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog Lipid Res* 32:247-280.
- MURPHY DJ, VANCE J, 1999. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* 24:109-115.
- NAKAMURA N, FUJIMOTO T, 2003. Adipose differentiation-related protein has two independent domains for targeting to lipid droplets. *Biochem Biophys Res Commun* 306:333-338.
- NAPIER JA, STOBART AK, SHEWRY PR, 1996. The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. *Plant Mol Biol* 31:945-956.
- NOY N, DONNELLY TM, ZAKIM D, 1986. Physical-chemical model for the entry of water-insoluble compounds into cells. Studies of fatty acid uptake by the liver. *Biochemistry* 25:2013-2021.
- OHASHI M, MIZUSHIMA N, KABEYA Y, YOSHIMORI T, 2003. Localization of mammalian NAD(P)H steroid dehydrogenase-like protein on lipid droplets. *J Biol Chem* 278:36819-36829.
- ORCI L, TAGAYA M, AMHERDT M, PERRELET A, DONALDSON JG, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, KLAUSNER RD, ROTHMAN JE, 1991. Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. *Cell* 64:1183-1195.
- OSTERMEYER AG, RAMCHARAN LT, ZENG Y, LUBLIN DM, BROWN DA, 2004. Role of the hydrophobic domain in targeting caveolin-1 to lipid droplets. *J Cell Biol* 164:69-78.
- PATTON S, 1976. Mechanisms of secretion: effects of colchicine and vincristine on composition and flow of milk in the goat. *J Dairy Sci* 59:1414-1419.
- PAVELKA M, ELLINGER A, 1993. Early and late transformations occurring at organelles of the Golgi area under the influence of brefeldin A: an ultrastructural and lectin cytochemical study. *J Histochem Cytochem* 41:1031-1042.

- PINTO DA SILVA P, BRANTON D, 1970. Membrane splitting in freeze-etching. Covalently bound ferritin as a membrane marker. *J Cell Biol* 45:598-605.
- PINTO DA SILVA P, KAN FW, 1984. Label-fracture: a method for high resolution labeling of cell surfaces. *J Cell Biol* 99:1156-1161.
- POL A, LUETTERFORST R, LINDSAY M, HEINO S, IKONEN E, PARTON RG, 2001. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol* 152:1057-1070.
- POND CM, 1999. Physiological specialisation of adipose tissue. *Prog Lipid Res* 38:225-248.
- QUINN MT, PARTHASARATHY S, FONG LG, STEINBERG D, 1987. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2995-2998.
- RAINES EW, ROSENFELD ME, ROSS R, 1996. The role of macrophages. In: atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia: Lippincott Raven, 55-539.
- RASH JE, YASUMURA T, HUDSON CS, AGRE P, NIELSEN S, 1998. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11981-11986.
- REUTER A, BINKLE U, STUERMER CA, PLATTNER H, 2004. PrPc and reggies/flotillins are contained in and released via lipid-rich vesicles in Jurkat T cells. *Cell Mol Life Sci* 61:2092-2099.
- REYNOLDS ES, 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-212.
- ROBENEK H, SEVERS NJ, 1992. *Cell Interactions in Atherosclerosis*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- ROBENEK H, LORKOWSKI S, SCHNOOR M, TROYER D, 2005. Spatial integration of TIP47 and adipophilin in macrophage lipid bodies. *J Biol Chem* 280:5789-5794.

ROBENEK MJ, SEVERS NJ, SCHLATTMANN K, PLENZ G, ZIMMER KP, TROYER D, ROBENEK H, 2004. Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *FASEB J* 18:866-868.

ROBENEK MJ, SCHLATTMANN K, ZIMMER KP, PLENZ G, TROYER D, ROBENEK H, 2003. Cholesterol transporter caveolin-1 transits the lipid bilayer during intracellular cycling. *FASEB J* 13:1940-2.

ROSS R, 1993a. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809.

ROSS R, 1993b. Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol* 143:987-1002.

ROSS R, 1995a. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 57:791-804.

ROSS R, 1995b. Growth regulatory mechanisms and formation of the lesions of atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 748:1-4.

ROSS R, GLOMSET JA, 1976. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 295:369-377.

ROSS R, GLOMSET JA, 1973. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180:1332-1339.

SCHAFFER JE, LODISH HF, 1994. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79:427-436.

SCHERER PE, BICKEL PE, KOTLER M, LODISH HF, 1998. Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening. *Nat Biotechnol* 16:581-586.

SCHLESINGER PA, STILLMAN MT, PETERSON L, 1982. Polyarthritis with birefringent lipid within synovial fluid macrophages: case report and ultrastructural study. *Arthritis Rheum* 25:1365-1368.

SCHWIETERMAN W, SORRENTINO D, POTTER BJ, RAND J, KIANG CL, STUMP D, BERK PD, 1988. Uptake of oleate by isolated rat adipocytes is mediated by a 40-kDa plasma membrane fatty acid binding protein closely related to that in liver and gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:359-363.

SERRERO G, FROLOV A, SCHROEDER F, TANAKA K, GELHAAR L, 2000.

Adipose differentiation related protein: expression, purification of recombinant protein in *Escherichia coli* and characterization of its fatty acid binding properties. *Biochim Biophys Acta* 1488:245-254.

SERVETNICK DA, BRASAEMLE DL, GRUIA-GRAY J, KIMMEL AR, WOLFF J, LONDOS C, 1995. Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J Biol Chem* 270:16970-16973.

SEVERS NJ, SHOTTON DM, 1995. Rapid freezing, freeze fracture, and deep etching. New York: Wiley Liss Inc.

SMALL DM, 1988. George Lyman Duff memorial lecture. Progression and regression of atherosclerotic lesions. Insights from lipid physical biochemistry. *Arteriosclerosis* 8:103-129.

SORRENTINO D, STUMP D, POTTER BJ, ROBINSON RB, WHITE R, KIANG CL, BERK PD, 1988. Oleate uptake by cardiac myocytes is carrier mediated and involves a 40-kD plasma membrane fatty acid binding protein similar to that in liver, adipose tissue, and gut. *J Clin Invest* 82:928-935.

SOUZA SC, DE VARGAS LM, YAMAMOTO MT, LIEN P, FRANCIOSA MD, MOSS LG, GREENBERG AS, 1998. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 273:24665-24669.

SOUZA SC, MULIRO KV, LISCUM L, LIEN P, YAMAMOTO MT, SCHAFFER JE, DALLAL GE, WANG X, KRAEMER FB, OBIN M, GREENBERG AS, 2002. Modulation of hormone-sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system. *J Biol Chem* 277:8267-8272.

STARY HC, 1989. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 9:19-32.

STARY HC, CHANDLER AB, DINSMORE RE, FUSTER V, GLAGOV S, INSULL W, JR., ROSENFELD ME, SCHWARTZ CJ, WAGNER WD, WISSLER RW, 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council



on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1512-1531.

STARY HC, CHANDLER AB, GLAGOV S, GUYTON JR, INSULL W, JR., ROSENFELD ME, SCHAFFER SA, SCHWARTZ CJ, WAGNER WD, WISSLER RW, 1994. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89:2462-2478.

STEERE RL, 1957. Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens. *J Biophys Biochem Cytol* 3:45-60.

STEINBERG D, PARTHASARATHY S, CAREW TE, KHOO JC, WITZTUM JL, 1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915-924.

STEINER S, WAHL D, MANGOLD BL, ROBISON R, RAYMACKERS J, MEHEUS L, ANDERSON NL, CORDIER A, 1996. Induction of the adipose differentiation-related protein in liver of etomoxir-treated rats. *Biochem Biophys Res Commun* 218:777-782.

STREMMEL W, STROHMEYER G, BORCHARD F, KOCHWA S, BERK PD, 1985. Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4-8.

STROUS GJ, VAN KERKHOF P, VAN MEER G, RIJNBOUTT S, STOORVOGEL W, 1993. Differential effects of brefeldin A on transport of secretory and lysosomal proteins. *J Biol Chem* 268:2341-2347.

SUBRAMANIAN V, GARCIA A, SEKOWSKI A, BRASAEMLE DL, 2004. Hydrophobic sequences target and anchor perilipin A to lipid droplets. *J Lipid Res* 45:1983-1991.

SUTER ER, 1969. The fine structure of brown adipose tissue. 3. The effect of cold exposure and its mediation in newborn rats. *Lab Invest* 21:259-268.

SZTALRYD C, XU G, DORWARD H, TANSEY JT, CONTRERAS JA, KIMMEL AR, LONDOS C, 2003. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol* 161:1093-1103.

TAKEYA M, YOSHIMURA T, LEONARD EJ, TAKAHASHI K, 1993. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum Pathol* 24:534-539.

TANSEY JT, HUML AM, VOGT R, DAVIS KE, JONES JM, FRASER KA, BRASAEMLE DL, KIMMEL AR, LONDOS C, 2003. Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols. *J Biol Chem* 278:8401-8406.

TANSEY JT, SZTALRYD C, GRUIA-GRAY J, ROUSH DL, ZEE JV, GAVRILOVA O, REITMAN ML, DENG CX, LI C, KIMMEL AR, LONDOS C, 2001. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6494-6499.

TARGETT-ADAMS P, CHAMBERS D, GLEDHILL S, HOPE RG, COY JF, GIROD A, MCLAUCHLAN J, 2003. Live cell analysis and targeting of the lipid droplet-binding adipocyte differentiation-related protein. *J Biol Chem* 278:15998-16007.

TAUCHI-SATO K, OZEKI S, HOUJOU T, TAGUCHI R, FUJIMOTO T, 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem* 277:44507-44512.

TEICHERT-KULISZEWSKA K, HAMILTON BS, RONCARI DA, KIRKLAND JL, GILLON WS, DEITEL M, HOLLENBERG CH, 1996. Increasing vimentin expression associated with differentiation of human and rat preadipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20 Suppl 3:108-113.

TEIXEIRA L, RABOUILLE C, RORTH P, EPHRUSSI A, VANZO NF, 2003. *Drosophila* Perilipin/ADRP homologue Lsd2 regulates lipid metabolism. *Mech Dev* 120:1071-1081.

THAN NG, SUMEGI B, BELYEI S, BERKI T, SZEKERES G, JANAKY T, SZIGETI A, BOHN H, THAN GN, 2003. Lipid droplet and milk lipid globule membrane associated placental protein 17b (PP17b) is involved in apoptotic and differentiation processes of human epithelial cervical carcinoma cells. *Eur J Biochem* 270:1176-1188.

THAN NG, SUMEGI B, THAN GN, KISPAL G, BOHN H, 1999b. Is placental tissue protein 17b/TIP47 a new factor in cervical cancer genesis? *Anticancer Res* 19:5255-5258.

THAN NG, SUMEGI B, THAN GN, KISPAL G, BOHN H, 1999a. Cloning and sequencing of human oncodevelopmental soluble placental tissue protein 17 (PP17): homology with adipophilin and the mouse adipose differentiation-related protein. *Tumour Biol* 20:184-192.

THAN NG, SUMEGI B, THAN GN, KISPAL G, BOHN H, 1998. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding human placental tissue protein 17 (PP17) variants. *Eur J Biochem* 258:752-757.

TOKUYASU KT, 1980. Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. *Histochem J* 12:381-403.

TRIGATTI BL, MANGROO D, GERBER GE, 1991. Photoaffinity labeling and fatty acid permeation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 266:22621-22625.

VALIVULLAH HM, BEVAN DR, PEAT A, KEENAN TW, 1988. Milk lipid globules: control of their size distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8775-8779.

WAHRBURG U, 1989. Welche Rolle spielen die Risikofaktoren? In: *Arteriosklerose: Risikofaktoren, Vorbeugung, Therapie. Richtige Ernährung bei erhöhtem Cholesterinspiegel.* Niederhausen: Falken, 16-17.

WANG SM, FONG TH, 1995. A lipid droplet-specific capsule is present in rat adrenal cells: evidence from a monoclonal antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 217:81-88.

WANG SM, FONG TH, HSU SY, CHIEN CL, WU JC, 1997. Reorganization of a novel vimentin-associated protein in 3T3-L1 cells during adipose conversion. *J Cell Biochem* 67:84-91.

WANG X, REAPE TJ, LI X, RAYNER K, WEBB CL, BURNAND KG, LYSKO PG, 1999. Induced expression of adipophilin mRNA in human macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein and in atherosclerotic lesions. *FEBS Lett* 462:145-150.

WOLINS NE, RUBIN B, BRASAEMLE DL, 2001. TIP47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem* 276:5101-5108.

WOLINS NE, SKINNER JR, SCHOENFISH MJ, TZEKOV A, BENSCH KG, BICKEL PE, 2003. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *J Biol Chem* 278:37713-37721.

WORLD HEALTH ORGANISATION, 1985. Classification of atherosclerotic lesions. WHO Tech Rep Serv 143, 1-20.

YE H, SERRERO G, 1998. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression by ibuprofen and indomethacin in adipocyte precursors and in adipocytes. *Biochem J* 330:803-809.

ZANCANARO C, CARNIELLI VP, MORETTI C, BENATI D, GAMBA P, 1995. An ultrastructural study of brown adipose tissue in pre-term human new-borns. *Tissue Cell* 27:339-348.

## **7. Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. H. Robenek möchte ich mich für die interessante Themenstellung, die freundschaftliche Zusammenarbeit sowie die jederzeit hilfsbereite Betreuung bedanken.

Frau Karin Schlattmann danke ich für ihre Hilfe beim Anfertigen der Gefrierbruch-Replikas und der Immunzytochemie.

Herrn Dipl.-Biol. Oliver Hofnagel danke ich für seine Hilfe bei der quantitativen Auswertung der Ergebnisse und der Anfertigung der Statistik.

Bei Frau Marianne Opalka bedanke ich mich für die Anfertigung der Fotos.

## 8. Lebenslauf

## 9. Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Doktorarbeit mit dem Titel:

### **Topographie und Dynamik von Perilipin und Adipophilin in Lipidtropfen**

in dem Institut für Arterioskleroseforschung an der Universität Münster unter  
Anleitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. H. Robenek

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen Form noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Gelsenkirchen, den 12.04.2005

Elin Opretzka