

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. Gerd Assmann-

**Endozytose und Resekretion
von Apolipoprotein AI
durch humane Endothelzellen**

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

vorgelegt von Schlüter, Marc Alexander
aus Dortmund
2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jerzy-Roch Nofer
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Arnold von Eckardstein

Tag der mündlichen Prüfung: 25.08.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. Gerd Assmann-
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Jerzy-Roch Nofer
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Arnold von Eckardstein

ZUSAMMENFASSUNG

Endozytose und Resekretion von Apolipoprotein AI durch humane Endothelzellen
Schlüter, Marc Alexander

High-Density Lipoproteine (HDL) erfüllen im menschlichen Körper eine Fülle antiatherogener Funktionen, die zu einem großen Teil im extraluminalem vaskulären Interstitium vermittelt werden; z.B. liegt hier der Ausgangspunkt des Reversen Cholesterintransportes.

Die extraluminale Lokalisation dieser Prozesse wirft zwangsläufig die Frage auf, auf welchem Wege HDL und sein Hauptapolipoprotein-A, ApoAI, die Gefäßendothelbarriere überwinden. Das bisher gängige Modell geht von einem passiven parazellulären Transport aus, jedoch ist auch ein spezifischer transzellulärer Transport denkbar.

Um diese zweite Möglichkeit zu überprüfen, führten wir Assoziations- und Dissoziationsstudien mit fluoreszenz- und goldmarkiertem ApoAI an Endothelzellen aus menschlichen Nabelvenen (HUVEC) auf funktioneller und morphologischer Ebene durch. Die Zellen zeigen eine spezifische Assoziation und Dissoziation des markierten ApoAI. Beide Vorgänge sind temperatur- und kationenabhängig; die Aufnahme des ApoAI ist durch unmarkiertes ApoAI und modifiziertes LDL kompetitiv hemmbar. Morphologisch konnte das ApoAI in Clathrin-coated pits und Endosomen, Vesikeln, kleinen caveolaenahen Vesikeln und Caveolae nachgewiesen werden. Es ist denkbar, daß zwei parallele ApoAI-Aufnahmewege existieren, von denen einer zur Degradierung des ApoAI führt, während der zweite in einen Resekretionsvorgang einmündet. Die Hemmbarkeit der Aufnahme durch acetyliertes LDL legt eine Beteiligung eines Rezeptors aus der Scavenger-Rezeptorfamilie nahe, bislang konnte er jedoch noch nicht identifiziert werden. Das resezierte ApoAI weist eine Lipidhülle auf, die die Vermutung nahe legt, daß während des transzellulären Transportes eine Lipidierung stattfindet, die zur Bildung cholesterinreicher HDL-Vorstufen führt. Diese Partikel sind exzellente Cholesterinakzeptoren und könnten eine wesentliche Rolle im reversen Cholesterintransport spielen.

Tag der mündlichen Prüfung: 25.08.2005

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Lipoproteinstoffwechsel	1
1.1.1	Grundprinzipien des Lipoproteinstoffwechsels.....	1
1.1.2	Exogener Cholesterinstoffwechsel	1
1.1.3	Endogener Cholesterinstoffwechsel	3
1.1.4	Reverser Cholesterintransport und HDL-Metabolismus	4
1.2	Arteriosklerose	6
1.2.1	Epidemiologie.....	6
1.2.2	Genese der Arteriosklerose.....	7
1.3	Antiatherogene Eigenschaften von HDL.....	9
1.3.1	Zellulärer Cholesterinefflux	9
1.3.2	Antioxidative Eigenschaften von HDL	11
1.3.3	Adhäsionsmindernde Eigenschaften von HDL	11
1.3.4	Endotheliale Funktion, Mitogenität und Zytoprotektion.....	12
1.3.5	Hemmung der Gerinnung und Plättchenaktivierung.....	13
1.4	Transendothelialer HDL-Transport	14
1.5	Fragestellung	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Materialien.....	16
2.2.	Gewinnung und Kultur humaner Endothelzellen	20
2.2.1	Gewinnung von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen.....	20
2.2.2	Passage und Kultur der Endothelzellen	21
2.3	Präparation und Modifikation von Lipoproteinen	22
2.3.1	Isolation der Low Density Lipoproteine (LDL) und High Density Lipoproteine (HDL) aus Blutplasma durch sequentielle Ultrazentrifugation	22
2.3.2	Acetylierung der Low Density Lipoproteine (LDL)	23
2.4	Isolation und Markierung von ApoAI	24
2.4.1	Delipidierung der HDL.....	24
2.4.2	Isolation des ApoAI.....	24
2.4.3	Kopplung von ApoAI an Fluorescein.....	25
2.4.4	ApoAI-Gold-Konjugation	26
2.5	Fluoreszenzphotometrie.....	27
2.6	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	27
2.7	Zellexperimente	28
2.7.1	ApoAI-Beladung der Zellen	28
2.7.2	Abgabe von zellassoziertem ApoAI.....	28

2.7.3	Beladung der Endothelzellen mit dem Gold-ApoAI-Komplex.....	30
2.8	Nachweis von ApoAI durch SDS-PAGE und Western-Blot.....	31
2.8.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
2.8.2	Western Blot.....	32
2.9	Lichtmikroskopie.....	32
2.9.1	Entwicklung der ApoAI-Goldkomplexe mit Silberkolloid.....	32
2.9.2	Konservierung der Proben und Mikroskopie.....	33
2.10	Elektronenmikroskopie.....	33
2.10.1	Färbung und Präparation der Proben.....	33
2.10.2	Mikroskopie.....	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Die Assoziation von fluoresceinmarkiertem ApoAI mit Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen.....	37
3.1.1	Konzentrationsabhängigkeit.....	37
3.1.2	Zeitabhängigkeit.....	37
3.1.3	Fluoreszenzmikroskopie der Fluorescein-ApoAI-beladenen Zellen.....	38
3.1.4	Temperaturabhängigkeit.....	39
3.1.5	Kompetitive Hemmung durch natives ApoAI.....	39
3.1.6	Kompetitive Hemmung durch Lipoproteine und Rezeptorassoziertes Protein.....	40
3.1.7	Pharmakologische Beeinflussung der ApoAI-Assoziation.....	41
3.2	Die Dissoziation des Fluorescein-ApoAI-Komplexes von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen.....	43
3.2.1	Zeitabhängigkeit der ApoAI-Dissoziation.....	43
3.2.2	Temperaturabhängigkeit der ApoAI-Dissoziation.....	43
3.2.3	Pharmakologische Beeinflussung der ApoAI-Dissoziation.....	44
3.2.4	SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot der Entladungsmedien.....	45
3.3	Morphologische Untersuchung der Aufnahme und Resekretion von ApoAI.....	47
3.3.1	Lichtmikroskopische Untersuchung.....	47
3.3.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung.....	49
4	Diskussion.....	55
	Literaturverzeichnis.....	61
	Präsentation.....	66
	Danksagung.....	67
	Lebenslauf.....	68

Abkürzungsverzeichnis

ABC ~	engl. <i>ATP-binding cassette transporter</i> ~
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Ammoniumperoxidisulfat
APC	Aktiviertes Protein C
Apo~	Apolipoprotein ~
BEEM®	engl. <i>Better Equipment for Electron Microscopy</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
CATS	caveolaeassoziiertes tubuläres System
CCR2	Rezeptor für MCP-1
CD~	engl. <i>cluster of differentiation</i> , Bezeichnung für Oberflächenantigene
CD36	Mitglied der Scavenger-Rezeptorfamilie
CETP	Cholesterinester Transferprotein
CM	Chylomikronen
CNP	Natriuretisches Peptid C
COX-2	Cyclooxygenase 2
CXCR2	IL-8-Rezeptor, Mitglied der Chemokinrezeptor-Superfamilie
DMSO	Dimethylsulfoxyd
ECAT	European Concerted Action on Thrombosis - Studie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. <i>epithelial growth factor</i>
EGM	engl. <i>endothelial-cell growth medium</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i>
FGF	engl. <i>fibroblast growth factor</i>
FPLC	engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
HBSS	engl. <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HDL	<i>high-density</i> Lipoprotein(e)
HDL-C	HDL-Cholesterin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulphonische Säure
HL	Hepatische Lipase
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (engl. <i>high pressure liquid chromatography</i>)
HUVEC	engl. <i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	engl. <i>intracellular cell adhesion molecule 1</i>
IDL	<i>intermediate-density</i> Lipoprotein(e)
Ig~	Immunglobulin ~
IL~~	Interleukin
k~	Kilo~
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LDL	<i>low-density</i> Lipoprotein(e)
LCAT	Lecitin:Cholesterin Acyltransferase
Lp~	Lipoprotein ~

LPL	Lipoprotein Lipase
M	molar
m	Meter
m~	Milli~
μ~	Mikro~
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
Min.	Minute
mmLDL	minimal modifiziertes LDL, Vorstufe des oxLDL
n~	Nano~
OTO	Osmiumtetroxyd/Thiocarbohydrazid/Osmiumtetroxyd
oxLDL	oxidiertes LDL
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	engl. <i>platelet-derived growth factor</i>
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ = Prostacyclin
PKC	Proteinkinase C
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
PROCAM	Prospective Cardiovascular Münster-Studie
RAP	Rezeptorassoziiertes Protein
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SR-A	Scavenger-Rezeptor-A
SR-B1	Scavenger Rezeptor B1
SV	engl. <i>small vesicle</i>
TCH	Thiocarbohydrazid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamid
TFA	Trifluoressigsäure
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	engl. <i>unit</i>
V	Volt
v/v	Volumen:Volumen-Verhältnis
VCAM-1	engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLDL	<i>very-low-density</i> Lipoprotein(e)
w/v	Gewicht:Volumen-Verhältnis

1 Einleitung

1.1 Lipoproteinstoffwechsel

1.1.1 Grundprinzipien des Lipoproteinstoffwechsels

Cholesterin ist ein Lipid des menschlichen Körpers, welches ubiquitär in allen Geweben vorhanden ist. Es ist integraler Bestandteil zellulärer Membranen und dient als Substrat zur Synthese verschiedenster Substanzen mit unterschiedlichsten Funktionen, wie z.B. Steroidhormonen, Vitamin D und Gallensäuren. (8, 15, 30, 31)

Strukturell besteht Cholesterin aus einem apolaren Sterangerüst und ist als solches nicht wasserlöslich. Um im wässrigen Milieu des Körpers gelöst und transportiert werden zu können, müssen Cholesterin und andere Lipide des menschlichen Stoffwechsels, wie z.B. Triglyceride, in Lipoproteine verpackt werden. Diese weisen eine nach außen polare Hülle auf, die aus Apolipoproteinen und Phospholipiden gebildet wird. Als gemeinsames Merkmal besitzen Apolipoproteine eine amphiphile alpha-helikale Struktur, die es ihnen ermöglicht, einen apolaren Lipidkern zu umschließen und nach außen Löslichkeit des Lipoproteins in einer wässrigen Phase zu vermitteln. (16)

Insgesamt finden sich fünf Hauptklassen von Lipoproteinen, die sich in ihrer Zusammensetzung, Dichte, Größe und Funktion unterscheiden (Tabelle 1.1). (16,20) An ihrer Bildung sind verschiedene Apolipoproteine beteiligt, die außer strukturellen Aufgaben verschiedene Funktionen in der Enzymregulation und Rezeptorbindung wahrnehmen (Tabelle 1.2). (16) Das im Körper benötigte Cholesterin wird über zwei Quellen bereitgestellt: Ein Teil wird mit der Nahrung aufgenommen, ein weiterer wird in den Zellen des Körpers vor Ort synthetisiert.

1.1.2 Exogener Cholesterinstoffwechsel (50)

Mit der Nahrung zugeführtes Cholesterin wird im Dünndarm zusammen mit weiteren Nahrungslipiden durch Gallensäuren zu Mizellen emulgiert. Triglyceride und Phospholipide werden durch die an der Darmmukosa vorhandenen Lipasen zu Di- und Monoacylglycerolen, Fettsäuren, Glycerin und Phosphatiden gespalten. Diese Nahrungsbestandteile werden von Dünndarmmukosazellen resorbiert und zur Synthese von Chylomikronen verwendet. Die Aufgabe dieser Chylomikronen besteht im Transport der resorbierten Lipide zu den Geweben. Ein erheblicher Teil des Cholesterins wird

Lipoproteinklasse	Spezifische Dichte (g/ml)	Partikeldurchmesser (nm)
Chylomikronen (CM)	$\rho < 0,95$	75 – 1200
Very-low-density Lipoproteine (VLDL)	$0,95 < \rho < 1,006$	30 – 80
Intermediate-density Lipoproteine (IDL)	$1,006 < \rho < 1,019$	25 – 35
Low-density Lipoproteine (LDL)	$1,019 < \rho < 1,063$	18 – 25
High-density Lipoproteine (HDL)	$1,063 < \rho < 1,21$	7 – 17

Tabelle 1.1: Überblick über die Hauptlipoproteinklassen

Apolipoprotein	Lipoprotein-Zuordnung	Spezifische Stoffwechselfunktion
Apolipoprotein AI (ApoAI)	HDL, Chylomikronen	LCAT-Aktivierung HDL-Rezeptorbindung Vermittlung v. Cholesterinefflux
Apolipoprotein AII (ApoAII)	HDL, Chylomikronen	Vermittlung v. Cholesterinefflux Aktivierung d. Hepat. Lipase
Apolipoprotein AIV (ApoAIV)	HDL, Chylomikronen	Vermittlung v. Cholesterinefflux LCAT-Aktivierung
Apolipoprotein B48 (ApoB48)	Chylomikronen	Chylomikronenbildung
Apolipoprotein B100 (ApoB100)	VLDL, IDL, LDL	VLDL-Bildung LDL-Rezeptorbindung
Apolipoprotein CI (ApoCI)	Chylomikronen VLDL, IDL, HDL	Phospholipase A ₂ -Aktivierung Hemmung der hepatischen Remnant-Aufnahme
Apolipoprotein CII (ApoCII)	Chylomikronen VLDL, IDL, HDL	Hemmung der hepatischen Remnant-Aufnahme LPL-Aktivierung
Apolipoprotein CIII (ApoCIII)	Chylomikronen VLDL, IDL, HDL	Hemmung der hepatischen Remnant-Aufnahme LPL-Inhibition
Apolipoprotein E (ApoE)	Chylomikronen VLDL, IDL, HDL	Ligand für Chylomikronenremnants und IDL für verschiedene ApoE-Rezeptoren Vermittlung v. Cholesterinefflux

Tabelle 1.2: Auswahl wichtiger Apolipoproteine, Zuordnung zu Lipoproteinen und Funktion

allerdings mit Hilfe der ATP Binding Cassette Transporter ABCG5 und ABCG8 ins Darmlumen reseziert. (18) Chylomikronen bestehen zu ca. 90% aus Triglyceriden (nach erfolgter Resorption resynthetisiert), 3-8% aus Phospholipiden, 1% aus Cholesterin und 1-2% aus Proteinen. Hauptapolipoprotein ist ApoB48; auch ApoAI und ApoAIV sind in geringeren Mengen vorhanden. (16) Die Chylomikronen werden vom Dünndarm in die Lymphe abgegeben und gelangen über den Ductus thoracicus in das

venöse Blut. Das am kapillären Endothel befindliche Enzym Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert vor allem die transportierten Triglyceride. (54) Freiwerdende Fettsäuren binden an Albumin und stehen in dieser Form den peripheren Geweben zur Verfügung. Mit fortschreitender Lipolyse reduzieren die Chylomikronen ihre Größe, bis schließlich Restkörper, die sog. Chylomikronen-Remnants, übrigbleiben. Diese werden über hepatische Remnant-Rezeptoren in das Lebergewebe endozytiert. Mit ihnen wird das Nahrungscholesterin in die Leber aufgenommen, das dort zur Gallensäuresynthese verwendet wird oder in Form von VLDL sezerniert wird. (15, 60) Außerdem entstehen im Zuge der Lipolyse phospholipidreiche Oberflächenremnants, die zur HDL-Reifung beitragen. (23)

1.1.3 Endogener Cholesterinstoffwechsel (16)

In der Leber synthetisiertes Cholesterin, welches dort nicht zur Membranbildung oder Synthese von Gallensäuren benötigt wird, kann mit Hilfe von Lipoproteinen an die peripheren Gewebe weitergegeben werden. Die sezernierten Very-low-density Lipoproteine (VLDL) sind triglyzeridreich (ca. 55-65%), und beinhalten außerdem Phospholipide. Ihr Hauptapolipoprotein ist ApoB100. Des weiteren finden sich ApoC und ApoE. Auch VLDL reduzieren auf dem Weg durch das Kapillarsystem ihren Triglyzeridanteil durch die Wirkung der Lipoproteinlipase und verlieren somit an Größe. Schließlich bleiben Intermediate-density Lipoproteine (IDL) übrig, von denen ein Teil direkt über ApoE- oder ApoB-bindende Rezeptoren in die Leber aufgenommen wird. Der Rest der IDL wird zu Low-density Lipoproteinen (LDL) verstoffwechselt. Hieran beteiligte Vorgänge sind die durch die Hepatische Lipase vermittelte Hydrolyse weiterer Triglyceride, die Cholesterinestertransferprotein- (CETP-) vermittelte Aufnahme von Cholesterinestern von HDL und die Dissoziation von Apolipoproteinen E und C.

LDL sind kleine und cholesterinreiche Lipoproteine, die den größten Anteil des im menschlichen Plasma enthaltenen Cholesterins beinhalten. Ein großer Teil hiervon wird in Form von Cholesterinestern transportiert. Der größte Teil der LDL wird von hepatischen Zellen über ApoB-Rezeptoren aus der Blutbahn eliminiert, der Rest wird von peripheren Zellen zur Deckung ihres eigenen Cholesterinbedarfs über ApoB-Rezeptoren gebunden und clathrinabhängig endozytiert. (46) Dieses System ist über den intrazellulären Cholesteringehalt durch Inhibition der LDL-Rezeptorsynthese feinreguliert, so daß

es zu keiner Überladung der Zellen mit Cholesterin und Cholesterinestern kommen kann. Eine Ausnahme hiervon bilden Makrophagen, die modifizierte LDL durch Scavengerrezeptoren unreguliert aufnehmen und sich auf diese Weise mit Cholesterinestern überladen können. (17)

1.1.4 Reverser Cholesterintransport und HDL – Metabolismus (68)

In den Zellen gebildetes bzw. gespeichertes Cholesterin kann an die sog. High Density Lipoproteine (HDL) abgegeben werden und wird von ihnen zur Leber und den steroidogenen Geweben transportiert, wo sie zur Synthese von Gallensäuren, Vitamin D, Steroidhormonen etc. verwendet werden. Dieser Vorgang wird als *Reverser Cholesterintransport* bezeichnet.

HDL umfaßt eine heterogene Klasse von Lipoproteinen, deren gemeinsame Eigenschaft eine hohe Dichte ($>1,063$ g/ml) und eine geringe Größe (Durchmesser 5 - 17 nm) ist. Die Mehrzahl der HDL-Partikel enthalten ApoAI. Unterschiede im quantitativen und qualitativen Lipidgehalt, an Apolipoproteinen, Enzymen und Lipid-Transferproteinen führen zur Anwesenheit verschiedener HDL Subklassen, die sich in Form, Dichte, Größe, Lipidbeladung und Antigenität unterscheiden.

Lipidreiche α -HDL (d.h. HDL mit elektrophoretischer α -Mobilität) entstehen aus lipidarmen Partikeln oder lipidfreien Apolipoproteinen, indem diese mit Phospholipiden und unverestertem Cholesterin von hepatischen und nichthepatischen Zellen assemblieren (siehe unten). An dieser initialen Lipidierung ist der ATP Binding Cassette Transporter ABCA1 entscheidend beteiligt. (12, 62) Die oben genannten lipidarmen HDL-Vorstufen werden entweder als nativer HDL-Partikel durch die Leberzellen und die intestinalen Mukosazellen synthetisiert und sezerniert, dissoziieren von Chylomikronen und VLDL während Lipoproteinlipase-vermittelter Triglyceridhydrolyse oder werden durch Interkonversion von HDL₂ und HDL₃ generiert. Am letztgenannten Vorgang sind diverse Proteine beteiligt, unter anderem das Cholesterylester-Transferprotein (CETP), das Phospholipid-Transfer-Protein (PLTP) und die Hepatische Lipase (HL).

Lipidarme HDL-Vorstufen werden reif, lipidreich und sphärisch durch Aquisition von Phospholipiden und unverestertem Cholesterin von Zellen oder ApoB-enthaltenden Lipoproteinen, durch die Veresterung des Cholesterins durch die Lecitin:Cholesterin Acyltransferase (LCAT) und durch das Hinzukommen zusätzlicher Apolipoproteine. Die

frühen Produkte sind kleine HDL₃-Partikel, die durch weitere Veresterung von Cholesterin durch die LCAT, Fusion mit anderen HDL₃-Partikeln und PLTP-vermittelte Aufnahme von Phospholipiden aus triglyceridreichen Lipoproteinen zu größeren HDL₂-Partikeln wachsen.

Die Lipide oder Proteine der α -HDL werden auf zumindest zwei direkten Wegen aus der Zirkulation entfernt: Zum einen führt die Bindung an den Scavenger Rezeptor B1 (SR-B1) zur selektiven Aufnahme von Lipiden, zum anderen wird die Aufnahme des Holopartikels durch ApoE- oder ApoAI-Rezeptoren vermittelt. Des Weiteren gibt es einen CETP-vermittelten indirekten Weg durch Transfer von Cholesterinestern auf VLDL und LDL, die dann über den LDL-Rezeptorweg katabolisiert werden. (19)

Lipidarme Prä- β ₁-LpAI oder sogar lipidfreie ApoAI werden erneut bereitgestellt durch die Entfernung von Lipiden aus HDL₂ durch SR-B1, CETP und HL, die nachfolgende Konversion von HDL₂ in HDL₃ und die Konversion von HDL₃ in Prä- β ₁-LpAI durch PLTP. Diese kleinen Apolipoproteine bzw. Lipoproteine können das Plasma in den extravaskulären Raum verlassen, wo sie als Akzeptoren von zellulären Lipiden dienen und somit wieder die Bildung von HDL einleiten. Der zugrunde liegende Mechanismus für den Partikeltransport durch das Endothel wurde bislang nicht identifiziert.

1.2 Arteriosklerose

1.2.1 Epidemiologie (68)

Die Folgeerkrankungen arteriosklerotischer Gefäßveränderungen zählen zu den häufigsten Todesursachen sowohl in der Bundesrepublik Deutschland als auch in allen weiteren Industrieländern. (37,63) Manifestationsalter und Verlauf der Arteriosklerose sind stark durch Risikofaktoren beeinflusst. Im Laufe der letzten 50 Jahre wurden in zahlreichen prospektiven Studien die klassischen Risikofaktoren Alter, männliches Geschlecht, Eigen- und Familienanamnese arteriosklerotischer Erkrankungen, Diabetes, Rauchen, Bluthochdruck sowie erhöhte Blutkonzentrationen von LDL-Cholesterin und erniedrigte Konzentrationen von HDL-Cholesterin identifiziert. (1, 2, 6, 7, 9, 25, 34, 58) Für die vorgelegte Arbeit ist der Risikofaktor „niedriges HDL-Cholesterin“ von besonderem Interesse.

Zahlreiche Studien haben einen ausgeprägten Zusammenhang zwischen einem niedrigen HDL-Cholesterin (HDL-C)-Spiegel und dem Risiko der Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung (KHK) belegt. Mehr als 40% der Patienten mit einem Herzinfarkt haben ein niedriges HDL-C als kardiovaskulären Risikofaktor. Ein niedriges HDL-C und ApoAI wurden in der ECAT-Studie als wichtigste biochemische Risikofaktoren für koronare Ereignisse bei Patienten mit angiologisch gesicherter KHK identifiziert. Per Konvention wurde als HDL-C-Risikoschwellenwert 35 mg/dl (0,9 mmol/l) für Männer und 45 mg/dl (1,15 mmol/l) für Frauen festgelegt. Das Ausmaß dieses inversen Zusammenhangs zwischen HDL-C und koronarem Risiko – und somit auch die definierten Schwellenwerte – hängen außerdem vom Vorhandensein weiterer Risikofaktoren ab, wie z.B. Diabetes mellitus oder Hypercholesterinämie.

Jedoch konnte eine direkte Kausalität für den Zusammenhang zwischen HDL-C und KHK nicht sicher bewiesen werden. Beispielsweise steigt die kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit sehr hohen HDL-C Spiegel. Außerdem sinkt HDL-C als negativer Akute-Phase-Marker bei systemischen Entzündungen, die ihrerseits Atherosklerose verursachen oder verschlimmern können. Die Mortalität ist bei Rauchern signifikant assoziiert mit dem HDL-Cholesterin, jedoch nicht bei Nichtrauchern (PROCAM). Schließlich konnte durch Behandlung mit Fibraten, Aktivatoren der Lipoproteinlipase, die zu einer Erhöhung des HDL-Spiegels führen, zwar bei einigen, jedoch nicht bei allen Studien eine Prävention von koronaren Ereignissen erreicht werden.

Der HDL-Cholesterinspiegel ist ein stärkerer Risikofaktor in Kurzzeit-follow-up Studien als in Langzeit-follow-ups. In der PROCAM-Studie bei einem follow-up von zwei Jahren lag das relative Risiko der Patienten mit einem HDL-C < 35 mg/dl bei 6,1, bei Studien mit längerem follow-up lag es jedoch nur bei 2,1 bis 2,7.

Insgesamt steht ein niedriges HDL-C nicht unbedingt für ein defektes antiatherogenes Reparatursystem und therapeutisch induzierte Änderungen führen nicht zwangsweise zu den erwarteten Änderungen des klinischen Ergebnisses, jedoch wird die Beeinflussung des HDL-Stoffwechsels und des Reversen Cholesterintransports als wichtiger Ansatzpunkt für die medikamentöse Therapie der Arteriosklerose angesehen.

1.2.2 Genese der Arteriosklerose (17)

Arteriosklerotische Gefäßveränderungen manifestieren sich an der Arterienwand zunächst als sog. *fatty streaks*. Sie entstehen durch die Aktivierung von Makrophagen im subendothelialen Raum infolge der Aufnahme von oxidativ oder enzymatisch modifiziertem LDL. Während LDL im Blutplasma relativ gut vor Oxidation geschützt ist, findet diese in der Arterienwand in stärkerem Ausmaß statt, was zunächst zu minimalen Veränderungen (mmLDL), später zur starken Oxidation des LDL (oxLDL) führt.

Modifiziertes LDL wird von Makrophagen nicht durch LDL-Rezeptoren, sondern durch Scavenger-Rezeptoren aufgenommen. Dieser Vorgang unterliegt wie bereits erwähnt keiner Regulierung durch den intrazellulären Cholesteringehalt. Es spielen offenbar vor allem Scavenger Rezeptor A (SR-A) und CD36 eine übergeordnete Rolle. Die Erkennung der oxLDL wird wahrscheinlich sowohl über oxidierte Phospholipide in der Lipidphase, als auch über kovalent modifiziertes Apo-B vermittelt.

Zunächst führt die Anwesenheit von proinflammativ wirkendem oxLDL zu einer Rekrutierung von Blutmonozyten aus dem Gefäßlumen in die Gefäßwand, die dann zu Makrophagen differenzieren. Dieser Vorgang wird durch reaktiv exprimierte Zelladhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der Gefäßendothelzellen vermittelt, im einzelnen E-Selectin, P-Selectin und ICAM-1, wahrscheinlich auch VCAM-1. Des Weiteren wirkt oxLDL direkt chemotaktisch auf Monozyten und führt außerdem zur Expression von chemotaktischen Molekülen durch Endothelzellen, wie z.B. dem *monocyte chemotactic protein* MCP-1. Dieses wird auf den Monozyten vom Rezeptor CCR2 erkannt, dessen Expression durch Hypercholesterinämie stimuliert wird. Auch das in arterioskleroti-

schen Läsionen nachgewiesene Interleukin-8 könnte eine Rolle spielen, da das Fehlen von CXCR2, einem hochaffinen Rezeptor für IL-8 im Tiermodell zu einer signifikant geringeren Arterioskleroseentwicklung führte.

Die Rekrutierung von Monozyten und Differenzierung zu aktiven Makrophagen hat anfänglich eine Elimination des zytotoxischen und proinflammativen oxLDL aus der Arterienwand zur Folge und ist als eine Körperreaktion zum Schutz des Gefäßes zu werten. Bemerkenswerterweise führt jedoch gerade die Ansammlung von Makrophagen und übermäßige Aufnahme von oxLDL zur Entstehung arteriosklerotischer Läsionen. Die mit Cholesterin überladenen Makrophagen entwickeln sich zu „Schaumzellen“, die große Tröpfchen von Cholesterinestern enthalten. Zwar hemmt eine Membraneinlagerung von überschüssigem Cholesterin die proteolytische Aktivierung von SREBP- (*sterol regulatory element binding protein*) Transkriptionsfaktoren, was zu einer verminderten Expression an LDL-Rezeptoren und cholesterinsynthetisierenden Enzymen führt, jedoch bleibt die oxLDL-Aufnahme über Scavenger-Rezeptoren dadurch unbeeinflusst. Somit wird die HDL-vermittelte Cholesterinabgabe, also der Reverse Cholesterintransport zu einem wichtigen Vorgang für das Cholesteringleichgewicht in Makrophagen.

Mit fortschreitender Schaumzellbildung wandern glatte Muskelzellen aus der Gefäßmedia in die Intima ein. Sie proliferieren und beteiligen sich an der Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen. Die aktivierten Muskelzellen produzieren extrazelluläre Matrixproteine, so daß sich eine fibröse Kappe auf den Läsionen bilden kann.

Die Gefäßläsion entwickelt nun immer mehr Merkmale einer chronischen Entzündungsreaktion. Es lassen sich aktivierte zytokinproduzierende T-Lymphozyten beobachten. Makrophagen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen exprimieren MHC II-Moleküle, TNF α , IL-6, MCP-1 und andere Entzündungsmediatoren. Jedoch scheinen Lymphozyten nicht zwingend für die Entstehung der Läsionen notwendig zu sein, da Mäuse mit fehlenden B- und T-Lymphozyten bei cholesterinreicher Diät Arteriosklerose in unverändertem Ausmaß entwickelten, bei normaler Diät zeigte sich jedoch eine Reduktion der Läsionen, so daß angenommen werden muß, daß Lymphozyten modulierend in die Plaqueeinstellung eingreifen.

1.3 Antiatherogene Eigenschaften von HDL (68, 43)

High Density Lipoproteine, im Volksmund allgemein mit dem Begriff „das gute Cholesterin“ tituiert, wirken mit ihren zahlreichen antiatherogenen Eigenschaften den proatherogenen Wirkungen der Low Density Lipoproteine („dem schlechten Cholesterin“) entgegen. Ein großer Teil dieser antiatherogenen Effekte wird in der Gefäßwand vermittelt, wo arteriosklerotische Läsionen ihren Ursprung nehmen.

Das wohl meistuntersuchte und -propagierte Konzept zur antiatherogenen Wirkung der HDL ist der Reverse Cholesterintransport, d.h. der Transport des Cholesterins von den peripheren Geweben – in diesem Fall der Gefäßwand – zur Leber und den steroidogenen Geweben, wo es wie zuvor erwähnt zur Synthese von Gallensäuren, Lipoproteinen, Vitamin D und Steroidhormonen genutzt wird (siehe 1.1.4 und 1.3.1).

1.3.1 Zellulärer Cholesterinefflux (68)

Cholesterinefflux ist das Resultat sowohl unspezifischer passiver, als auch spezifischer aktiver Prozesse. Die unspezifische und passive Komponente beruht auf der Diffusion von Cholesterin durch die wäßrige Phase auf die Akzeptormoleküle und verursacht einen langsamen und nicht sättigbaren Cholesterinefflux aus allen Zelltypen. Sie findet sowohl in Anwesenheit unspezifischer Akzeptoren, wie z.B. Phospholipidvesikeln, als auch spezifischer Akzeptoren, wie Apolipoproteinen und HDL statt. Dieser Vorgang beinhaltet keine spezifischen Interaktionen mit Zelloberflächenrezeptoren oder spezifische Aktivierung von zellulären Transportprozessen. Obwohl der Verlust von Cholesterin aus der Plasmamembran ausgeglichen werden kann, so hat er doch einen geringen Effekt auf die Menge der intrazellulär gespeicherten Cholesterylester.

Im Gegensatz dazu verursachen lipidfreie Apolipoproteine wie z.B. ApoAI, ApoAII, ApoAIV, ApoC, ApoE und sogar amphiphatische synthetische Peptide einen Efflux von Phospholipiden und Cholesterin, der schnell, sättigbar, unidirektional, unabhängig von der LCAT und effizient bezüglich der Reduktion der intrazellulären Cholesterylester ist. Dem Cholesterinefflux scheint der Phospholipidefflux voranzugehen. Als Ergebnis produziert der apolipoproteinvermittelte Lipidefflux HDL-artige Lipoproteine mit elektrophoretischer prä- β und prä- α Mobilität. Darüber hinaus wird der von lipidfreien Apolipoproteinen vermittelte Phospholipid- und Cholesterinefflux durch niedrige Temperatur, partielle Proteolyse von Zellmembranen oder durch Interferenz mit der regulä-

ren Funktion des Golgi-Apparates und des vesikulären Transports gehemmt (z.B. durch Monensin oder Brefeldin A) und ist zellartspezifisch. Es wird vermutet, daß ApoAI an einen signaltransduzierenden Oberflächenrezeptor bindet, und daß dies die Translokation von Cholesterin von intrazellulären Kompartimenten zur Plasmamembran erleichtert. Die Natur dieses Rezeptors ist unbekannt.

Da der Cholesterinefflux aus Zellen von Patienten mit Tangier Disease, der ein Defekt des ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) zugrunde liegt, gestört ist und dies zur Abwesenheit von lipidreichem α -HDL im Plasma führt, ist es wahrscheinlich, daß ABCA1 eine wichtige Rolle im apolipoproteinvermittelten Stoffwechsel spielt. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, daß sich der Apolipoproteinvermittelte Cholesterinefflux durch Hemmung von ABCA1 mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden oder anderen Pharmaka vermindern läßt und durch Überexpression von ABCA1 gesteigert wird. Eng mit dem Cholesterinefflux verknüpft ist ein ABCA1-vermittelter Phospholipidefflux. (62) Der Mechanismus, über den ABCA1 den Phospholipid- und Cholesterinefflux vermittelt, ist bislang nicht aufgeklärt. Neuere Studien legen eine Beteiligung am intrazellulären Lipidtransport nahe. (21) Weil ABCA1 in vielen Zellen inklusive Hepatozyten und Enterozyten exprimiert wird, spielt dieses Protein wahrscheinlich nicht nur im Lipidefflux eine wichtige Rolle, sondern auch bei der hepatischen und intestinalen Entstehung von HDL.

HDL-vermittelter Cholesterinefflux teilt einige Eigenschaften des durch lipidfreie Apolipoproteine vermittelten Cholesterinefflux. Native und rekonstituierte lipidreiche HDL induzieren spezifische und unspezifische Formen des Cholesterinefflux. Veresterung des vom HDL aufgenommenen Cholesterins durch die LCAT verhindert seine Rediffusion zurück zur Plasmamembran und vermehrt somit den netto-Cholesterinefflux. Die Expression von SR-BI verstärkt den HDL-vermittelten Cholesterinefflux; die Bindung an CD36, ein weiterer HDL-bindender Scavenger-Rezeptor, vermag dies nicht. Aus diesem Grund wurde vermutet, daß die Bindung von HDL an SR-B1 den bidirektionalen Fluß zwischen HDL und Plasmamembran durch Reorganisation der Lipide in den cholesterin- und caveolaereichen Domänen der Plasmamembran erleichtert. In Anwesenheit von HDL werden intrazellulär gespeicherte Cholesterylester entfernt. Nach Inkubation lipidangereicherter Zellen mit Brefeldin A oder dem PKC-Hemmstoff Sphingosin wird der HDL-vermittelte Cholesterinefflux um ca. 50% gedrosselt.

Es ist nicht bekannt, ob die Lipidation der HDL intrazellulär, extrazellulär oder an beiden Orten erfolgt. Zum einen wurde gezeigt, daß lipidfreie Apolipoproteine Phospholipid- und Cholesterinefflux von zahlreichen Zellen inklusive Hepatozyten und Makrophagen induzieren, was einen extrazellulären Prozeß nahelegt. Zum anderen wurde gezeigt, daß Makrophagen, Leberzellen und Fibroblasten lipidfreie Apolipoproteine, HDL und Chylomikronenremnants in clathrinummantelte Endosomen internalisieren und lipidierte Apolipoproteine resezernieren. Dieser Prozeß wurde Retroendozytose genannt, auch er soll bei der Tangier Disease defekt sein.

1.3.2 Antioxidative Eigenschaften von HDL

In den letzten Jahren mehrten sich jedoch Untersuchungen, die von weiteren antiatherogenen Eigenschaften dieser Lipoproteine berichteten. Einige dieser sogenannten pleiotopen Effekte sind jedoch zum Teil noch umstritten.

Die Anwesenheit von HDL in der Gefäßwand hemmt die Oxidation der Low Density Lipoproteine, die als erster Schritt der Genese arteriosklerotischer Läsionen angesehen wird. Zusätzlich ist HDL in der Lage, einige Produkte der schon stattgefundenen LDL-Oxidation zu binden und zum weiteren Abbau zur Leber zu transportieren. HDL beinhaltet viele Antioxidanzien; beispielsweise besitzt ApoAI antioxidative Eigenschaften. Eine wesentliche Rolle spielt die Paraoxonase, ein HDL-gebundenes Enzym, welches die Hydrolyse von aromatischen Carbonsäuren katalysiert. Sie führt zur Verarmung der LDL an oxidierten Phospholipiden, die sonst die Zytokinproduktion stimulieren und Monozytenadhäsion auf Endothelzellen induzieren. Auch schützt die Paraoxonase HDL vor Oxidation, durch die es seine Fähigkeit zur Induktion des zellulären Cholesterineffluxes und seine plättchenaggregationsmindernden Eigenschaften verlieren würde.

1.3.3 Adhäsionsmindernde Eigenschaften von HDL

HDL übt hemmenden Einfluß auf Monozytenchemotaxis und Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel aus. Dieser Adhäsionsvorgang wird von Oberflächenproteinen der Endothelzellen vermittelt, wie z.B. dem *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), dem *intracellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1) und E-Selectin. Diese drei Zelladhäsionsmoleküle werden in arteriosklerotischen Läsionen im Überschuß gebildet, induziert durch oxLDL oder Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und TNF- α . In Gegen-

wart von HDL wird die Expression dieser Moleküle wesentlich reduziert, mit der größten Wirkung im Bereich der physiologischen HDL-Konzentration. Die Ursachen dieser Beobachtung sind bislang nicht hinreichend erklärt. Der hemmende Effekt auf die E-Selektinproduktion beruht jedoch wahrscheinlich auf einer Hemmung der TNF- α -stimulierten Sphingosinkinase und führt damit zu verminderter Bildung von Sphingosin-1-Phosphat, einem Induktor von E-Selektin.

1.3.4 Endotheliale Funktion, Mitogenität und Zytoprotektion

Das Endothel sezerniert eine Reihe von humoralen Faktoren, die die Gefäßweite (z.B. NO), Plättchenaktivierung, Blutgerinnung, Fibrinolyse und die Proliferation bzw. Differenzierung von glatten Muskelzellen modulieren. Störungen dieser Funktionen können zu intravasaler Gerinnung und verstärkter Makrophageneinwanderung in die Gefäßwand führen und sind eines der ersten Anzeichen der Genese arteriosklerotischer Gefäßveränderungen. Diese endotheliale Dysfunktion tritt gehäuft bei Fettstoffwechselstörungen auf, die mit erniedrigtem HDL einhergehen.

Auch vermag HDL die sekretorischen Leistungen des Endothels zu fördern. Es stimuliert die Synthese des stark vasodilatativ wirkenden Prostacyclin (PGI₂) zum einen durch vermehrte Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2), dem Schlüsselenzym für die Synthese von Prostanoiden in Endothelzellen, zum anderen durch Bereitstellung von Arachidonsäure, dem Substrat der COX-2. (44) Auch wird die hemmende Wirkung von oxLDL auf Synthese des Natriuretischen Peptid C (CNP) in Endothelzellen nivelliert, welches vasodilatativ wirkt und die Proliferation von glatten Muskelzellen hemmt. (64)

In einigen Studien stimulierte HDL die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen in Anwesenheit anderer Mitogene, wie dem *platelet-derived growth factor* (PDGF), dem *epithelial growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF), Insulin oder Transferrin. HDL aktiviert diverse Signaltransduktionskaskaden, die zu einer Zunahme der beobachteten Mitosen führen. Einige dieser Eigenschaften werden ApoAI zugeschrieben, jedoch kommen auch HDL-assoziierte Lipide in Betracht. Auch wenn der Proliferation von glatten Muskelzellen eine eher schädliche Rolle in der Genese der Arteriosklerose zugeschrieben wird, so darf nicht übersehen werden, daß die mitogene Wirkung des HDL erst bei supraphysiologische Konzentrationen einsetzt. Somit dürfte dieser Effekt bei intakter Endothelbarriere keine Rolle spielen, sondern eher in schon

entstandenen arteriosklerotischen Läsionen, in denen HDL vermehrt in die Gefäßwand eindringt und über die Induktion der Zellteilung für eine Stabilisierung der schon vorhandenen Plaques sorgen könnte.

HDL und ApoAI sind in der Lage, oxLDL-induzierte Apoptose von Endothelzellen zu verhindern. Für diesen Effekt sind Lysophospholipide verantwortlich, wie z.B. Sphingosin-1-Phosphat. Schützenden Einfluß übt HDL auch in Gegenwart von Remnants triglyceridreicher Lipoproteine aus, die ihrerseits ebenso Apoptose induzieren.

Auch Zellschädigungen durch eine Aktivierung des Komplementsystems, werden in Anwesenheit von HDL gemindert. Die vorhandene Menge des terminalen C5a-C9 Komplexes war invers korreliert mit der Konzentration an HDL-Cholesterin. Offenbar scheint auch diese Eigenschaft der HDL an die Anwesenheit von Lipoproteinen, vornehmlich ApoAI geknüpft zu sein. Diese sind in der Lage, Komplementfaktor C9 zu binden und auf diese Weise zu hemmen. Des weiteren trägt HDL das Glykoprotein Protectin (CD95), welches die zytolytische Aktivität des Komplementsystems hemmt.

1.3.5 Hemmung der Gerinnung und Plättchenaktivierung

Auch die Aktivität des Gerinnungssystems wird in Anwesenheit von HDL moduliert. Es wurde in diversen Studien gezeigt, daß Entgleisungen des Gleichgewichts zwischen Koagulation und Fibrinolyse fördernd auf die Atherogenese wirken. (43) Sowohl HDL, als auch ApoAI hemmen die Aktivierung des Gerinnungsfaktors X und führen so zu verminderter Bildung von Prothrombinase (dem Komplex aus den Faktoren Va, Xa, II, Phospholipiden und Kalziumionen) und deshalb zu einer Hemmung der humoralen Gerinnung. Zusätzlich wird die Koagulation vermindert durch HDL-vermittelte Stimulation der Synthese der Proteine C und S. Aktiviertes Protein C (APC) hemmt auf proteolytischem Weg Faktor Va und VIIIa; dieser antikoagulatorische Effekt wird durch Protein S verstärkt.

Des weiteren ist HDL ein Hemmstoff der Plättchenaktivierung. Ein niedriges HDL-C ist ein Prediktor für die akute plättchenvermittelte Thrombusbildung. In vitro hemmt HDL thrombin-, kollagen-, ADP- und adrenalininduzierte Plättchenaggregation und die thrombininduzierte Bindung von Fibrin an die Blutplättchen. Im letzten Fall wirkt HDL als endogener Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonist.

1.4 Transendothelialer HDL-Transport

ApoAI und HDL vermitteln einen großen Teil ihrer antiatherogenen Eigenschaften durch Interaktion mit extraluminale Zellen und Partikeln. Apolipoprotein AI kann in nicht unerheblicher Konzentration in der interstitiellen Flüssigkeit der menschlichen Aorta nachgewiesen werden. (28) Auch HDL findet sich in interstitieller Flüssigkeit, so z.B. in der Flüssigkeit präovulatorischer menschlicher Follikel. (24) Die Lipidzusammensetzung und fraktionelle Verteilung im Vergleich zum Plasma-HDL ist jedoch verändert. (3, 40)

Schließlich konnten auch in pränodaler Lymphe (als Modell für interstitielle Flüssigkeit) Prä- β -HDL und größere α -HDL gefunden werden. (3, 40) Relativ zum Plasma überwiegen in dieser interstitiellen und extravasalen Flüssigkeit die kleinen Prä- β -HDL Partikel gegenüber den großen und reifen α -HDL. Es ist somit denkbar, daß kleine Prä- β -HDL aus dem Plasma ins Interstitium übertreten, wo sie durch Lipidefflux zu größeren HDL reifen.

Sowohl in Tiermodellen, als auch bei menschlichen Probanden konnte eine Abhängigkeit zwischen der Lipoproteinkonzentration im Plasma und der Stärke ihrer Aufnahme in die Gefäßwand beobachtet werden. (45)

Endothelzellen menschlicher Gefäße werden durch Gap- und Tightjunctions zu einer dichten und undurchdringlichen Zellschicht verbunden. Aus diesem Grunde geht ein gängiges Modell davon aus, daß HDL durch defekte Endothelbereiche in die Gefäßwand eindringt. (41, 45) Faktoren, die die Gefäßwandpermeabilität für Lipoproteine erhöhen, sind beispielsweise arteriosklerotische Läsionen, mechanische Gefäßschäden und verminderte Anwesenheit von Stickstoffmonoxyd. (45)

Viele Makromoleküle werden durch intrazelluläre bzw. transzelluläre Transportsysteme durch Endothelzellen aus dem Gefäßlumen in dessen Wand transportiert, (39, 61) so daß dieser Transportweg auch für HDL oder dessen Bestandteile denkbar ist. Diese Möglichkeit wurde bislang jedoch noch nicht nachgewiesen. Der transzelluläre Transportweg ist auch für andere Makromoleküle, wie z.B. Albumin noch nicht vollständig charakterisiert. Grundlegend ist denkbar, daß sich entweder große Poren oder Kanäle durch die Zellen bilden, die durch temporäre Verschmelzung von Vesikeln entstehen, oder daß eine Transzytose stattfindet. Hieran könnten sowohl clathrinummantelte Vesikel als auch Caveolae beteiligt sein.

1.5 Fragestellung

Die Tatsache, daß HDL in nicht unerheblicher Konzentration in der Gefäßwand vorliegt und dort einen wesentlichen Teil seiner antiatherogenen Eigenschaften vermittelt, wirft zwangsläufig die Frage auf, welche Mechanismen an seinem Transport durch das Endothel beteiligt sind. Außer einem passiven Lipoproteinfluß durch defekte Endothelbereiche ist, analog zu anderen Makromolekülen wie beispielsweise Albumin, ein aktiver und spezifischer Transport durch die Zellen denkbar.

Zur Untersuchung dieser These führten wir Aufnahme- und Resekretionsstudien mit Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) durch. Wir verwendeten hierzu lipidfreies ApoAI, welches wir aus folgenden Gründen auswählten: Das gängige Modell zur HDL-Entstehung geht von einer Bildung aus lipidfreiem ApoAI aus, indem es Phospholipide von Endothelzellen und glatten Muskelzellen aufnimmt. Dieser Schritt ist somit der Startpunkt des reversen Cholesterintransports. (47, 68) ApoAI wird ständig durch LPL-vermittelte Lipolyse aus triglyceridreichen Lipoproteinen und Interkonversion aus anderen HDL-Subklassen mit Hilfe von Lipid-Transferproteinen, hepatischer Lipase und endothelialer Lipase freigesetzt. (49, 53, 68) Insgesamt ist die relative Konzentration der lipidarmen sogenannten prä- β_1 -LpAI sowohl in der intimalen Flüssigkeit der Arterien als auch in der Lymphe größer als die der reifen HDL-Partikel. (3, 24, 28, 40)

Zur quantitativen Untersuchung seiner Zellossoziation und -dissoziation wurde fluoreszenzmarkiertes ApoAI verwendet, dessen Kinetik mit fluoreszenzphotometrischen Methoden nachvollzogen wurde. Eine morphologische Untersuchung des Vorgangs führten wir mit goldmarkiertem ApoAI durch, welches als elektronenmikroskopisch sichtbarer Marker diente. Um Rückschlüsse auf beteiligte Zellkompartimente und Proteine zu ziehen, beeinflussten wir deren Funktion auf pharmakologischem Wege und untersuchten den Effekt auf das Ausmaß der ApoAI-Zellossoziation und -dissoziation.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 2.1 Rohmaterialien und Apparaturen

Name	Quelle
1,2-Propandiol	Sigma P4347
Ablegeschale, weiß	PromoCell
Acetonitril	Baker, Griesheim, BRD
Acrylamid/Bis-Acrylamid 30%	Sigma A3699
Albumin, bovine, fraction V powder, fatty acid free; low endotoxin	Sigma A8806
Ammoniumperoxydisulfat	Aldrich 215589
Anti-Rabbit IgG vom Kaninchen	DAKO
Anti-Apolipoprotein AI IgG human (Rabbit)	DAKO
chloroauric acid solution	Aldrich 254169
Bromphenolblau	Sigma B0126
Chloronaphthol	Merck 111952
Dialysesschläuche(Molekularmassenausschlußgrenze:12000 D)	Sigma D6066
Diethylether	Baker
DMSO	Sigma D8418
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline(1x)with Ca ²⁺ and Mg ²⁺	Dulbecco
EDTA	Sigma E6758
Elektrophoresekammer: Wide Minisub CELL GT	BioRAD
Endothelial Cell Growth Medium, 500 ml	PromoCell
Essigsäureanhydrid	Sigma A6404
Ethanol	Merck
Ether	Merck
F-2000 Fluoreszenzspektrophotometer	Hitachi
FCS, 30 ml	PromoCell
Fluorescein Labeling Kit	Roche
Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz	Sigma F9252
Formaldehyd	Sigma F1635
FPLC-Anlage mit folgenden Einzelkomponenten: Pumpensystem mit zwei über einen Controller steuerbaren Pumpen, MonoQ-Anionenaustauschersäule (Säulenvolumen 1 ml), Photomeßzelle, xy-Schreiber, Ausgabeventil mit Proben-schleife und automatischem Probensammer	Pharmacia (Freiburg, BRD)
Gefäßklemmen	PromoCell
Gelatin Type III	Sigma
Glycerin	Sigma G5150
Goldsuspension, Partikelgröße: 12 nm	Freundliches Geschenk von Herrn Dr. Völker, Institut für Ultrastrukturfor-schung, Universität Münster
Harnstoff	Sigma U4128
HBSS 0,03% EDTA, 125 ml	PromoCell
HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,2)	Sigma H3787
HPLC-Anlage mit folgenden Einzelkomponenten: zwei Pumpen, beheizbare Säuleneinheit, Diodenarraydetektor, automati-schem Probensammler, xy-Schreiber	LKB-Pharmacia (Bromma, Schweden)
HPLC reversed-phase Protein C4-Säule	Vydag, Hesperia, USA
Hydrochinon	Sigma H9003
Kaliumbromid, kristallin	Sigma P9881
Kanüle, Farbcode=lila, abgesägt und geschliffen	PromoCell

Name	Quelle
Kanülenverschlußstopfen, rot	PromoCell
Kupfersulfatlösung, 1% (w/v)	Aldrich 510653
β-Mercaptoethanol	Fluka 63689
Magermilchpulver	Fluka 70166
Multiwell-6-Zellkulturschalen	Falcon
Nabelschnüre	Geschenk d. Hebammen d. Raphaelsklinik, MS und Städtischen Kliniken, DO
Natriumacetat	Sigma S8750
Natriumcarbonatlösung, alkalisch, 2% (w/v)	Sigma S7759
Natriumchlorid	Sigma S6191
Natriumhydroxyd	Sigma S5881
Netzteil 2301 Macrodrive 1 Power Supply	LKB Bromma
Novablot Electrophoretic Transfer Kit (2117-250)	LKB Bromma
Petrischalen 100 mm und 150 mm	PromoCell
Petrischalen 35 mm	Falcon
Photometer: Ultraspec III	Pharmacia
Plasma normolipidämischer Spender	Z. f. Transfusionsmed. WWU Münster
Plastikpipetten 10 ml	PromoCell
Schneidegerät	Beckman, München, BRD
SDS	Sigma L6026
Silbernitrat	Fluka 85230
Skalpelle	PromoCell
Spritzen 10 ml	PromoCell
Sucrose	Sigma S9378
TEMED	Sigma T7024
TI70 Rotor	Beckman, München, BRD
TNF-β	R&D-Systems
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka 91732
Tris-HCl	Sigma T5941
Trypsin/EDTA (0,04%/0,03%), 30 ml in PBS	PromoCell
Trypsinstammlösung (2,5%), 2 ml	PromoCell
Tween	Sigma P5927
Ultrazentrifuge L7-65	Beckman, München, BRD
Wasser (destilliert)	Fluka 17749
Wasser (endotoxinfrei und destilliert)	Sigma G9382
Wasser für die HPLC	Baker, Griesheim, BRD
Wasserstoffperoxyd	Fluka 95299
Zentrifugationsröhrchen (HDL-Isolation)	Beckman, München, BRD
Zentrifugenröhrchen 10 ml und 50 ml	PromoCell
Zitronensäure Monohydrat	Sigma C7129
Zitronensäure Trinatriumsalz	Sigma C3674

Tabelle 2.2 Lösungen

Gelatine für Lichtmikroskopie
2%ige Lösung aus Gelatine Type III in Wasser (endotoxinfrei und destilliert). Die Gelatinelösung wird zur Beschichtung erwärmt, in die gewünschte Form gegossen und wieder abpipettiert. Sie trocknet in 15 Minuten unter dem Abzug.

FPLC-Puffer (zur HDL Delipidierung)

1,82 g Tris
0,58 g NaCl
300,3 g Harnstoff
ad 1 Liter Aqua destillata
pH-Einstellung mit HCl auf 7,2

<p>Puffer A (für HPLC, zur ApoAI-Isolation) 1,82 g Tris 0,58 g NaCl 300,3 g Harnstoff ad 1 Liter Aqua destillata pH-Einstellung mit HCl auf 7,2</p>
<p>Puffer B (für HPLC, zur ApoAI-Isolation) 1,82 g Tris 58,44 g NaCl 300,3 g Harnstoff ad 1 Liter Aqua destillata pH-Einstellung mit HCl auf 7,2</p>
<p>Lösungsmittel A (für HPLC, zur ApoAI-Isolation) Wasser für die HPLC 1 Promille (v/v) Trifluoressigsäure (TFA)</p>
<p>Lösungsmittel B (für HPLC, zur ApoAI-Isolation) Acetonitril (am Photometer bei 215 nm mit Trifluoressigsäure auf eine Extinktion von null angeglichen)</p>
<p>Elektrophoresepuffer (für SDS-Page) 6g Tris 28,8 g Glycerin 2 g SDS ad zwei Liter Aqua destillata</p>
<p>Probenpuffer (für SDS-PAGE) 4 ml Aqua destillata 1 ml 0,5 M Tris / HCl pH 6,8 0,8 ml 80% Glycerin 1,6 ml 10% SDS 0,4 ml β-Mercaptoethanol 0,2 ml gesättigte Bromphenolblaulösung</p>
<p>Trenngel 5% 2,2 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid 30% 1,6 ml 1,5M Tris/HCl pH 8,8 1,3 ml 10% SDS 300 μl 1,5 % Ammoniumperoxidisulphat 10 μl Temed</p>
<p>Trenngel 20% 8,7 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid 30% 1,6 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 130 μl 10% SDS 2 g Sucrose 300 μl 1,5 % Ammoniumperoxidisulphat 10 μl Temed</p>
<p>Sammelgel 1066 μl Acrylamid/Bis-Acrylamid 30% 6,94 ml 1,5M Tris/HCl pH 6,8 40 μl 10 % Ammoniumperoxidisulphat 8 μl Temed</p>
<p>Transfer-Puffer (für Western Blot) 2,8 g Glycin 1,6 g Tris 0,74 g SDS 0,2 l Ethanol 1,8 l Aqua destillata</p>

TBST-Puffer (für Western Blot) 43,8 g NaCl 30,0 g Tris 5 ml Tween ad 5 l Aqua destillata Einstellung mit HCl auf pH 7,5
Entwicklerlösung (für Western Blot) 500µl Tris/HCl (24,2g/100ml) pH8,2 ad 50ml Aqua destillata, 10ml Chloronaphthollösung (1,5 mg/ml in Methanol) 20µl 30%ige Wasserstoffperoxidlösung
Silber-Lösung (für Silberentwicklung) 1,5 g Silbernitrat ad 900 ml Aqua destillata 100 ml 1,2-Propandiol hinzugefügen, Lagerung bei 4°C in Dunkelheit
Entwickler-Lösung (für Silberentwicklung) 1 Liter 0,1 M Citrat-Puffer, pH 4,5: 0,1 M Zitronensäure Monohydrat, 0,1 M Zitronensäure Trisodium-Salz, Zugabe von 0,1 % Formaldehyd. 4 g Hydrochinon 200 ml 1,2-Propandiol Lagerung bei 4°C in Dunkelheit

Tabelle 2.3 Pharmaka

Substanz	Quelle	Konzentration	Löslichkeitsvermittler	Wirkung
RO318220	CALBIOCHEM 557520	1 µM; 5 µM; 10 µM; 15 µM; 20 µM; 50 µM	DMSO, 1 Promille	Aktivator der Proteinkinase C (PKC)
MnCl	Aldrich 244589	1 mM	Nein	Bivalente Kationen
Nickel	Sigma N5756	0,1 µM; 0,5 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM	Nein	
EGTA	Sigma E3889	10 µM; 20 µM; 50 µM; 100 µM; 500 µM; 1 mM	Nein	Ca ²⁺ -Chelator
Testosteron	Sigma T5035	10 ng/ml; 100 ng/ml	Nein	Modulation der Proteinexpression
Östradiol	Sigma E4389	100 pg/ml; 1000 pg/ml; 1000 ng/ml	Nein	
HDL ₃	Human	2,5 mg/ml	Nein	Kompetitive Hemmung / Blockade von Rezeptoren
LDL	Human	2,5 mg/ml	Nein	
Acyl-LDL	Human (modifiziert)	2,5 mg/ml	Nein	
RAP	Freundliches Geschenk von Herrn Dr. Merkel (UKE Hamburg, Medizinische Klinik und Poliklinik)	2,5 mg/ml	Nein	

2.2. Gewinnung und Kultur humaner Endothelzellen

2.2.1 Gewinnung von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (48)

Die von uns verwendete Methode entstammt mit leichten Modifikationen der Anleitung der Firma PromoCell. Die Nabelschnur wurde in sterilem PBS mit Kalzium und Magnesium bei 4°C transportiert. Sie ist in diesem Zustand ca. 24 Stunden haltbar.

Zunächst wurde eine Verdauung angefertigt, indem ein Milliliter der Trypsinstamm-
lösung (2,5%) mit neun Millilitern HBSS 0,03% EDTA gemischt wurde. Die Nabel-
schnur wurde mit 70% Ethanol vorsichtig abgewischt und übriggebliebenes Blut
herausgedrückt. Ein Ende wurde scharf abgeschnitten, die Vene etwas geweitet und ein
Katheter eingeführt und mit Kabelbinder fixiert. Zunächst wurde die Vene mit HBSS
0,03% EDTA gespült, bis alles Blut aus ihr entfernt war; nachfolgend wurde an der an-
deren Seite ein zweiter Katheter angebracht und die Vene erneut mit HBSS 0,03% ED-
TA gespült, um zu überprüfen, ob sie durchgängig und ohne Leck war. Die Nabelschnur
wurde über den Katheter mit fünf Millilitern Verdauung durchgespült. Danach wurde
die Kanüle am anderen Ende der Nabelschnur mit einem Stopfen verschlossen. Es wur-
den zusätzlich ca. 0,5 Milliliter Verdauung eingefüllt, so daß die Vene leicht ge-
spannt war. Die Nabelschnur wurde dann in einer oben offenen Petrischale für 30
Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die U-förmig gehaltene Nabel-
schnur vorsichtig massiert und ihre Enden abwechselnd auf- und abbewegt. Ihr Inhalt
wurde in ein 50 Milliliter Röhrchen entleert, anschließend spülten wir die Vene noch
mit fünf Millilitern HBSS 0,03% EDTA durch. Dem Röhrchen wurde sofort die gleiche
Menge Serum zugegeben, um das Trypsin zu inaktivieren.

Die Zellen wurden in Petrischalen mit 150 mm Durchmesser, die vorher dünn mit Gela-
tine (2% in endotoxinfreiem Wasser) beschichtet wurden, mit einer Dichte von 5000
Zellen/cm² ausgesät. Es wurden zwei Milliliter Fetal Calf Serum (FCS) in jedes Schäl-
chen zugefügt, so daß eine Serum-Endkonzentration von 10% entstand. Zur Verteilung
der Zellen wurden die Schalen kreisend bewegt. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert,
bis sie zu 90% konfluent gewachsen waren. Das Zellkulturmedium wurde das erste Mal
nach zwei Tagen gewechselt.

2.2.2 Passage und Kultur der Endothelzellen

Das Medium wurde aus den 150 mm Zellkulturschalen abgesaugt und die Zellen mit 25 Milliliter HBSS für eine Minute gewaschen. Nach erneutem Absaugen wurden vier Milliliter Trypsin/EDTA hinzugefügt und für eine Minute einwirken gelassen, die Flüssigkeit wurde dann bis auf einen Film abgesaugt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde abgewartet, bis sich unter seitlichem Klopfen gegen die Schale ca. 90% der Zellen abgelöst hatten. Anschließend wurden fünf Milliliter Endothelial Cell Growth Medium hinzugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Absaugen die Zellen darin aufgenommen. In einem 50 Milliliter Röhrchen wurde die Suspension aller Schälchen gesammelt. Es wurde bei 900 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellplättchen in einem Milliliter Endothelial Cell Growth Medium aufgenommen.

Die Zellen wurden wieder in 150 mm Petrischalen, die vorher dünn mit Gelatine beschichtet wurden (siehe oben), mit einer Dichte von 5000 Zellen/cm² ausgesät, mit einer Serum-Endkonzentration von 10% im Endothelial Cell Growth Medium. Sie wurden bei 37 °C inkubiert, bis sie zu 90% konfluent gewachsen waren, das Zellkulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt.

Die Endothelzellen wurden für unsere Experimente wie oben beschrieben abgelöst und unter jeweils zwei Millilitern Zellkulturmedium in Multiwell-6-Zellkulturschalen (für die Fluoreszenzexperimente) bzw. in 35 mm Einzelpetrischalen (vor allem für die morphologischen Experimente) in einer Dichte von 5000 Zellen/cm² inkubiert, bis sie zu 90% konfluent gewachsen waren. Auch hier wurde der Boden der Schalen vorher mit einer dünnen Schicht Gelatine beschichtet (siehe oben). Die Zellen wurden über Nacht (für ca. 16 Stunden) mit FCS-freiem Medium inkubiert, um ihre endozytische Aktivität zu steigern. Für einige Experimente wurden die Zellen über Nacht mit TNF- α in einer Endkonzentration von 5 ng/ml vorinkubiert.

Es wurden bis zu neun Passagen alte Zellen für die Experimente verwendet; die überwiegende Zahl der Experimente wurde mit vier bis fünf Passagen alten Zellen durchgeführt.

2.3 Präparation und Modifikation von Lipoproteinen

2.3.1 Isolation der Low Density Lipoproteine (LDL) und High Density Lipoproteine (HDL) aus Blutplasma durch sequentielle Ultrazentrifugation (20, 38)

Die in den Experimenten verwendeten Lipoproteine HDL und LDL wurden durch sequenzielle Ultrazentrifugation aus dem Plasma normolipidämischer Spender gewonnen. Zu diesem Zweck wurde eine Technik angewandt, die auf die Arbeitsgruppe Havel et al. zurückgeht. Grundlage dieses Trennverfahrens ist die Tatsache, daß sich die unterschiedlich dichten Lipoproteinfraktionen durch Zentrifugation voneinander trennen lassen.

Für den ersten Zentrifugationsschritt, in dem Chylomikronen, VLDL und IDL abgetrennt wurden, wurde das Plasma nach untenstehender Formel (Abbildung 2.1) mit kristallinem Kaliumbromid auf eine Dichte $\rho=1,019$ eingesalzen. Es wurde in spezielle Zentrifugationsröhrchen (Beckman) eingeschweißt und über 24 Stunden bei $105.000 \times g$ (59.000 Umdrehungen pro Minute) in einem Beckman TI70 Rotor mit einer Ultrazentrifuge L7-65 zentrifugiert. Die Chylomikronen, VLDL und IDL wurden mit dem Überstand verworfen. Hierfür wurden die Zentrifugenröhrchen mit einem speziellen Schneidegerät (Beckman) zwischen den beiden Phasen geschnitten.

Anschließend wurden in einem zweiten Zentrifugationsschritt die LDL isoliert: Die Dichte des Restplasmas wurde auf $1,063$ eingestellt (siehe oben) und über 24 Stunden bei $105.000 \times g$ zentrifugiert, so daß der abgetrennte Überstand die zu isolierenden LDL enthielt. Zur Entfernung des hinzugefügten Kaliumbromids wurden die isolierten LDL gegen $0,01 \text{ mol/l Tris-HCl}$, $0,01 \text{ mol/l EDTA}$, pH $7,4$ mehrmals in einem Zeitraum von 24 bis 48 Stunden gegen des 300-fache Eigenvolumen dialysiert.

Zur anschließenden HDL-Isolation wurde das Restplasma durch Zugabe von kristallinem Kaliumbromid auf $1,21 \text{ kg/l}$ eingestellt. Es wurde über 48 Stunden bei $105.000 \times g$ zentrifugiert. Nach Abschluß der Ultrazentrifugation enthielt der Überstand die zu isolierenden HDL.

Zur Entfernung des hinzugefügten Kaliumbromids wurden analog zu den LDL die isolierten HDL gegen $0,01 \text{ mol/l Tris-HCl}$, $0,01 \text{ mol/l EDTA}$, pH $7,4$ mehrmals in einem Zeitraum von 24 bis 48 Stunden gegen des 300-fache Eigenvolumen dialysiert.

Hinweis: Zur isolierten HDL-Präparation (ohne vorige LDL-Präparation) können im ersten Zentrifugationsdurchgang Chylomikronen, VLDL, IDL und LDL gemeinsam abgetrennt werden. Hierzu wird das Plasma (mit einer Dichte $\rho=1,006$ kg/l) nach der unten genannten Formel (Abbildung 2.1) auf die Dichte von $\rho=1,063$ kg/l eingesalzen. Chylomikronen, VLDL, IDL und LDL können dann gemeinsam mit dem Überstand abgenommen werden.

<p>Formel zur Einstellung der Dichte ρ_{neu} einer Lösung bekannter Dichte ρ_{alt} mit Kaliumbromid:</p> $\frac{\rho_{\text{neu}} - \rho_{\text{alt}}}{1 - (0,312 \times \rho_{\text{neu}})} = \text{kg/l KBr}$

Abbildung 2.1

Lipoproteinfraktion	Dichte (g/ml)	Dauer der Zentrifugation (h)
Chylomikronen, VLDL	$\rho < 1,006$	24
IDL	$\rho = 1,019$	24
LDL	$\rho = 1,063$	24
HDL ₂	$\rho = 1,125$	30
HDL ₃	$\rho = 1,210$	48

Tabelle 2.4: Dichte der Lipoproteinfraktionen

2.3.2 Acetylierung der Low Density Lipoproteine (LDL) (4, 11)

LDL wurde durch sequenzielle Ultrazentrifugation (nach Havel et al.) aus dem Plasma normolipidämischer Spender gewonnen (siehe 2.3.1). Die isolierten LDL wurden nach der Methode von Fraenkel-Conrat acetyliert. Das nach der Isolierung in einer Konzentration von 3-4 mg/ml (nach Lowry) vorliegende LDL wurde durch Ultrazentrifugation auf eine Proteinkonzentration von 10-15 mg/ml konzentriert. Das gleiche Volumen einer gesättigten Natriumacetat-Lösung wurde im Eiswasserbad gekühlt und unter kontinuierlichem Rühren dem LDL-Gemisch tropfenweise zugegeben. Zur Acetylierung wurde anschließend Essigsäureanhydrid in Einzelportionen von 2 μl pro mg LDL-Protein alle fünf Minuten zugefügt, insgesamt 20 μl Essigsäureanhydrid pro ml LDL-Protein. Der pH-Wert wurde laufend gemessen und, sobald er unter 7,2 lag, mit 0,5M NaOH-Lösung auf 7,2 korrigiert. Das Gemisch wurde für weitere 30 Minuten gerührt und abschließend für 24 Stunden bei 4°C in zwölf Litern eines 0,15 M Natriumchlorid und 0,3 mM EDTA-Puffers bei pH 7,4 dialysiert, um die überschüssigen Acetat-Ionen zu entfernen.

2.4 Isolation und Markierung von ApoAI

2.4.1 Delipidierung der HDL (55)

Der nächste Schritt der ApoAI-Präparation bestand in der Delipidierung der isolierten HDL durch dreimalige Zugabe eines Ethanol/Diethylethergemisches im Verhältnis 3:1 (v/v) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hierfür wurde zunächst ein Milliliter des HDL-Dialysats in 20 ml des Ethanol/Diethylethergemisches injiziert und kurz gerüttelt. Das Gemisch wurde über Nacht in einer explosionsgeschützten Gefriertruhe gelagert, anschließend für 20-30 Minuten bei 2500 Umdrehungen pro Minute und $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Die Temperatur darf auf keinen Fall höher sein, da sich Apolipoproteine sonst in den organischen Lösungsmitteln lösen würden und somit verloren gingen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und ein zweiter Extraktionsschritt wie beschrieben über vier Stunden durchgeführt. Abschließend wurde das Proteinplättchen mit 20 ml reinem Diethylether gewaschen, um auch letzte Lipidreste zu entfernen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurde das noch etherfeuchte Protein in einem möglichst geringen Volumen FPLC-Puffer aufgenommen und gerüttelt; verbleibende Etherreste wurden unter Stickstoff evaporiert.

2.4.2 Isolation des ApoAI (38)

Da das ApoAI noch in einem Gemisch mit weiteren Apolipoproteinen vorlag, wurde es mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) abgetrennt. Hierfür verwendeten wir eine FPLC-Anlage der Firma Pharmacia (Freiburg, BRD), die aus folgenden Komponenten bestand: Pumpensystem mit zwei über einen Controller steuerbaren Pumpen, MonoQ-Anionenaustauschersäule (Säulenvolumen 1 ml), Photomeßzelle, xy-Schreiber, Ausgabeventil mit Probenschleife und automatischem Probensammler.

Die Proteine wurden durch Anlegen eines Natriumchloridgradienten von 10 mM auf 1 M getrennt. Zu diesem Zweck wurden Puffer A und Puffer B (siehe Tab. 2.2) verwendet. Die eluierten Proteine wurden mittels Photomeßzelle bei 254 nm nachgewiesen und die Absorption mit Hilfe des xy-Schreibers aufgezeichnet. Die ApoA-haltigen Fraktionen wurden gepoolt und anschließend intensiv gegen 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat dialysiert. Schließlich konnte das fast salzfreie ApoAI lyophilisiert werden.

Zur Überprüfung der Reinheit des präparierten ApoAI wurde eine *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) mit einer reversed-phase ProteinC4-Säule (Vydag, Hesperia, USA) durchgeführt. (69) Als mobile Phase wurden Lösungsmittel A und Lösungsmittel B verwendet: Die Trennung wurde bei einer Flußrate von 1 ml/Minute gestartet mit einer Laufmittelzusammensetzung von 60% Lösungsmittel A und 40% Lösungsmittel B. Während des Vorgangs wurde der Anteil der Komponente B über 30 Minuten linear auf 70% gesteigert. Zur Durchführung der HPLC haben wir eine HPLC-Anlage der Firma LKB-Pharmacia (Bromma, Schweden) verwendet, die folgende Einzelkomponenten aufwies: Zwei Pumpen, eine beheizbare Säuleneinheit, einen Diodenarraydetektor, einen automatischen Probensammler, der die getrennten Fraktionen auffing, und einen xy-Schreiber. Das isolierte ApoAI wurde in einem Peak bei ca. 55% Lösungsmittel B eluiert. Die Reinheit des präparierten ApoAI betrug mindestens 95%.

2.4.3 Kopplung von ApoAI an Fluorescein

Die Fluoreszenzmarkierung des ApoAI erfolgte mit dem *Flourescein Labeling Kit* der Firma Roche. Detaillierte Angaben sind der Anleitung des Herstellers zu entnehmen.

Um das ApoAI mit Fluorescein zu markieren, wurde ApoAI in einer Konzentration $> 500 \mu\text{g/ml}$ in PBS gelöst. Die Konzentration wurde per Lowry-Test (siehe 2.6) bestimmt. Es wurde ein Volumen verwendet, das $500 \mu\text{g}$ Protein enthielt. Es wurden $40 \mu\text{l}$ FLUOS-Lösung (Fluorescein in DMSO, siehe Anleitung) unter Rühren hinzugegeben und das Gemisch mit PBS auf einen Milliliter aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde zwei Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren inkubiert.

Zur Entfernung von nicht gebundenem Fluorescein wurde eine Gelfiltration mit einer Sephadex G-25-Säule durchgeführt. Zur Vorbereitung der Chromatographiesäule wurde sie mit fünf Milliliter Blockierungslösung (mit bovinem Albumin) gespült und anschließend mit 30 ml PBS. Nachfolgend wurde der Reaktionsansatz auf die Chromatographiesäule aufgetragen und einlaufen gelassen. Die Säule wurde bis zu einem Endvolumen von 2,5 Milliliter mit PBS gefüllt, dieses wurde ebenfalls einsickern gelassen. Die Elution erfolgte mit 3,5 ml PBS. Je zehn Tropfen Eluat wurden in einer Fraktion gesammelt, was einem Volumen von ca. $0,5 \text{ ml}$ entsprach. Das markierte Protein befand sich überwiegend in den ersten vier Fraktionen. Die Fluoreszenz in den gepoolten Fraktionen wurde durch Fluoreszenzphotometrie gemessen (siehe 2.5) In den ersten

beiden Pools befanden sich in der Regel ca. 80% des gekoppelten Proteins. Abschließend wurde die Proteinkonzentration erneut per Lowry-Test bestimmt und die Menge der ApoAI Lösung errechnet, welche die für den jeweiligen Versuch notwendige Menge an Protein pro Milliliter Zellkulturmedium enthielt.

2.4.4 ApoAI-Gold-Konjugation

Als elektronenmikroskopisch sichtbarer Marker für das ApoAI wurden kolloidale Goldpartikel verwendet, die elektrostatisch an das ApoAI gekoppelt wurden. Sie wurden mit der Methode nach Frens hergestellt. (14) Dabei werden durch Reduktion von HAuCl_4 Goldpartikel gewonnen. Ihre Größe ist abhängig von der Konzentration reduzierenden Natriumzitrats. Die von uns gewählte Partikelgröße betrug 12 nm. Der Herstellungsprozeß war wie folgt: 50 ml 0,01%ige HAuCl_4 -Lösung wurde bis zum Sieden erhitzt und 1,6 ml 1%ige Natriumzitratlösung hinzugegeben. Nach ca. fünfminütigem Kochen war die Reduktion des Goldes vollständig und eine rötliche Suspension von metallischen Goldpartikeln gebildet. Sie wurde durch Zentrifugation bei 13000 x g konzentriert und der Überstand über dem Goldpellet verworfen. Die Suspension war in dieser Form unter Verschuß bei 4 °C steril und mehrere Monate lagerungsfähig.

Für die elektrostatische Kopplung des Goldes an ApoAI wurde die Methode nach Völcker verwendet. (65) Die Gold-Suspension wurde 1:10 in doppelt destilliertem Wasser ($\text{OD}_{520} \approx 2,5$) resuspendiert. Der pH-Wert der Suspension wurde unter Zuhilfenahme von fein abgestuftem Indikatorpapier mit 0,2 M Zitronensäure und/oder 0,2 M Kaliumcarbonat auf 5,6 eingestellt, was dem isoelektrischen Punkt der ApoAI-Hauptisoform entspricht. (67) Eine pH-Messung der Goldsuspension mit Glaselektroden ist nicht sinnvoll, da die Poren der pH-Elektrode verstopfen würden. Anschließend wurden schrittweise jeweils 20 µl aus einer ApoAI Stammlösung in einer Konzentration von ca. 500 µg / 100 µl hinzugegeben. nach jeder Zugabe wurde die Stabilität des ApoAI-Goldkomplexes an einem 5 µl Aliquot durch Zugabe von 10 µl 20%iger NaCl-Lösung getestet. Sobald ein Protein-Goldkomplex stabil ist, d.h. alle elektrostatischen Bindungswerten des Goldpartikels mit Protein abgesättigt sind, findet bei Zugabe von Kochsalzlösung kein Farbumschlag der originär roten Lösung ins Blaue mehr statt. Als optische Referenz für diesen Titrationsvorgang dienten jeweils 5 µl einer proteinfreien und einer mit Protein übersättigten Goldsuspension, auch diese war mit 10 µl 20%iger

NaCl-Lösung gemischt. Zur vollständigen Absättigung eventueller restlicher Valenzen wurde die Lösung mit 1% BSA (Fraktion V, fatty acid free) versehen und abschließend durch HEPES-Puffer stabilisiert (50 mM, pH 7,4). Die Lösung enthielt schließlich ca. 250 µg ApoAI / ml. Da der ApoAI-Goldkomplex aufgrund der Experimente mit lebenden Zellen nicht konserviert werden konnte, mußte er innerhalb weniger Stunden verbraucht werden.

2.5 Fluoreszenzphotometrie

Die fluoreszenzphotometrische Messung des Inhaltes einer Probe an Fluorescein wurde mittels eines F-2000 Fluoreszenzspektrophotometers der Firma Hitachi durchgeführt. (Parameter: Wellenlängen: Exzitation: 495 nm, Emission: 518 nm; Test setup: Init delay: 1 sec, Integ time: 6 sec; Instr Setup: Response: 0,15 sec, Bandpass [nm]: Ex 10 Em 10, PM Voltage: 400 V). Die Probenmenge betrug jeweils 800 µl.

2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry (33)

Der Proteingehalt der verwendeten Proben wurde mit der Methode nach Lowry bestimmt, welche auf der Biuret-Methode basiert. Es wird in alkalischer Lösung ein Kupfer-Protein-Komplex gebildet, der anschließend ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Pholin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz) reduziert, wobei eine blaue Färbung zustande kommt. Zunächst wurde Reagenz C gemischt, welches sich aus 49 Teilen Reagenz A (2%ige alkalische Natriumcarbonatlösung [w/v]) und einem Teil Reagenz B (1%ige Kupfersulfatlösung [w/v]) zusammensetzte und für jede Bestimmung frisch angesetzt wurde. In jeweils 2 ml von Reagenz C wurden 50 µl der zu bestimmenden Proteinproben pipettiert, sofort gerüttelt und anschließend zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 100 µl des Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz zugegeben, sofort gerüttelt und ein weiteres Mal für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Schließlich wurden die Extinktionen der Proben in einem Photometer bei 660 nm gemessen. Zuvor wurde ein PBS-Leerwert, der ebenso aufbereitet wurde wie die Proben, gemessen. Zur Erstellung einer Eichgeraden dienten BSA-Standards in unterschiedlichen Konzentrationen (125 µg/µl, 250 µg/µl), gelöst in PBS.

2.7 Zellexperimente

2.7.1 ApoAI-Beladung der Zellen

Die Zellen wurden, wenn bei den entsprechenden Versuchsanordnungen in Kapitel 3 nicht anders beschrieben, in Kulturmedium vorinkubiert, in dem sich keine weiteren Pharmaka zur Beeinflussung der Zellfunktion befanden. Sobald die Zellen in den Petrischalen konfluent gewachsen waren, erfolgte – falls nötig – die Zugabe der jeweils verwendeten Pharmaka (siehe Tabelle 2.3) in dem zur Erreichung der Zielkonzentration notwendigen Volumen. Bei den Experimenten betrug das Volumen des Zellkulturmediums ein Milliliter, so daß beispielsweise ein Mikroliter des im Vergleich zu der zu erreichenden Endkonzentration 1000-fach konzentriert vorliegenden Pharmakons beigegeben wurden. Bei allen Versuchen wurde als Referenzwert die pharmakologisch unbeeinflusste ApoAI-Aufnahme gemessen.

Bei Experimenten mit Zugabe von Pharmaka, die einen Löslichkeitsvermittler (z.B. Ethanol, DMSO) benötigten, wurde die Wirkung des Löslichkeitsvermittlers als Referenzwert alleine gemessen. Sowohl Ethanol als auch DMSO lagen im Zellkulturmedium in einer Endkonzentration von maximal zwei Promille vor. Unmittelbar nach der Zugabe der Zusatzstoffe erfolgte die Zugabe des Fluorescein-ApoAI-Komplexes zum Zellkulturmedium in Endkonzentrationen von 25 oder 50 µg/ml (Proteinäquivalent ohne gekoppeltes Fluorescein). Die Zellen wurden für die im Ergebnisteil angegebene Zeit bei 37 °C inkubiert (siehe Abbildung 2.2). Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen und sein Gehalt an Fluorescein-ApoAI gemessen (siehe 2.5). Die Zellen wurden dreimal mit PBS mit Kalzium und Magnesium gewaschen, danach mit einem Milliliter NaOH (1M) in PBS abgelöst und deren Gehalt an Fluorescein-ApoAI fluo-reszenzphotometrisch bestimmt.

2.7.2 Abgabe von zellassoziertem ApoAI

Vor Versuchsbeginn mußten die Endothelzellen mit dem Fluorescein-ApoAI-Komplex beladen werden. Hierzu wurde der Komplex in das Zellkulturmedium pipettiert, so daß sich eine Endkonzentration von 50 µg/ml ergab (siehe Abbildung 2.3). Die Zellen wurden zur Aufnahme des Komplexes eine Stunde bei 37°C inkubiert.

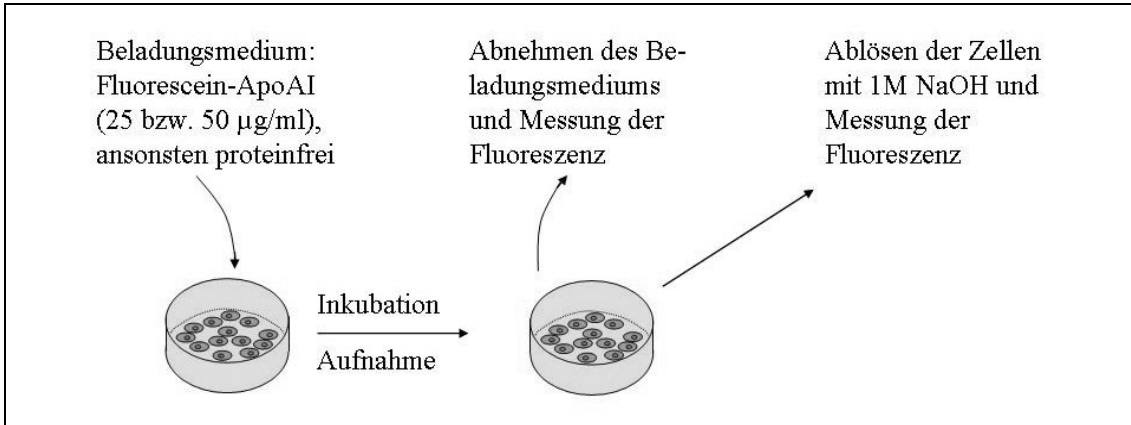


Abb. 2.2: Versuchsanordnung zur Untersuchung der Assoziation von ApoAI und Zellen

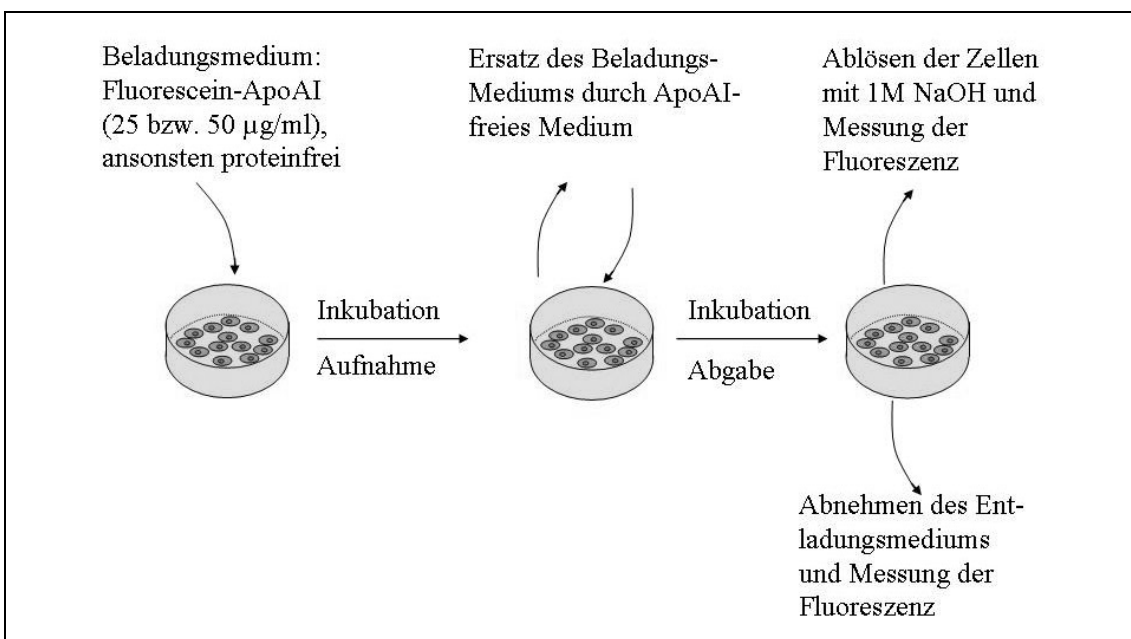


Abb. 2.3: Anordnung zur Untersuchung der Abgabe von zellassoziiertem ApoAI

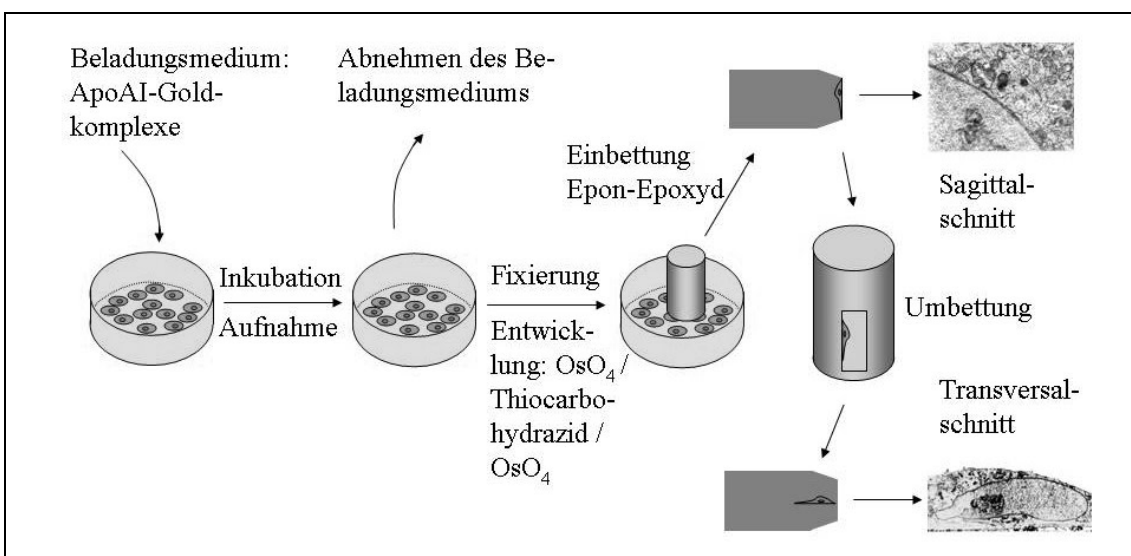


Abb. 2.4: ApoAI-Beladung und Präparation für die Elektronenmikroskopie

Anschließend wurde das Beladungsmedium abgenommen. Die Zellproben wurden dreimal mit PBS mit Kalzium und Magnesium gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde jede Probenschale mit einem Milliliter proteinfreiem EGM-Zellkulturmedium gefüllt, welches als Akzeptormedium für den abzugebenden Fluorescein-ApoAI-Komplex diente. Jeder Probe wurde dann gegebenenfalls die Stammlösung des für das Experiment vorgesehenen Pharmakons (siehe Tabelle 2.3) beigegeben, so daß sich die gewünschte Endkonzentration ergab. Die Proben wurden zur Abgabe des Fluorescein-ApoAI-Komplexes für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde das Akzeptormedium abgenommen und gemessen (siehe 2.5). Die Zellen wurden dreimal mit PBS mit Kalzium und Magnesium gewaschen, mit einer NaOH-Lösung (1M) in PBS mit Kalzium und Magnesium abgelöst und schließlich der fluoreszenzphotometrischen Messung zugeführt.

2.7.3 Beladung der Endothelzellen mit dem Gold-ApoAI-Komplex

Der vorbereitete Gold-ApoAI-Komplex wurde mit ansonsten proteinfreiem EGM-Zellkulturmedium gemischt, so daß für jede zu beladende Petrischale 1 ml des Gemischs zur Verfügung stand. Die Endkonzentration des Markers betrug 30 µg/ml.

Für die Versuche wurden HUVECs in 35 mm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz inkubiert, die letzte Nacht unter proteinfreiem EGM. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurde jede Schale mit 1 ml ApoAI-Goldmedium beladen. Die Zellen wurden zwischen 15 Minuten und zwei Stunden bei 4°C bzw. 37°C inkubiert, zusätzlich wurde je eine Kontrolle für 4°C und 37°C mit EGM-2-Medium inkubiert, welches keine Gold-ApoAI-Komplexe enthielt. Von jeder Probe standen zwei Petrischalen zur Verfügung, jeweils eine für die Licht- und eine für die Elektronenmikroskopie (siehe 2.9, 2.10). Nach der Inkubation wurde das markerhaltige Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS mit Calcium und Magnesium gewaschen. Fixiert wurden sie mit einem Gemisch aus 1% Formaldehyd und 0,05% Glutardialdehyd in PBS, so daß sie anschließend über mehrere Tage bei Raumtemperatur gelagert werden konnten.

2.8 Nachweis von ApoAI durch SDS-PAGE und Western-Blot

2.8.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um nachzuweisen, daß das aufgenommene ApoAI von den HUVECs als intaktes Protein wieder ausgeschieden wurde, wurden die im Effluxmedium enthaltenen Proteine per SDS-PAGE voneinander getrennt und die Anwesenheit des intakten ApoAI mit Hilfe eines Western-Blots und nachfolgender Antikörpermarkierung sichtbar gemacht. (70)

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde eine Wide Minisub CELL GT-Elektrophoresekammer der Firma Biorad verwendet. Als Gel wurde ein 5%iges bis 20%iges Polyacrylamid-SDS-Gradientengel benutzt. Die Komponenten wurden wie in Tabelle 2.2 beschrieben angemischt. Die Acrylamidlösungen (5% und 20%) wurden mit einem Gradientenmischer zu einem Gradientengel gemischt. Die 20%ige Lösung wurde in die vordere Kammer des Mixers gefüllt und die 5%ige in die hintere, so daß sich beim Gel die höhere Konzentration am Boden befand. Die Startreagenzien (Ammoniumpersulfat und Temed) wurden erst im Mischer zu den Lösungen hinzugegeben, da die Polymerisation sonst schon vor Beendigung des Gel - Gießvorgangs begonnen hätte. Dem Gießen des Gels folgte eine vorsichtige Beschichtung mit Aqua destillata mit Hilfe einer Spritze. Nach Aushärtung des Gels wurde das Wasser mit der Spritze abgenommen und vorsichtig das Sammelgel auf das Gradientengel gegossen. Vorher wurde ein Kamm angebracht, um Probenaschen freizuhalten.

Das Effluxmedium zweier Zellkulturschalen, insgesamt zwei Milliliter, wurde lyophilisiert und in 100 µl Aqua destillata resuspendiert. Als Referenz wurden Aqua destillata, 0,5 ml ApoAI (250 µg/100µl), 2 ml humanes Serum und 2 ml Beladungsmedium (ebenfalls wie Effluxmedium lyophilisiert und in 100 µl Aqua destillata resuspendiert) verwendet. Zu jeder Probe wurden 50 Mikroliter Probenpuffer hinzugefügt; nachfolgend wurden sie für 10 Minuten bei 95 °C gekocht. Nach dem Abkühlen wurden sie kurz anzentrifugiert, um eventuell vorhandene Blasen zu zerstören. Schließlich wurden die Proben auf das Gel aufgetragen, die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt und verschlossen und die Elektrophorese mit einer Spannung von 80 V begonnen. Wenn die Proben bis in das Trenngel gewandert waren, wurde die Spannung auf maximal 200 V gesteigert, um die Elektrophorese zu beschleunigen.

2.8.2 Western Blot (26)

Die elektrophoretisch getrennten Proteine wurden durch semi-dry blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Blotvorgang wurde mit einer 2117 Multiphor II Electrophoresis Unit über eine Zeit von 90 Minuten bei 100 V durchgeführt. Mehrere Lagen Filterpapier in der Größe des Gels bildeten die Außenlagen des Blot-„Sandwiches“. Darin befand sich das Gel, welches frei von Luftblasen mit der Nitrozellulosemembran in Kontakt gebracht wurde. Das Sandwich wurde so zwischen die Graphitelektroden gelegt, daß die Nitrozellulosemembran in Richtung Anode zeigte. Die Kammer war mit Transferpuffer (siehe unten) gefüllt.

Nach Beendigung des Blotvorgangs wurde das Nitrozellulosepapier über 30 Minuten bei 37°C mit 5% Magermilch in TBST geblockt und das ApoAI durch Immundetektion nachgewiesen. Hierzu wurde Anti-ApoAI (Rabbit) 1:5000 in TBST mit 1% (m/v) Magermilchpulver gelöst. Das Nitrozellulosepapier wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Wanne auf einem Taumelgerät von der Antikörperlösung umspült. Anschließend wurde es in gleicher Weise für dreimal zehn Minuten mit TBST gewaschen. Peroxidasekonjugierte Anti-Rabbit IgG wurden 1:1000 in TBST mit 1% (m/v) Magermilchpulver gelöst und für 30 Minuten auf das Nitrozellulosepapier gegeben. Es wurde erneut für dreimal zehn Minuten mit TBST gewaschen.

Das Nitrozellulosepapier wurde über zehn Minuten in der Entwicklerlösung entwickelt und abschließend noch dreimal zehn Minuten in TBST gewaschen. Nach Trocknung an der Luft wurde das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

2.9 Lichtmikroskopie

2.9.1 Entwicklung der ApoAI-Goldkomplexe mit Silberkolloid (66)

Um die aufgrund ihrer geringen Größe lichtmikroskopisch unsichtbaren Goldpartikel nach Aufnahme in die Zellen (siehe 2.7.3) sichtbar zu machen, wurde eine Silberentwicklung durchgeführt. Hierbei aggregiert metallisches Silber aus einer Silbernitratlösung in Gegenwart von Hydrochinon an Goldpartikeln. Die Zellen wurden nach der Fixierung durch Übergießen mit Formaldehyd und Glutaraldehyd mit Aqua destillata gut gewaschen, um vor allem Chlorid zu entfernen, welches das Silber ausfällen würde. Direkt vor Benutzung wurden gleiche Volumina von Silber- und Entwicklerlösung in

einem Plastikröhrchen gemischt. Jeweils 2 ml davon wurden in eine Zellkulturschale gegeben. Der Entwicklungsvorgang nach Mischen der Lösungen wird nach ca. 15 Minuten von Selbstnukleationen überlagert. Daher wurden Gold-Silberverstärkungen nach ca. 10 Minuten durch Waschen mit Aqua destillata gestoppt und gegebenenfalls mit frischem Entwickler wiederholt. Die Proben wurden während der Entwicklung in einer dunklen gekühlten Box bei 8°C auf einem Taumelgerät bewegt.

2.9.2 Konservierung der Proben und Mikroskopie

Die silberentwickelten Zellkulturen wurden anschließend in Glyceringelatine (Serva) unter einem Deckglas konserviert. Die Untersuchung erfolgte mit einem Leitz Orthoplan Mikroskop mit digitaler Photodokumentationsanlage.

2.10 Elektronenmikroskopie

2.10.1 Färbung und Präparation der Proben (59)

Nach Fixierung und mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Apo-AI-Gold-beladenen Zellen (siehe 2.7.3) mit einer Sequenz Osmiumtetroxyd / Thiocarbohydrazid / Osmiumtetroxyd (OTO) gefärbt. Diese OTO-Methode wurde von Seligman et al. etabliert und bot eine für unsere Zwecke besonders gute Kontrastierung der Proben insbesondere durch intensive Anfärbung von lipidhaltigen Komponenten. Dieser Effekt kommt durch eine Bindung des Thiocarbohydrazids (TCH) an das bereits gebundene Osmium aus dem ersten Färbedurchgang zustande, welches dann im zweiten Durchgang weiteres Osmium binden kann. Das spätere Abbrechen der in Epoxydharz eingeschichteten Zelloge unterhalb des Substrats vom Plastikschalenboden wurde dadurch ebenfalls erleichtert. Das Substrat ist ein dünnes, homogenes Häutchen, bestehend aus Proteinen, anderen Matrixkomponenten und der gelatinösen Schalenvorbereitung, welches für die Adhäsion der Zellen von Bedeutung ist.

Die Proben wurden zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur unter einer 2%igen OsO_4 -Lösung angefärbt. Anschließend wurden sie mit destilliertem Wasser gewaschen, danach für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur unter einer 1%igen TCH-Lösung inkubiert. Nach erneutem Waschen folgte der zweite Färbeschritt mit 2%iger OsO_4 -

Lösung bei Raumtemperatur für eine weitere Stunde. Abschließend wurde wieder mit Aqua destillata gewaschen.

Die Proben wurden anschließend mit Ethanol-Lösungen in ansteigender Konzentration (15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 99%, 100%, 100%; in Wasser, für je 5 Minuten) dehydriert. Sofort nach dem letzten Abgießen wurden die Zellen schließlich im Zellkultur-schälchen durch mehrfache Überschichtungen und nachfolgendes Abgießen in Epon-Epoxydharz eingebettet. (Siehe Abbildung 2.4) Die letzte Schicht verblieb auf den Präparaten. Sie polymerisierte über 12 Stunden bei 70°C aus. Nach den ersten ein bis zwei Stunden, nachdem das Harz bereits zähflüssig geworden war, wurden beidseitig geöffnete BEEM-Kapseln an mehreren Stellen bis auf den Plastikboden gedrückt und die Kapseln vollständig mit Harz aufgefüllt. Nach weiterer Polymerisation und Aushärtung der Präparate in den Petrischalen mußten zunächst die Schalenränder abgefräst und die Zellschicht mit einer Rasierklinge vom Plastikboden abgehebelt werden. Die Bruchfläche verläuft bei diesem Verfahren unterhalb des Substratums. Die Kapseln wurden ebenfalls abgehebelt und in Pyramidenform getrimmt, um sie auf eine mit dem Ultramikrotom schneidbare Größe zu bringen. Auf diese Weise konnten Schnitte in exakt planparalleler Orientierung zur Zellschicht gewonnen werden. Vertikalschnitte wurden hingegen nach Herausschneiden eines kleinen Harzblockes und erneuter Einbettung in einer Silikonmulde gewonnen. (Siehe Abbildung 2.4) Schließlich wurden mit einem Sorvall MT5000 Ultramikrotom Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 80 – 100 nm angefertigt und auf Elektronenmikroskopie-Kupfernetzen aufgefangen.

2.10.2 Mikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde mit einem EM201 Transmissionselektronenmikroskop der Firma Philips durchgeführt.

3 Ergebnisse

Der Vorgang des ApoAI-Transportes durch das Endothel läßt sich in zwei Einzelschritte aufteilen, nämlich die Aufnahme von ApoAI in die Zelle und seine anschließende Resekretion. Die Mechanismen beider Vorgänge wurden isoliert untersucht und werden nachfolgend getrennt besprochen. In den fluoreszenzphotometrischen Experimenten ist es methodenbedingt nicht möglich, den an der Zelloberfläche haftenden Anteil des fluoreszenzmarkierten ApoAI vom intrazellulären Anteil zu unterscheiden, so daß lediglich von einer Assoziation des Markers mit der Zelle gesprochen werden kann, bzw. seiner nachfolgenden Dissoziation.

An einigen Stellen sind die Ergebnisse der Experimente in willkürlichen Einheiten (A.U.) Fluoreszenz angegeben, die sich aus der fluoreszenzphotometrischen Messung einer Probe ergeben. Die Ergebnisse einzelner Proben innerhalb eines Experimentes sind dabei untereinander vergleichbar.

Um die Ergebnisse der verschiedenen Experimente miteinander vergleichbar zu machen, wurden als Vergleichswerte die Größen *Assoziation*, *relative Assoziation*, *Dissoziation* und *relative Dissoziation* eingeführt.

Die **Assoziation** (angegeben in Prozent) beschreibt den Anteil des bei der Beladung in die Zellen aufgenommenen Fluoreszenzmarkers (inklusive des an den Zellen haftenden Anteils) und errechnet sich nach folgender Formel (*Fl* steht für die gemessene Intensität der Fluoreszenz in willkürlichen Einheiten):

$$\text{Assoziation} = Fl_{\text{Zellen}} / (Fl_{\text{Zellen}} + Fl_{\text{Beladungsmedium}})$$

Die **relative Assoziation** (angegeben in Prozent) vergleicht die Assoziation einer Probe unter Versuchsbedingungen mit der Assoziation einer Kontrollprobe, die unter Standardbedingungen parallel am selben Experiment teilgenommen hat. Sie errechnet sich nach der Formel

$$\text{Relative Assoziation} = \text{Assoziation}_{\text{Inhibitor}} / \text{Assoziation}_{\text{Referenzwert}}$$

Eine relative Assoziation von über 100% weist auf eine Stimulation des ApoAI-Aufnahmeprozesses hin, läßt sich jedoch auch durch eine Hemmung seiner Resekretion

erklären, die ja nach kurzer Zeit parallel zum Aufnahmeprozess stattfindet. Ein Wert unter 100% läßt auf eine Hemmung der ApoAI-Aufnahme bzw. analog auf eine Stimulation der Resekretion schließen.

Die **Dissoziation** (angegeben in Prozent) gibt den Anteil des bei der Beladung in die Zellen aufgenommenen (bzw. daran anhaftenden) Fluoreszenzmarkers an, der während der Zellinkubation mit dem Akzeptormedium an dieses abgegeben wurde und errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Dissoziation} = \frac{Fl_{\text{Entladungssmedium}}}{(Fl_{\text{Zellen}} + Fl_{\text{Entladungssmedium}})}$$

Die **relative Dissoziation** (angegeben in Prozent) vergleicht analog zu den Aufnahmeexperimenten die Dissoziation einer Probe unter Versuchsbedingungen mit der Dissoziation einer Kontrollprobe, die unter Standardbedingungen parallel am Experiment teilgenommen hat. Sie errechnet sich nach der Formel:

$$\text{Relative Dissoziation} = \frac{\text{Dissoziation}_{\text{Inhibitor}}}{\text{Dissoziation}_{\text{Referenzwert}}}$$

Auch hier gilt, daß eine erhöhte relative Dissoziation sowohl durch eine Stimulation der ApoAI-Abgabe, als auch durch eine Hemmung seiner Wiederaufnahme erklärt werden kann, die unmittelbar und mit der Zeit zunehmend stattfindet. Analog kann sich eine Verminderung der relativen Dissoziation auf eine Hemmung der Abgabe bzw. eine Stimulation der Wiederaufnahme gründen.

3.1 Die Assoziation von fluoresceinmarkiertem ApoAI mit Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen

3.1.1 Konzentrationsabhängigkeit

Um eine Abhängigkeit der Assoziation von der Fluorescein-ApoAI-Konzentration im Zellkulturmedium zu ermitteln, wurden Endothelzellen wie in 2.7.1 beschrieben mit Medien mit unterschiedlicher Konzentration des Markers für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei einer Versuchsreihe erfolgte eine 24-stündige Vorinkubation der Zellen mit TNF- α (5 ng/ml).

Es zeigt sich eine lineare Abhängigkeit der Fluorescein-ApoAI-Assoziation von der Fluorescein-ApoAI-Konzentration im Beladungsmedium. (Abbildung 3.1) In dem von uns untersuchten Bereich findet sich keine konzentrationsabhängige Sättigung, die sich in Form einer verminderten Kurvensteigung in höheren Konzentrationsbereichen manifestieren würde. Eine Vorinkubation mit TNF- α hat offensichtlich keinen signifikanten Effekt auf die ApoAI-Assoziation.

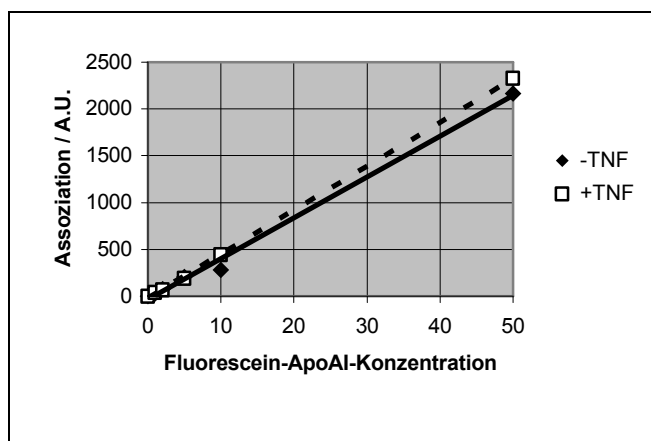


Abbildung 3.1: Konzentrationsabhängigkeit der ApoAI-Assoziation; fehlende Beeinflussbarkeit durch Vorinkubation mit TNF- α (Dauer des Assoziationsvorganges: 24 Stunden)

3.1.2 Zeitabhängigkeit

Zur Erstellung einer Zeitkinetik der Assoziation des Fluorescein-ApoAI-Komplexes wurde der Assoziations-Versuch wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben durchgeführt; die Zellen wurden über verschiedene Zeiten mit dem Beladungsmedium inkubiert. Die Konzentration des Fluorescein-ApoAI-Komplexes betrug 50 $\mu\text{g/ml}$.

Anhand der Abbildung 3.2 läßt sich eine Zunahme der Fluorescein-ApoAI-Assoziation mit der Zeit beobachten, die sich asymptotisch an ein Maximum annähert. Dieses liegt bei einem assoziierten Anteil von ca. 25% und wird nach annähernd acht Stunden er-

reicht. Wie schon in der Einleitung dieses Kapitels beschrieben beginnt unmittelbar nach Assoziation der ersten Moleküle des markierten ApoAI seine Redissoziation. In der Abbildung läßt sich somit die Erreichung eines steady state zwischen Assoziation und Dissoziation erkennen.

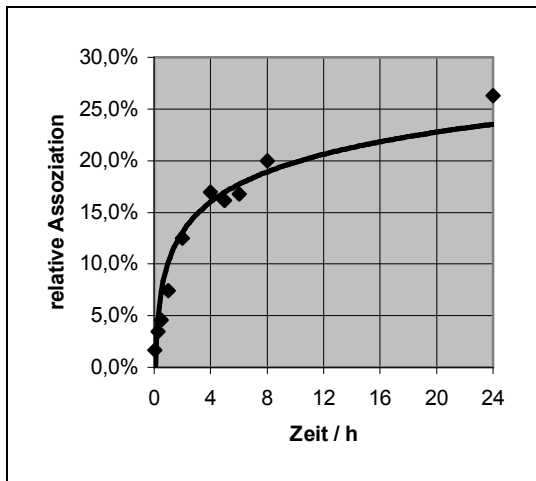


Abbildung 3.2: Zeitabhängigkeit der ApoAI-Assoziation

3.1.3 Fluoreszenzmikroskopie der Fluorescein-ApoAI-beladenen Zellen

Zur morphologischen Dokumentation der Fluorescein-ApoAI-Beladung wurden HUVEC über zwei Stunden beladen (siehe 2.7.1) und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. (Mikroskop: Leitz Orthoplan mit Zeiss und Leitz Objektiven, Wellenlänge zur Exzitation 495 nm)

In der in Abbildung 3.3 gezeigten Zelle befindet sich ein Teil des Markers gleichmäßig verteilt in der äußeren Zellmembran. Im Inneren stellen sich mit höherer Signalintensität einige Zellorganellen dar. Leider erlaubt diese Analyse keinen Rückschluß darüber, zu welchem Anteil das markierte ApoAI internalisiert wurde bzw. an der Zelloberfläche verbleibt.

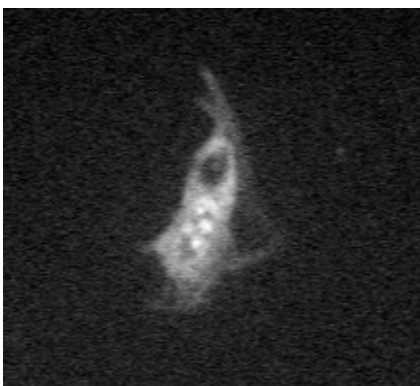


Abbildung 3.3: Fluorescein-ApoAI-beladene Zelle

3.1.4 Temperaturabhängigkeit

Um die Temperaturabhängigkeit der ApoAI-Assoziation zu untersuchen, wurden HUVEC für eine Stunde mit Fluorescein-ApoAI, gelöst in auf 4°C vorgekühltem Zellkulturmedium inkubiert. Als Kontrolle diente eine Probe, die nicht vorgekühlt war und während des Versuchs bei 37°C inkubiert wurde. Die Konzentration des fluoreszenzmarkierten ApoAI betrug 50 µg/ml. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Ansonsten wurde der Versuch wie in 2.7.1 beschrieben durchgeführt.

Im Experiment zeigte sich eine Temperaturabhängigkeit der zellulären ApoAI-Assoziation. Sie ist bei 4°C gegenüber der bei 37°C inkubierten Probe um ca. 50% reduziert. (Abb. 3.4) Diese Beobachtung läßt auf einen spezifischen, proteinvermittelten Vorgang schließen und nicht auf eine lediglich diffusionsbedingte Aufnahme des fluoresceinmarkierten ApoAI. Die Differenz der aufgenommenen Mengen bei den verschiedenen Temperaturen besteht wahrscheinlich aus der Menge des Fluorescein-ApoAI-Komplexes, die nicht nur gebunden (4°C), sondern auch internalisiert wird (37°C).

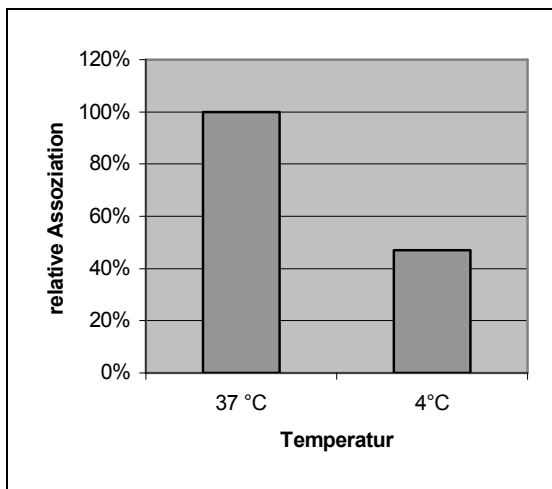


Abbildung 3.4: Hemmbarkeit der Assoziation durch Unterkühlung

3.1.5 Kompetitive Hemmung durch natives ApoAI

Dieser Versuch wurde ebenfalls wie in 2.7.1 beschrieben durchgeführt. Die Konzentration des Fluorescein-ApoAI-Komplexes betrug 25 µg/ml, die Inkubationszeit für dessen Aufnahme eine Stunde. Dem Beladungsmedium war natives ApoAI in der Konzentration 250 µg/ml bzw. 2,5 mg/ml zugefügt. Als Vergleich diente eine Probe ohne zugefügtes natives ApoAI.

Die Zugabe von nativem ApoAI führte zu einer dosisabhängigen Hemmung der Assoziation des Fluorescein-ApoAI-Komplexes. Bei einer ApoAI-Konzentration von 250

$\mu\text{g/ml}$ wurden nur noch 67% des fluoreszenzmarkierten ApoAI im Vergleich zur Kontrolle assoziiert, bei 2,5 mg/ml ApoAI sogar nur noch 31% (Abb. 3.5).

Dieses Verhalten kann als weiterer Hinweis für eine spezifische Komponente der ApoAI-Assoziation gedeutet werden, da offensichtlich eine kompetitive Konkurrenz des nativen und des fluoreszenzmarkierten ApoAI um die gleichen zellulären Bindungspartner vorliegt.

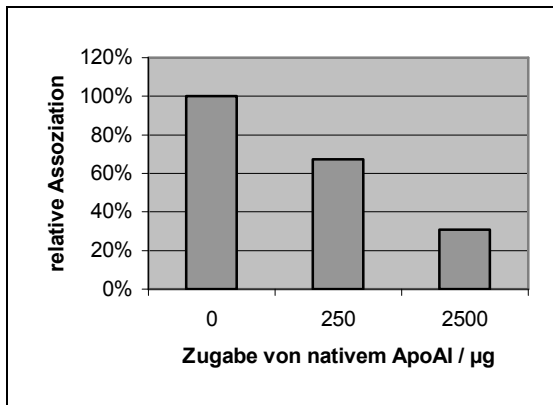


Abbildung 3.5: Kompetitive Hemmbarkeit der ApoAI-Assoziation durch natives ApoAI

3.1.6 Kompetitive Hemmung durch Lipoproteine und Rezeptorassoziertes Protein

Das Experiment wurde wie in 3.7.1 beschrieben durchgeführt, dem Zellkulturmedium wurden zusätzlich verschiedene Lipoproteine bzw. Rezeptorassoziertes Protein (RAP) in einer Konzentration von 2,5 mg/ml zugegeben. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde, die Fluorescein-ApoAI-Konzentration 25 $\mu\text{g/ml}$.

LDL und RAP führten zu keiner Hemmung der Fluorescein-ApoAI-Assoziation (Abb. 3.6). Auch HDL₃ hemmte die Assoziation nicht signifikant (relative Assoziation: 84%). Lediglich acetyliertes LDL führte zu einer deutlichen kompetitiven Hemmung der Assoziation im Vergleich zur Kontrolle (relative Assoziation: um 65%).

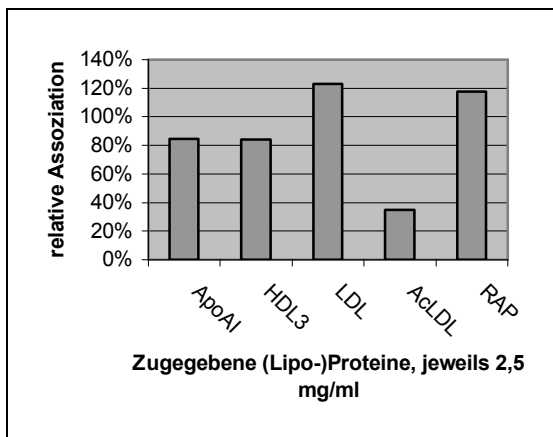


Abbildung 3.6: Kompetitive Hemmbarkeit der ApoAI-Assoziation durch acyliertes LDL

3.1.7 Pharmakologische Beeinflussung der ApoAI-Assoziation

Zur genaueren Charakterisierung des Fluorescein-ApoAI-Transportes durch die Zelle wurden verschiedene Signaltransduktionswege und proteinvermittelte Prozesse pharmakologisch beeinflusst und der Einfluß der Steroidhormone Testosteron und Östradiol untersucht.

Diese Experimente wurden wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden, je nach zugegebener Substanz über eine bzw. zwei Stunden bei 37°C mit fluoreszenzmarkiertem ApoAI inkubiert. (Inkubationszeit 1 Stunde, Fluorescein-ApoAI-Konzentration 50 µg/ml, bei Mangan 20 µg/ml)

Einige Pharmaka machten den Einsatz von Löslichkeitsvermittlern notwendig (Ethanol oder DMSO). Da anzunehmen ist, daß diese Löslichkeitsvermittler selbst einen Effekt auf die Assoziation bzw. Dissoziation des markierten ApoAI haben, wurde der Einfluß der Löslichkeitsvermittler selbst überprüft.

Ethanol führt bei kurzen Inkubationszeiten von einer und zwei Stunden zu einer vermehrten zellulären Assoziation von Fluorescein-ApoAI. DMSO hat bei den von uns verwendeten kurzen Inkubationszeiten von ein und zwei Stunden keinen signifikanten Effekt auf die Fluorescein-ApoAI-Assoziation.

Obwohl offensichtlich nicht alle Löslichkeitsvermittler einen signifikanten Einfluß auf die ApoAI-Fluorescein-Assoziation haben, wurde bei allen Experimenten, die den Einsatz eines Löslichkeitsvermittlers erforderten, eine Kontrolle mit dem benutzten Löslichkeitsvermittler in entsprechender Konzentration mitinkubiert, die dann zur Berechnung der relativen Assoziation als Vergleichswert herangezogen wurde. Die maximale Konzentration der Löslichkeitsvermittler betrug bei unseren Experimenten zwei Promille (v/v).

Die Aufnahme des Fluorescein-ApoAI-Komplexes in die Endothelzellen ist eng an die intrazelluläre Anwesenheit von Kationen gekoppelt. Der Einsatz von EGTA (1mM), einem kalziumbindenden Chelator, während der Inkubation führte zu einer Reduktion der Assoziation auf 18% (Abbildung 3.7). Applikation der bivalenten Kationen Nickel (5 µM) und Mangan (1 µM) hatte eine Verstärkung der Assoziation auf den 2,5-fachen (Nickel) bzw. 5-fachen Wert (Mangan) zur Folge.

Des Weiteren untersuchten wir, ob die Fluorescein-ApoAI-Aufnahme durch Steroidhormone reguliert wird. Zu diesem Zwecke inkubierten wir die Zellen 6 Stunden vor Beginn des Experiments mit Testosteron und Östradiol in physiologischen Konzentrationen. Diese Vorinkubation war notwendig, da diese Hormone ihre Wirkung unter anderem über die Regulation der Expression verschiedenster Proteine entfalten. Die resultierende Alteration der Proteinsyntheseaktivität führt erst nach ausreichender Zeit zu einer Änderung der so regulierten Proteine.

Weder Testosteron (Konzentrationen bis 100 ng/ml) noch Östradiol (Konzentrationen bis 1 ng/ml) führten zu einer signifikanten Änderung der relativen Fluorescein-ApoAI-Assoziation.

Schließlich versuchten wir, über die Beeinflussung verschiedener Signaltransduktionskaskaden modulierend auf die Zellassoziation des Markerkomplexes einzuwirken. Der Versuch wurde wie in 2.7.1 beschrieben durchgeführt.

Die Substanz RO318220 ist ein Inhibitor der Proteinkinase C (PKC). (32) Ihre Applikation während des Versuchs führte mit zunehmender Konzentration zu einer signifikanten Erhöhung der relativen ApoAI-Assoziation auf bis zu fast 750% (RO318220-Konzentration 50 μ M). Andere PKC-Aktivatoren hatten keinen Einfluß auf die zelluläre ApoAI-Assoziation.

Bei allen in diesem Abschnitt beschriebenen Experimenten ist die Entscheidung, ob die Beeinflussung des Ergebnisses auf einer Beeinflussung der Assoziation oder der Redissoziation beruht wie bereits erwähnt schwierig.

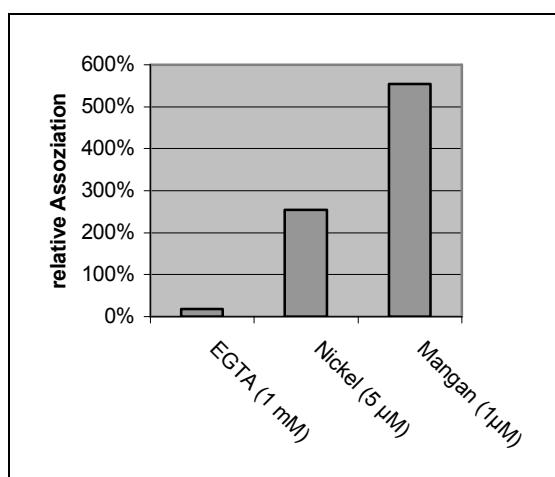


Abbildung 3.7: Abhängigkeit der ApoAI-Assoziation von bivalenten Kationen

3.2 Die Dissoziation des Fluorescein-ApoAI-Komplexes von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen

3.2.1 Zeitabhängigkeit der ApoAI - Dissoziation

Die Zeitkinetik der Dissoziation des Fluorescein-ApoAI-Komplexes von den Zellen wurde mit einer abgewandelten Version des in Kapitel 2.7.2 beschriebenen Experiments bestimmt. Die Zellen wurden wie beschrieben für eine Stunde mit dem Marker in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ beladen. Die Abgabe erfolgte jedoch mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten.

Die Fluorescein-ApoAI-Dissoziation zeigt eine zeitabhängige Zunahme, die sich einem Maximum bei ca. 50% asymptotisch annähert. Das Maximum wird bei nach vier Stunden annähernd erreicht (Abbildung 3.8). Auch hier läßt die Zeitkinetik – wie in den Aufnahmeexperimenten – darauf schließen, daß sich ein steady state zwischen Dissoziation und Reassoziierung des fluoreszenzmarkierten ApoAI einstellt.

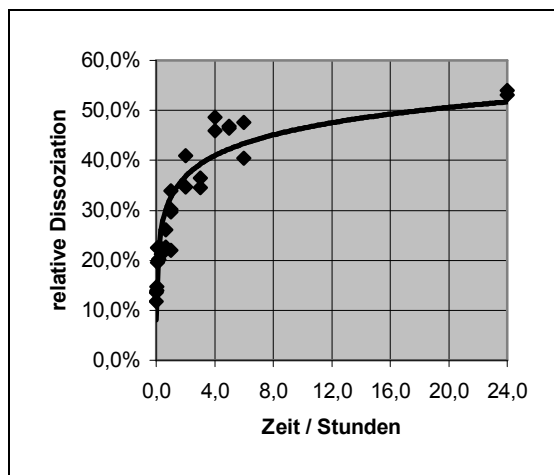


Abbildung 3.8: Zeitabhängigkeit der ApoAI-Dissoziation

3.2.2 Temperaturabhängigkeit der ApoAI-Dissoziation

Um den Einfluß verschiedener Temperaturen auf den Entladungsvorgang zu bestimmen, wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Fluorescein-ApoAI beladen. Nach der Beladung wurden sie bei 4°C bzw. 37°C für zwei Stunden entladen. Ansonsten wurde der Versuch wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben durchgeführt.

Die relative Dissoziation betrug bei 4°C nur ca. 50% des Wertes bei 37°C (Abbildung 3.9). Wie bei den Assoziationsexperimenten ist auch dies ein Hinweis für eine spezifische, proteinvermittelte Komponente des Vorganges.

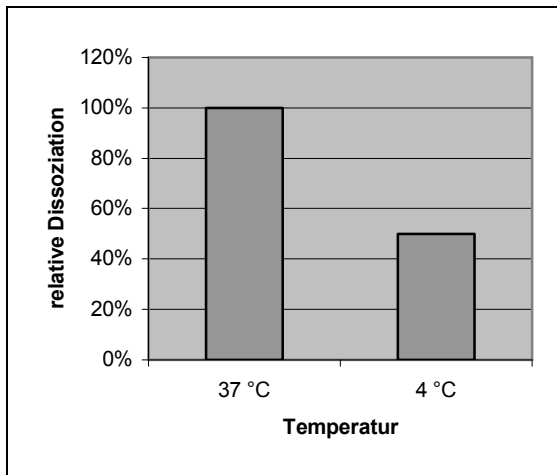


Abbildung 3.9: Hemmbarkeit der ApoAI-Dissoziation durch Unterkühlung

3.2.3 Pharmakologische Beeinflussung der ApoAI-Dissoziation

Die Beladung der Zellen wurde entsprechend Kapitel 2.7.2 durchgeführt, beim Dissoziationsvorgang wurden den Zellkulturmedien Pharmaka verschiedener Substanzklassen beigegeben. (Siehe Tabelle 2.3)

Die Applikation von EGTA und Nickel wirken, verglichen mit den Assoziationsexperimenten, entgegengesetzt auf die Dissoziation von Fluoreszein ApoAI. EGTA (1mM) führte zu einer Steigerung auf 227%. Nickel (5 μ M) hatte eine Verminderung der Abgabe um 39% zur Folge.

Zur Messung des Einflusses von Steroidhormonen wurden die Zellen vor Beladung der Zellen mit dem Marker für sechs Stunden mit Testosteron (bis 100 ng/ml) bzw. Östradiol (bis 1 ng/ml) vorinkubiert. Beide Steroidhormone führten – wie schon bei den Assoziationsexperimenten – zu keiner signifikanten Beeinflussung der Fluorescein-ApoAI-Dissoziation.

Zur Untersuchung der Regulation der Dissoziation durch die Proteinkinase C wurden die Zellen während der Abgabe mit RO318220 inkubiert (siehe 3.1.7). (32) Hier führte die Substanz konzentrationsabhängig zu einer Verminderung der Abgabe um bis zu 70% (RO318220-Konzentration: 50 μ M).

Auch bei den Dissoziationsexperimenten ist die Entscheidung schwierig, ob der Effekt der verwendeten Pharmaka auf einer Beeinflussung des Assoziations- oder des Dissoziationsvorgangs beruht.

3.2.4 SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot der Entladungsmedien

Um zu beweisen, daß der ApoAI-Fluoreszeinkomplex bei den Assoziations- bzw. Dissoziationsvorgängen durch HUVECs in seiner Integrität unbeeinflusst bleibt, wurden Zellen für sechs Stunden mit fluoresceingekoppeltem Apo-AI inkubiert. Das Medium wurde gegen ApoAI-haltiges Medium ausgetauscht und die Zellen für zwei Stunden chase-inkubiert (siehe 2.7.2). Es wurde anschließend durch SDS-PAGE getrennt (siehe 2.8). Der nach Elektrophorese angefertigte Western-Blot, der mit Anti-ApoAI-Antikörpern entwickelt wurde, ist in Abbildung 3.10 zu sehen.

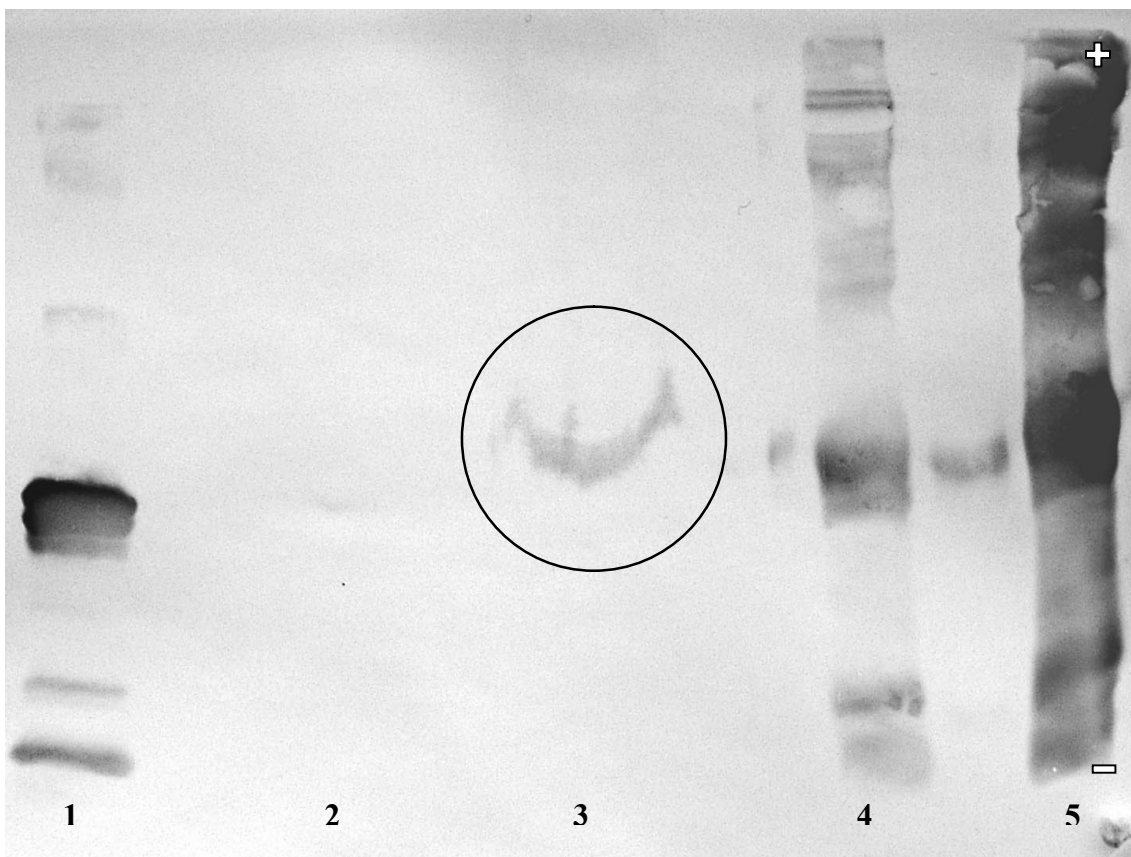


Abbildung 3.10 Western-Blot der Gelelektrophorese des Entladungsmediums

Probenfolge: **1)** natives Apolipoprotein AI **2)** PBS **3)** Entladungsmedium (Kreis entspricht ApoAI-Bande) **4)** Beladungsmedium **5)** humanes Serum

Der Fluorescein-ApoAI-Komplex war im Entladungsmedium in nur geringer Konzentration vorhanden, so daß die Proben zum Nachweis lyophilisiert und zum Nachweis in geringerem Volumen resuspendiert werden mußten. Dies hatte aufgrund der zunehmenden Viskosität schlechtere Laufeigenschaften zur Folge, so daß die Ränder der ApoAI-Bande ausgezogen sind.

Da das ApoAI im Entladungsmedium sehr niedrig konzentriert war, wurde das Medium mehrerer Zellkulturschälchen gemischt, lyophilisiert und in 0,5 ml resuspendiert, um die ApoAI-Konzentration zu steigern. Dies hatte einen sehr hohen Salzgehalt und damit eine vermehrte Viskosität der Probe zur Folge, so daß die elektrophoretischen Laufeigenschaften nicht mehr ideal waren. Die Ränder der Probe bleiben somit bei der Elektrophorese ein wenig zurück, das Ergebnis blieb jedoch auswertbar.

Wie im Bild auf Bahn drei im Kreis zu sehen, ist nur eine ApoAI-Bande vorhanden, welche auf der gleichen Höhe liegt, wie im Beladungsmedium auf Bahn vier bzw. im Plasma auf Bahn fünf und im nativen ApoAI auf Bahn eins. Damit ist zu schließen, daß der Fluorescein-ApoAI-Komplex auf seinem (vermuteten) Weg durch die Zelle intakt geblieben ist.

3.3 Morphologische Untersuchung der Aufnahme und Resekretion von ApoAI

Die Aufnahme von ApoAI durch Endothelzellen wurde ergänzend zu den fluoreszenzphotometrischen Experimenten mit licht- und elektronenmikroskopischen Techniken untersucht. Zu diesem Zweck wurde ApoAI elektrostatisch an kolloidale Goldpartikel gekoppelt (siehe 2.4.4). Diese wurden nach Internalisierung (siehe 2.7.3) durch die Endothelzellen mit Hilfe einer Silberentwicklung (siehe 2.9.1) der lichtmikroskopischen Betrachtung (siehe 2.9.2) zugänglich gemacht bzw. direkt elektronenmikroskopisch dargestellt (siehe 2.10). Im Gegensatz zu den bis hierher vorgestellten fluoreszenzphotometrischen Experimenten ist eine elektronenmikroskopische Untersuchung in der Lage, eine Aufnahme des markierten ApoAI durch die HUVECs nachzuweisen, so daß hier nicht bloß von Assoziation und Dissoziation gesprochen werden muß.

3.3.1 Lichtmikroskopische Untersuchung

Die Beladung der Zellen mit dem ApoAI-Goldkomplex, die anschließende Fixierung, Silberentwicklung und Eindeckelung der Proben wurden wie in Kapitel 2 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden über verschiedene Zeiten und bei verschiedenen Temperaturen mit den Komplexen beladen. Um die Stärke der Silber-Hintergrundpräzipitation während der Entwicklung messen zu können, wurden Zellen mitentwickelt, die nicht mit ApoAI-Goldpartikeln beladen waren. Diese Leerwertkontrollen (Abbildung 3.11) zeigten nach der Entwicklung nur eine geringe Menge an Selbstnukleationsherden, so daß bei den anderen, mit ApoAI-Goldkomplexen beladenen Proben davon ausgegangen werden kann, daß der überwiegende Teil der sichtbaren Silberkörner in der Tat ApoAI-Goldkomplexe darstellt.

Wie sich in den biochemischen Experimenten zeigt, nimmt die Menge an aufgenommenem ApoAI mit der Zeit zu, wobei sie sich asymptotisch einem Maximum annähert, welches nach acht Stunden nahezu erreicht wird. (siehe 3.1.2). Auch morphologisch zeigt sich eine Zunahme der assoziierten ApoAI-Goldkomplexe mit ansteigender Expositionszeit. (Abbildung 3.13, 3.14) Nach 15 Minuten sind im Bereich der gesamten Zelle dezente Anreicherungen von Silberkörnchen erkennbar. Bei einer Inkubationszeit von einer Stunde ist eine deutlich verstärkte Anreicherung von ApoAI-Goldkomplexen feststellbar.

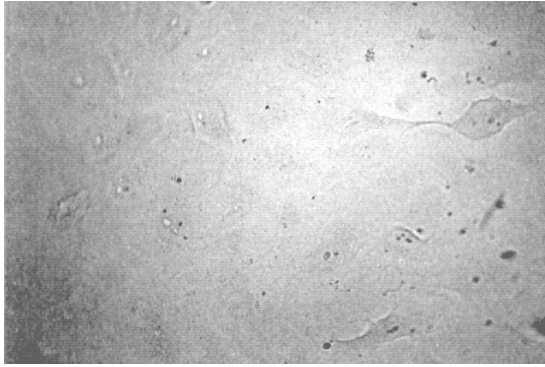


Abb. 3.11: Leerkontrolle

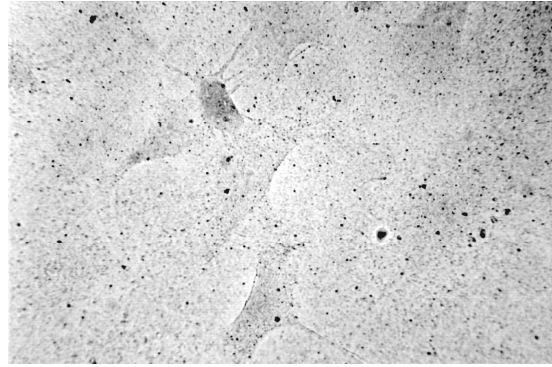


Abb. 3.12: ApoAI-Gold-Aufnahme über 60 Minuten bei 4°C

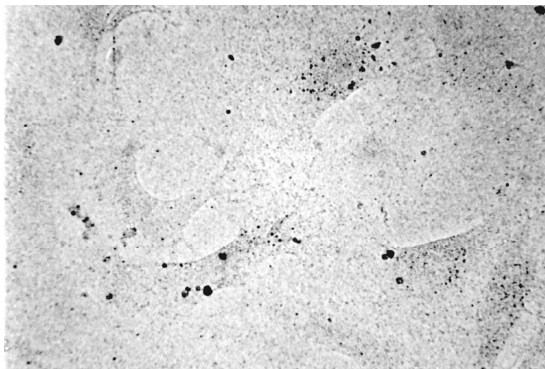


Abb. 3.13: ApoAI-Gold-Aufnahme über 15 Minuten bei 37°C

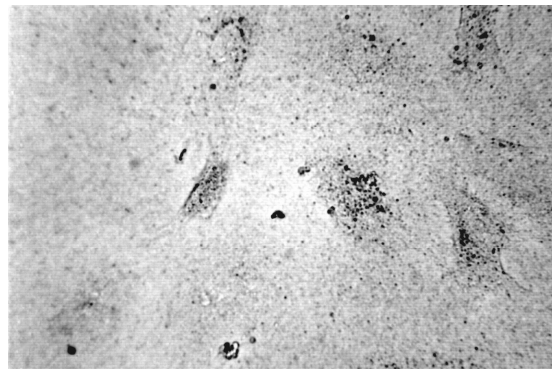


Abb. 3.14: ApoAI-Gold-Aufnahme über 60 Minuten bei 37°C

Der Einfluß der Temperatur auf die ApoAI-Zellassoziation wurde untersucht, indem die Zellen mit dem Beladungsmedium bei 4°C inkubiert wurden und mikroskopisch mit der bei 37°C inkubierten Probe verglichen wurde. (Abbildung 3.12, 3.14) Im Gegensatz zur 37°C Kontrolle zeigt die bei 4°C inkubierte Probe eine unspezifische Streuung des Markers über die gesamte Fläche des Zellkulturschälchens. Eine Akkumulation im Bereich der Zellen ist nicht ersichtlich. Somit ist anzunehmen, daß es sich hier um oberflächlich adhaerierende ApoAI-Goldkomplexe handelt, ohne daß eine Internalisierung derselben stattgefunden hat.

Allzu rabiante Abkühlungs- bzw. Aufwärmungsvorgänge beschädigten die Zellen. Morphologisch stellt sich die Schädigung als eine sphärische Deformierung der Zellen dar. Der Kontakt mit dem Untergrund geht verloren, die Zellen ziehen sich zum Kern hin zurück. Die Zell-Zell-Kontakte bleiben intakt, so daß die verbleibenden Ausläufer den Zellen ein sternförmiges Aussehen verleihen. Ein analoges Reaktionsmuster zeigte sich auch auf Waschkvorgänge mit kalziumfreiem Medium.

3.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Um den Weg des ApoAI durch Endothelzellen ultrastrukturell zu untersuchen, wurde eine Pulse-Chase Studie durchgeführt, bei der die untersuchten Zellen über verschiedene Zeiträume einer Suspension von goldgebundenem ApoAI ausgesetzt wurden.

Nach einer Applikationszeit von einer Stunde findet sich ein Teil des Markers oberhalb der Zellen, ein weiterer Teil ist bereits unter ihnen zu finden (Abbildungen 3.15, 3.21 - 3.23). Während er auf der Zelloberseite von nur wenig Material umgeben ist (Abbildung 3.15, Quadrate), ist der Komplex unterhalb der Endothelzellen von viel osmiophilem Material umgeben (Abbildung 3.15, Kreise). Dieses osmiophile Material besteht überwiegend aus Lipiden (Osmiumtetroxyd ist ein Lipidfärbemittel). Insgesamt entstehen rundliche Gebilde mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 50 nm (Abbildung 3.22 innerhalb der Kreise). Sie sind häufig in der Nähe von Caveolae aufzufinden.

Der Marker an der Zelloberfläche ist häufig in der Nähe von coated pits auffindbar (Abbildung 3.18, Quadrat). Des Weiteren läßt sich goldkonjugiertes ApoAI in clathrin-coated vesicles (Abbildung 3.16) und clathrinfreien kleinen Endosomen nachweisen. In diesen Endosomen findet eine starke Akkumulation der ApoAI-Partikel statt, die sich mit zunehmendem Wachstum der Endosomen verstärkt. (Abbildungen 3.16, 3.18).

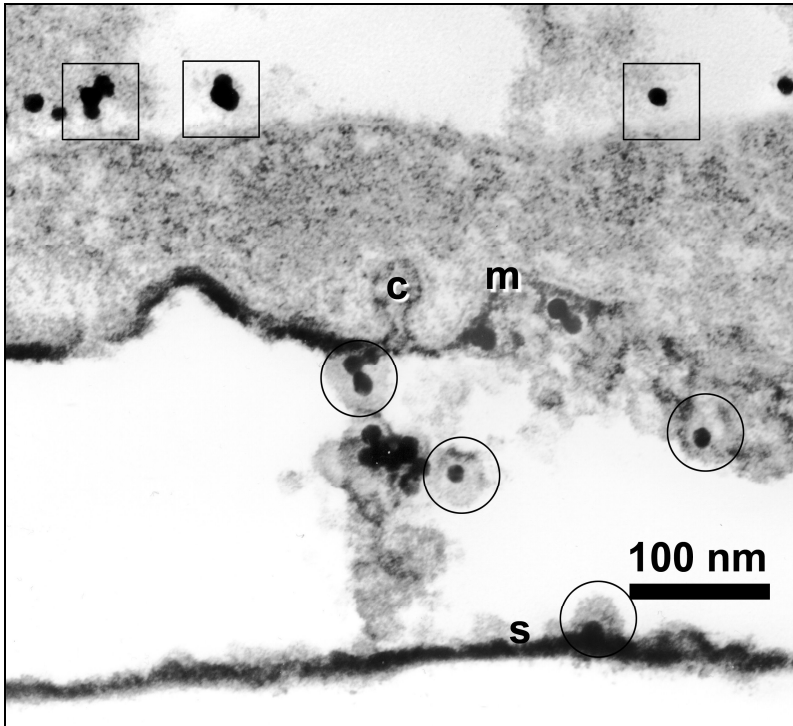
Ein weiteres Kompartiment, in dem sich goldgekoppeltes ApoAI finden läßt, sind intermediäre Vesikel. Sie erwecken aufgrund ihrer unregelmäßigen Form und heller Konturen zwischen den einzelnen Teilen den Eindruck, aus einzelnen, nicht vollständig verschmolzenen Vesikeln mit relativ einheitlicher Größe zu bestehen (Abbildung 3.17). Hier lagern große Mengen des ApoAI-Goldkomplexes, aber auch Lipidaggregate sind sichtbar.

Nahe der basalen Zellmembran finden sich kleine (small) Vesikel (SV), die ebenfalls goldmarkiertes ApoAI enthalten (Abbildungen 3.18, 3.19). Schon hier ist sichtbar, daß die ApoAI-Goldkomplexe von einer Schicht lipidpositiven Materials umgeben sind, die in derselben Weise angeordnet ist, wie bei den oben erwähnten subzellulär abgelagerten Markerpartikeln.

Die kleinen Vesikel scheinen mit einem weiter basal gelegenen caveolaeassoziierten tubulären System (CATS) zu verschmelzen (Abbildung 3.19). Es finden sich Caveolaeartige Strukturen, die ebenfalls goldmarkiertes ApoAI enthalten. Diese Strukturen sind um einen zentralen Tubulus gruppiert, der mit der basalen Plasmamembran kommuni-

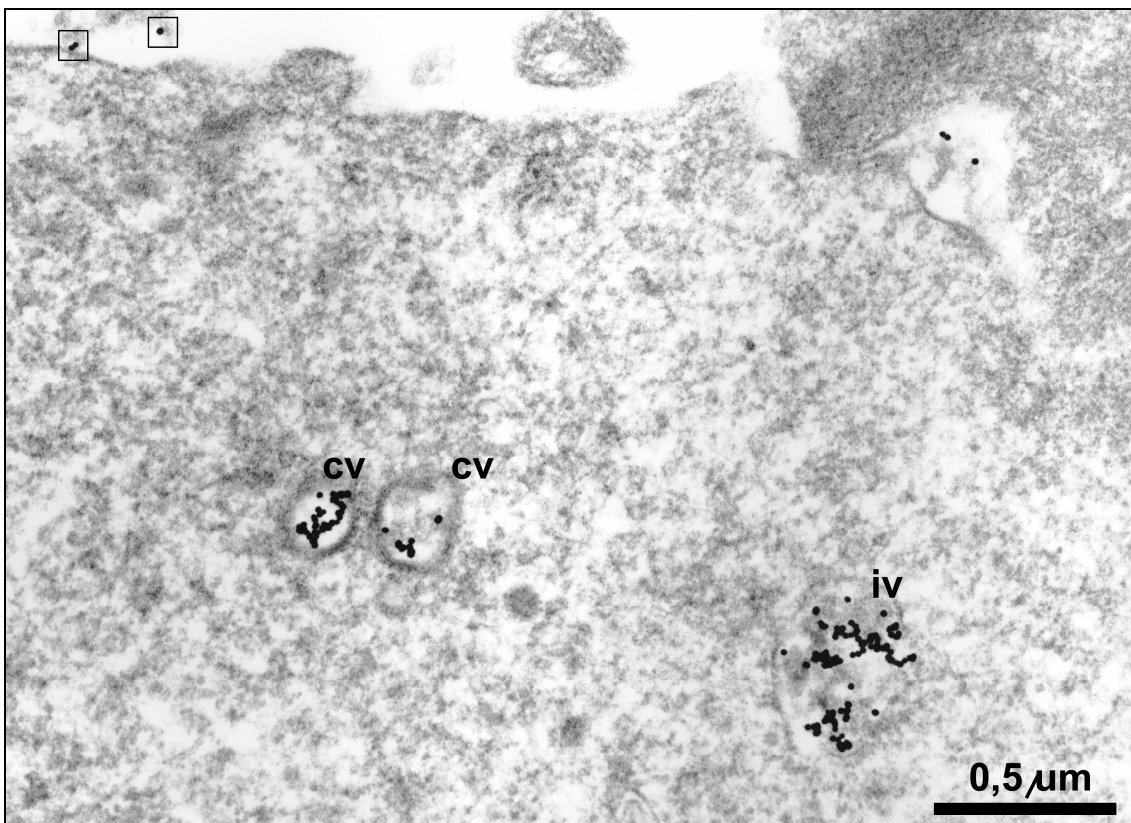
ziert. Die enthaltenen Markerkomplexe gleichen morphologisch denen in den kleinen Vesikeln (Abbildungen 3.19 - 3.21).

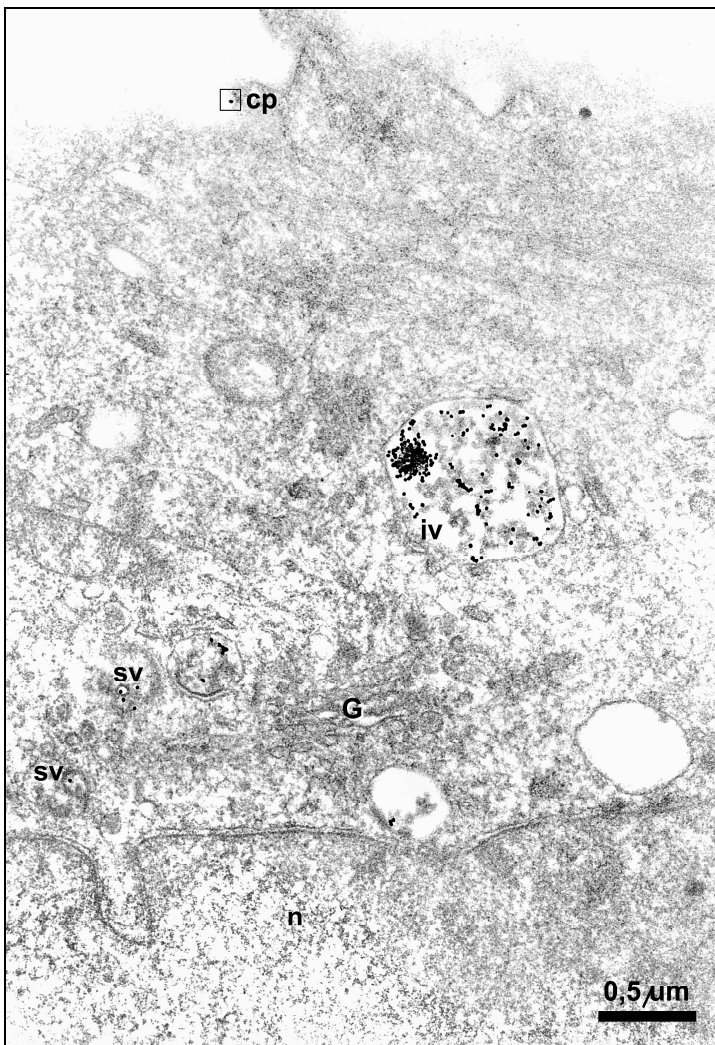
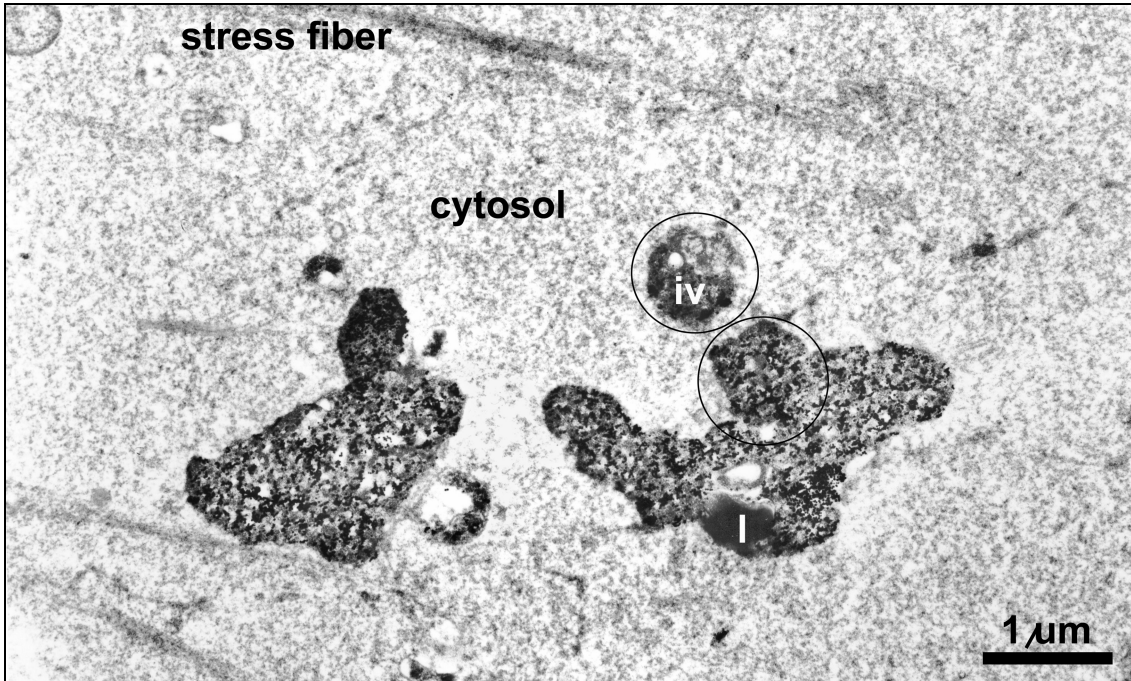
Die markerenthaltenden Caveolae an der basalen Zellmembran haben einen Durchmesser von durchschnittlich 70 nm. Die Caveolae scheinen sich abflachen zu können und entleeren somit ihren Inhalt mit dem Apo-AI-Goldkomplex in den Subzellularspalt (Abbildung 3.21).



◄ **Abbildung 3.15**
 (Vertikalschnitt)
 Vergleich von ApoAI-Goldkomplex apikal (Quadrat) und basal (lipidangereichert, Kreis)
 c = Caveolum
 m = basale Plasmamembran
 s = Substratum

▼ **Abbildung 3.16**
 (Vertikalschnitt)
 Goldmarkiertes ApoAI an der Zelloberfläche, in coated vesicles und Intermediären Vesikeln (IV)
 □ = ApoAI-Goldmarker an Zelloberfläche
 cv = Coated Vesicles





▲ **Abbildung 3.17**

(Vertikalschnitt)

Intrazelluläre Anreicherung und (vermutlicher) Ort der Modifikation in intermediären (iv), teils fusionierten Vesikeln (Kreis)
 stress fiber = Teil des Cytoskeletts
 l = Lipid assoziiert mit iv

◄ **Abbildung 3.18**

(Vertikalschnitt)

Aufnahme und intrazellulärer Transport des ApoAI-Goldkomplexes

cp = coated pit

□ = goldkonjugiertes ApoAI ohne Lipidschicht

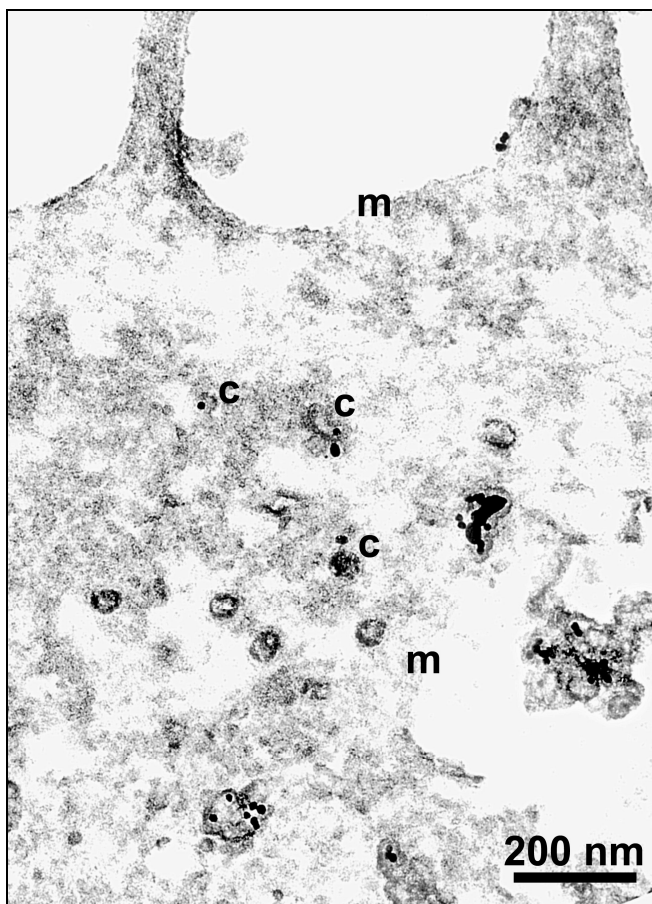
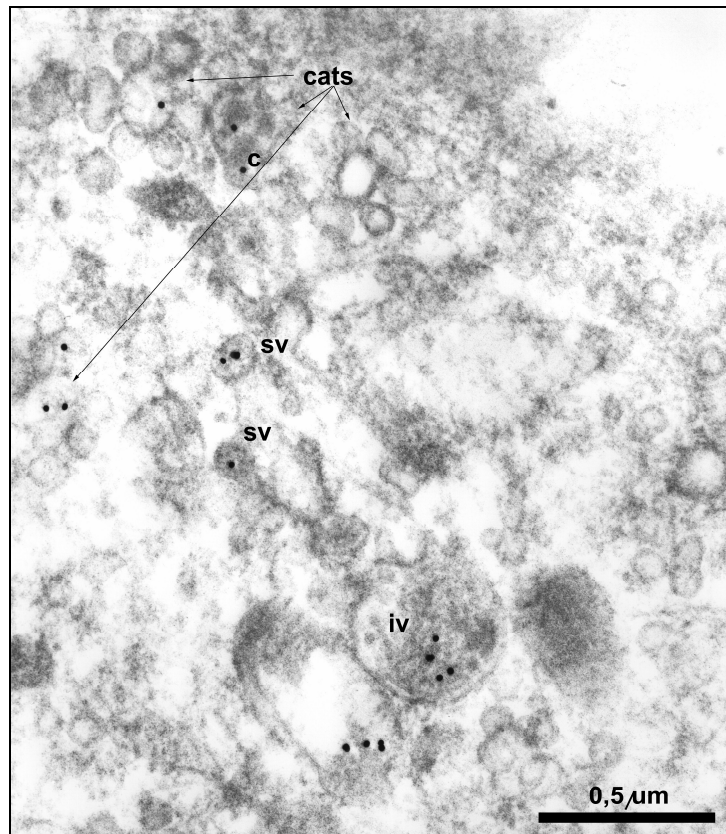
iv = intermediäres Vesikel

sv = sekretorisches Vesikel in der Nähe eines

G = Golgiapparates

n = Zellkern

► Abbildung 3.19
 (Horizontalschnitt)
 Der Marker in intermediären (iv) Vesikeln, kleinen Vesikeln (sv) und im Caveolae assoziierten tubulären System (cats). Diese finden sich oft in unmittelbarer Nachbarschaft.
 iv = intermediäres Vesikel
 sv = kleine Vesikel



◄ Abbildung 3.20
 (Horizontalschnitt)
 Lokalisation von ApoAI-Gold-Lipidkomplex in Caveolae (c) an der basalen Plasmamembran (m)

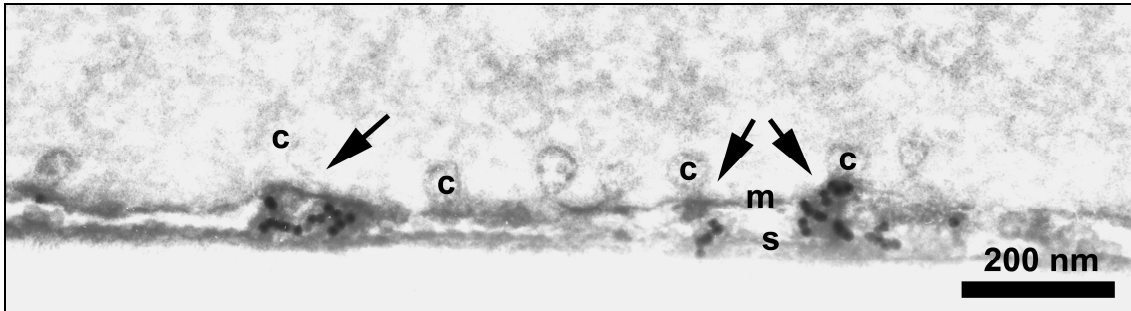


Abbildung 3.21 (Vertikalschnitt) Kolokalisation von basal abgelagertem ApoAI-Gold-Lipidkomplex (Pfeil) mit Caveolae (c), m = basale Plasmamembran, s = Substratum

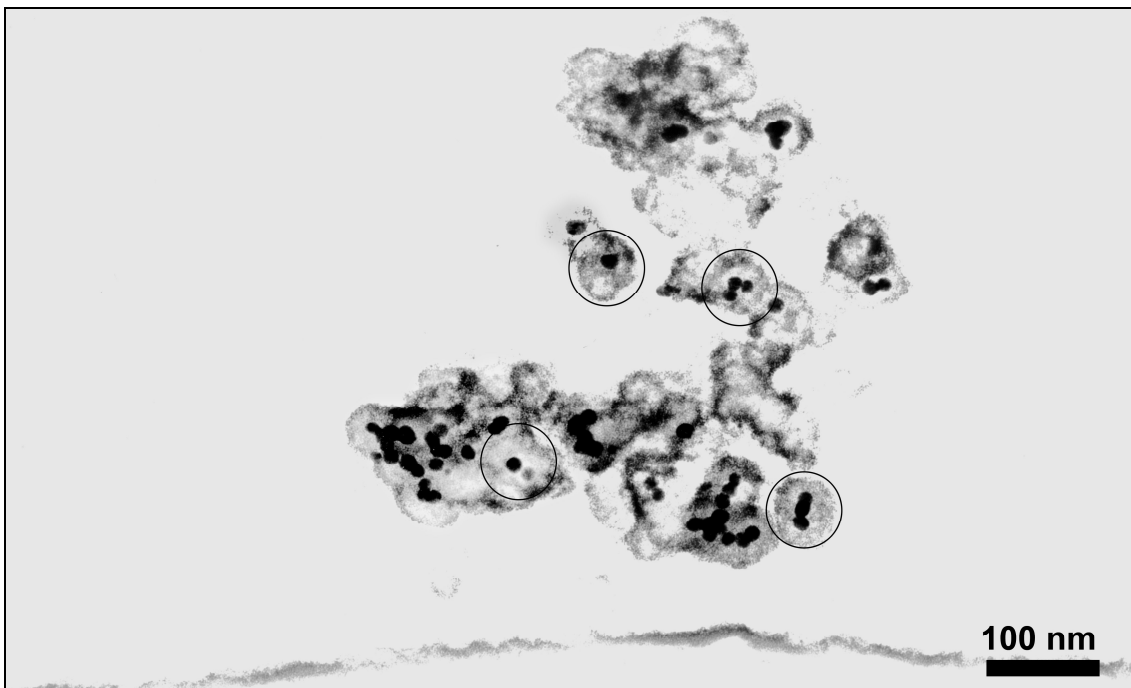


Abbildung 3.22 (Vertikalschnitt) ApoAI-Gold-Lipidkomplex, Kreisdurchmesser beträgt ca. 50 nm

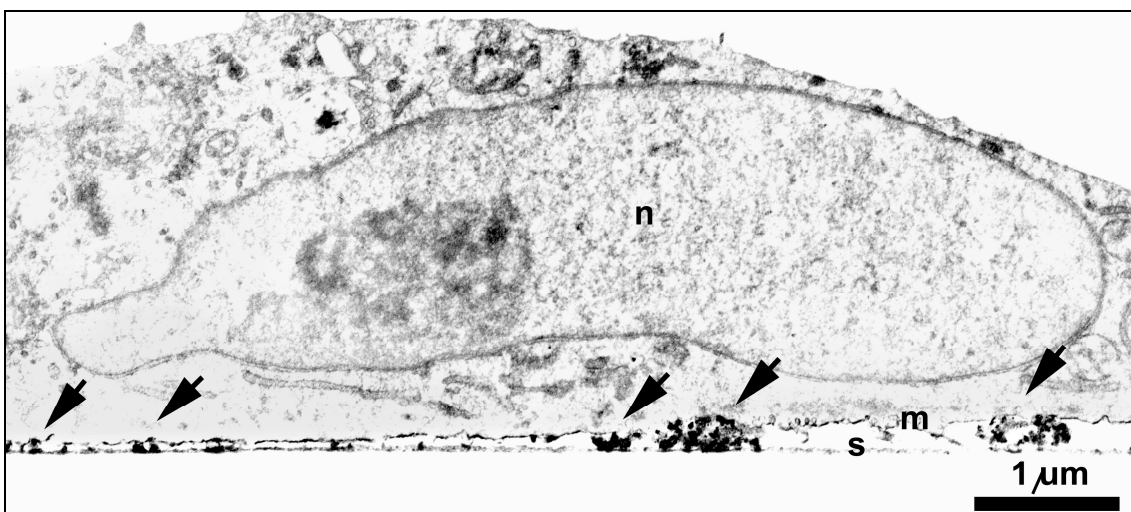


Abbildung 3.23 (Vertikalschnitt) subzelluläre Ablagerung von transzytiertem und modifiziertem ApoAI-Gold; N = Zellkern, m = basale Plasmamembran, s = Substratumschicht (auf Schalenboden), Pfeile = subzelluläre Ablagerungen von ApoAI-Gold-Lipidkomplex im Bereich von Caveolae unterhalb der Zellmitte

4 Diskussion

High Density Lipoproteine und ihre Apolipoproteine vermitteln den Hauptteil ihrer antiatherogenen Funktionen im vaskulären Interstitium und sind dort in hohen Konzentrationen nachweisbar. (28, 41, 43, 45, 68) Dies wirft zwangsläufig die Frage auf, auf welchem Wege diese Partikel aus dem Gefäßlumen durch die endotheliale Barriere gelangen.

Allgemein kann man unspezifische passive Transportvorgänge von spezifischen proteinvertmittelten und aktiven Prozessen unterscheiden. (39) Sie kommen für den transendothelialen Transport von Makromolekülen prinzipiell beide in Frage.

Ein unspezifischer Transport aus dem Lumen in das Interstitium kann durch parazelluläre Poren in den tight junctions, welche die Endothelzellen verbinden, erfolgen. (39) Ebenso sind defekte Endothelbereiche durchlässig für Makromoleküle. (45) Auch transzelluläre Kanäle aus verschmelzenden intrazellulären Vesikeln würden wie Poren wirken. (39) Eine passive Diffusion durch solche Strukturen kommt einem Filtervorgang gleich, bei dem kleine Moleküle die Öffnungen besser durchdringen könnten, als große. (39, 41, 45) Der Konzentrationsausgleich funktioniert hier ausschließlich durch Diffusionsdruck. Diese Transportform würde nur eine geringe Sättigbarkeit aufweisen und wäre durch Unterkühlung nicht so stark hemmbar, wie ein spezifischer proteingebundener Transport. (39)

Ein spezifischer und aktiver transzellulärer Transport ist an die Funktion von Proteinen gebunden. Die zu transportierende Substanz wird an der luminalen Zellseite rezeptorvermittelt aufgenommen und entlang des Zytoskeletts durch die Zelle transportiert, um auf der apikalen Seite reseziert zu werden. (39) Ein solcher Transport ist substanzspezifisch, sättigbar und durch Abkühlung und kompetitive Konkurrenten stark hemmbar. Für eine spezifische endozytische Aufnahme kommen im wesentlichen zwei Mechanismen in Frage: Eine clathrin- oder eine caveolaeabhängige Aufnahme. (39)

Bislang wurde von einem passiven und diffusionsgetriebenen Transport der Lipoproteine über die Endothelbarriere ausgegangen. (40) Ziel dieser Arbeit war es, Hinweise für einen transzellulären, spezifischen Transport zu finden.

In der Tat werden mit dieser Arbeit erstmals Anhaltspunkte für eine spezifische ApoAI-Aufnahme und -Abgabe durch die Zellen des Gefäßendothels geliefert. Sowohl bei der

Assoziation als auch bei der Dissoziation von fluoreszenzmarkierten ApoAI und Endothelzellen ist eine Zeitabhängigkeit zu beobachten, wobei sich beide einem Maximum annähern. (Abbildung 3.2, 3.8) Das Maximum stellt in beiden Fällen ein erreichtes steady state aus gleichzeitig erfolgender Assoziation und Dissoziation dar. Die Zeitabhängigkeit der Aufnahme konnte auch lichtmikroskopisch bestätigt werden.

Die Zellassoziation des fluoreszenzmarkierten ApoAI nimmt linear mit seiner Konzentration zu. (Abbildung 3.1) Allerdings konnte in dem von uns gewählten Konzentrationsbereich keine Sättigung beobachtet werden. Hier sollten weitere Experimente mit höheren ApoAI-Konzentrationen erfolgen, gegebenenfalls auch im supraphysiologischen Bereich, um mit einer eventuell sichtbaren Sättigungscharakteristik ein weiteres Indiz für die Spezifität des Vorganges zu liefern.

Ein wichtiger Hinweis für die Spezifität der Aufnahme und Abgabe ist ihre Temperaturabhängigkeit. (Abbildung 3.4, 3.9) Bei den fluoreszenzphotometrischen Experimenten führt eine Abkühlung der Zellen von 37°C auf 4°C zu einer Halbierung der Assoziation bzw. Dissoziation. Wahrscheinlich reflektieren die Befunde bei 4°C die oberflächliche Rezeptorbindung des Markers, während die zellassoziierte Menge bei 37°C die Summe aus der gebundenen und der internalisierten Menge widerspiegelt.

Auch sind Zellassoziation und -dissoziation des ApoAI abhängig von bivalenten Kationen. (Abbildung 3.7) Eine Zugabe von Nickel bzw. Mangan führt zu einer wesentlichen Steigerung der Zellassoziation. Kalziumzug hingegen (durch den Chelator EGTA) führt zu einer wesentlichen Assoziationsminderung. Bivalente Kationen, wie z.B. Kalzium, spielen eine Rolle sowohl im Stoffwechsel der Caveolae, als auch der Clathrinabhängigen Endozytose und Exozytose. (42) Der intrazelluläre Kalziumgehalt, der sich direkt regulatorisch auf die angesprochenen Prozesse auswirkt, wird über die Funktion von Kalziumkanälen in der Zellmembran durch die extrazelluläre Kalziumkonzentration beeinflusst. Kritisch angemerkt werden muß jedoch, daß bei den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten eine Klärung, ob sich die Kationenkonzentration auf die Assoziation oder Dissoziation auswirkt, nicht möglich ist.

Der ApoAI-Aufnahmeprozess kann kompetitiv durch natives ApoAI gehemmt werden. (Abbildung 3.5) Dies ist als weiterer aussagekräftiger Hinweis für Spezifität und Sättigbarkeit des Vorganges zu werten. Diese Beobachtung beweist, daß natives und fluoreszenzmarkiertes ApoAI über denselben Weg mit der Zelle assoziieren und somit

konkurrieren. Auch ist die ApoAI-Aufnahme durch modifiziertes (acetyliertes) LDL hemmbar. (Abbildung 3.6) Hier lassen sich Rückschlüsse auf die an der ApoAI-Aufnahme beteiligten Rezeptoren ziehen.

Eine Steroidregulation der ApoAI-Assoziation und -Dissoziation durch Testosteron bzw. Östradiol konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Testosteron und Östradiol üben diverse Funktionen im Lipoproteinstoffwechsel aus. (68) Beispielsweise wirken sie als Regulatoren der Apolipoproteinsynthese. Testosteron hemmt die ApoAI-Synthese, wohingegen es die Syntheserate der Hepatischen Lipase steigert. Östradiol stimuliert die ApoAI- und ApoE-Synthese und hemmt die Synthese der Hepatischen Lipase.

Da wir kein Transwell-System eingesetzt haben, lassen die Daten zur Assoziation und Dissoziation keinen direkten Rückschluß darüber zu, ob eine Transzytose vorliegt. Indirekte Hinweise ergeben sich aus unseren elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Auf morphologischer Ebene ist ein elektronenmikroskopischer Nachweis von goldmarkiertem ApoAI in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten gelungen, ein starker Hinweis auf einen gerichteten transzellulären ApoAI-Transport. Dieser könnte mit Hilfe sekretorischer Vesikel bzw. Caveolae stattfinden.

Inzwischen wurden die hier beschriebenen Experimente von der Arbeitsgruppe von von Eckardstein in Zürich modifiziert. Durch Einsatz von radiojodiertem ApoAI und eines Transwellsystems wurden die in dieser Arbeit erhobenen Befunde im Prinzip bestätigt. Außerdem wurde nachgewiesen, daß aortale Gefäßzellen radiojodiertes ApoAI stärker apikal als basolateral binden, internalisieren und großteils undegradiert resezernieren.

Bezüglich des beobachteten Transportvorganges ist es notwendig, über die Art der beteiligten Rezeptoren Klarheit zu erlangen, die zu einer Aufnahme des ApoAI führen und nachfolgend nicht in einen proteindegradierenden Stoffwechselweg einmünden. Mögliche Kandidaten sind HDL- oder ApoAI bindende Proteine, wie *Scavengerrezeptor B1* (SR-B1) oder der *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1), welcher bei der Tangier-Krankheit defekt ist. Allerdings wird die Expression von ABCA1 in Endothelzellen in der Literatur noch kontrovers diskutiert. (10,27)

In nachfolgenden Arbeiten der Arbeitsgruppe von von Eckardstein in Zürich wurde die Expression von ABCA1, SR-B1, CD36 und Cubilin in aortalen Rinderendothelzellen

nachgewiesen. In einem ersten Schritt wird man die Beteiligung dieser Kandidaten mit Hilfe von Inhibitoren und siRNA ausschließen oder nachweisen.

Wie bereits erwähnt, bestehen verschiedene Möglichkeiten der Aufnahme und des Transports von Makromolekülen durch Zellen. Es handelt sich häufig, aber nicht immer um vesikulären Transport. Hierbei sind clathrinabhängige und -unabhängige Wege beschrieben worden.

Wir konnten goldmarkiertes ApoAI elektronenmikroskopisch in Clathrin-coated pits, intrazellulären Vesikeln und Caveolae nachweisen. (Abbildungen 3.15-3.23) Allerdings lassen diese Beobachtungen keine Rückschlüsse darüber zu, in welcher zeitlichen Reihenfolge die einzelnen Prozesse ineinandergreifen. Ferner läßt sich keine Aussage darüber treffen, ob eine clathrinabhängige Endozytose überhaupt in z.B. eine Caveolae-vermittelte Resekretion des ApoAI mündet. Eine solche Interaktion zwischen Clathrin- und caveolinabhängigen Prozessen wurde bislang nicht nachgewiesen.

Es ist deshalb auch denkbar, daß zwei voneinander unabhängige ApoAI-Transportwege bestehen. Zum einen könnte eine clathrinvermittelte Endozytose einen vesikulären Transport einleiten, der ApoAI dem lysosomalen Abbau zuführt. Auf der anderen Seite könnte eine durch Caveolae vermittelte sekretorische Route durch die Zellen existieren. Tatsächlich wurde in der Züricher Arbeitsgruppe gezeigt, daß internalisiertes ApoAI teilweise intrazellulär degradiert und teilweise intakt reseziert wird. Die Bindung von Liganden an Rezeptoren, die sich in clathrin-coated pits befinden (z.B. LDL an den LDL-Rezeptor oder Transferrin an den Transferrin-Rezeptor), führt zu einer Internalisierung in Clathrin-coated vesicles und der Fusion mit Endosomen. Nach der Separation von Rezeptor und Ligand wird der Rezeptor zurück zur Zellmembran transportiert und auf diese Weise zum erneuten Einsatz „recycled“, wo hingegen der Ligand oft zum Abbau direkt in Lysosomen transportiert wird. (5)

Clathrinunabhängige Aufnahme- und Abgabevorgänge werden z.B. durch aktinabhängige makropinozytotische Vesikel oder Caveolae vermittelt. Caveolae zeigen sich als flaschenförmige Invaginationen der Plasmaembran. Sie weisen einen hohen Gehalt an Cholesterin und Glykosphingolipiden auf. In ihren Membranen finden sich sowohl Rezeptoren für die Endozytose extrazellulärer Liganden, als auch Proteine, die für das

„cellular signaling“ verantwortlich sind. (35, 52, 56) Diese kombinierten Eigenschaften sind beispielsweise von Lipoproteinrezeptoren bekannt. (22, 36)

Die Ergebnisse unserer morphologischen Untersuchungen legen nahe, daß endozytiertes ApoAI in Caveolae transportiert wird. Wir haben dies bislang noch nicht auf molekularer Ebene nachgewiesen. Caveolae sind definiert als Regionen, die Cholesterinbindungsproteine, sogenannte Caveoline enthalten. (35, 52, 56) Es konnte beispielsweise gezeigt werden, daß Caveolae eine entscheidende Rolle bei der Transzytose von Albumin und α 1-azidischem Glycoprotein durch das Gefäßendothel in den perivaskulären Raum spielen. (29, 57) Caveolin-1 defiziente Zellen zeigen einen Defekt in der Aufnahme und dem Transport von Albumin. (51, 57) Allerdings zeigen Caveolin-defiziente Mäuse keinen Transzytosedefekt. Eine Interaktion zwischen Caveolin-1 und ApoAI wurde bislang nicht gezeigt. Adenovirus-vermittelte Expression von Caveolin-1 in Mauslebern führt zu einer Erhöhung des Plasma-HDL-Spiegels. Dies könnte durch eine Hemmung der SR-B1-vermittelten selektiven Aufnahme von HDL und durch erhöhte hepatische ApoAI-Sekretion verursacht sein. (13)

Das von den Zellen resezerierte ApoAI besitzt nach unseren elektronenmikroskopischen Daten eine osmiophile Hülle, die aus Lipiden besteht. Dies ist ein Hinweis für eine während des transzellulären Transportes stattfindende Lipidierung der Apolipoproteine. Es konnte bereits gezeigt werden, daß die Anwesenheit von lipidfreiem ApoAI bei Endothelzellen zu einer Dissoziation von Phospholipiden, nicht jedoch Cholesterin führt. (10) Diese Komplexe aus Phospholipiden und ApoAI sind gute Akzeptoren für Cholesterin von vaskulären glatten Muskelzellen. Es ist somit möglich, daß die Interaktion von ApoAI mit Endothelzellen zur Bildung von HDL-Vorstufen führt, die als Akzeptoren von zellulärem Cholesterin, welches von glatten Muskelzellen oder Makrophagen der Arterienwand stammt, sehr gut geeignet sind. (10) Zusammen mit unseren Ergebnissen liegt die Annahme nahe, daß die Transzytose von ApoAI durch Endothelzellen zwei wichtige Funktionen erfüllt: Die Bereitstellung von ApoAI und HDL-Vorstufen in der Arterienwand und die Bildung aktiver Cholesterinakzeptoren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass wir erste Hinweise dafür gefunden haben, daß ApoAI einem transzellulären Transport durch die Endothelzellbarriere unterliegt und auf diese Weise in den extraluminale Raum gelangt. Da ApoAI und HDL einen großen Teil ihrer antiatherogenen Eigenschaften in der Gefäßwand und somit außerhalb des

Arterienlumens vermitteln, könnte dies ein limitierender Schritt der für die antiatherogenen Eigenschaften des HDL sein, den Reversen Cholesterintransportes eingeschlossen.

Wichtige Aufgaben für die Zukunft sind deshalb die Identifikation und weitere Charakterisierung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Dazu gehören die Identifikation der beteiligten Rezeptoren und deren Regulation, die Differenzierung zwischen ApoAI-degradierenden und -transportierenden Strukturen und die Identifikation der an der Resekretion beteiligten Effektoren. Mit Hilfe genauer Kenntnisse dieser Vorgänge könnte in Zukunft eine pharmakologische Beeinflussung möglich werden, deren Ziel eine Verlangsamung der Atherogenese und insgesamt eine Morbiditäts- und Mortalitätsenkung sein könnte.

Literaturverzeichnis

1. Anderson KM, Castelli WP, Levy D (1987) Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA* 257: 2176-80.
2. Assmann G, Cullen P, Schulte H (1998) The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J* 19 Suppl A: A2-11.
3. Asztalos BF, Sloop CH, Wong L, Roheim PS (1993) Comparison of apo A-I-containing subpopulations of dog plasma and prenodal peripheral lymph: evidence for alteration in subpopulations in the interstitial space. *Biochim Biophys Acta* 1169: 301-4.
4. Basu SK, Goldstein JL, Anderson GW, Brown MS (1976) Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 3178-82.
5. Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 517-68.
6. Cullen P, Schulte H, Assmann G (1998) Smoking, lipoproteins and coronary heart disease risk. Data from the Munster Heart Study (PROCAM). *Eur Heart J* 19: 1632-41.
7. Cullen P, Von Eckardstein A, Assmann G (1998) Diagnosis and management of new cardiovascular risk factors. *Eur Heart J* 19 Suppl O: O13-9.
8. DeLuca HF (1992) New concepts of vitamin D functions. *Ann N Y Acad Sci* 669: 59-68; discussion 68-9.
9. Despres JP, Lemieux I, Dagenais GR, Cantin B, Lamarche B (2000) HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Quebec cardiovascular study. *Atherosclerosis* 153: 263-72.
10. Fielding PE, Nagao K, Hakamata H, Chimini G, Fielding CJ (2000) A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1. *Biochemistry* 39: 14113-20.
11. Fraenkel-Conrat H (1957). Methods for Investigating the Essential Groups for Enzyme Activity. In S. u. K. N. Colowick (Ed.), *Methods in Enzymology* (pp. Volume 4, 247-269). Academic Press, New York.
12. Francone OL, Subbaiah PV, van Tol A, Royer L, Haghpassand M (2003) Abnormal phospholipid composition impairs HDL biogenesis and maturation in mice lacking ABCA1. *Biochemistry* 42: 8569-78.
13. Frank PG, Pedraza A, Cohen DE, Lisanti MP (2001) Adenovirus-mediated expression of caveolin-1 in mouse liver increases plasma high-density lipoprotein levels. *Biochemistry* 40: 10892-900.
14. Frens G (1973) Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature* 241: 20-22.

15. Fuchs M (2003) Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Regulation of bile acid synthesis: past progress and future challenges. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G551-7.
16. Ginsberg HN (1998) Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27: 503-19.
17. Glass CK, Witztum JL (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104: 503-16.
18. Graf GA, Yu L, Li W, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH (2003) ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* 278: 48275-82.
19. Guerin M, Le Goff W, Lassel TS, Van Tol A, Steiner G, Chapman MJ (2001) Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL(1) and dense LDL in type 2 diabetes : impact of the degree of triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 282-8.
20. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34: 1345-53.
21. Hersberger M, Von Eckardstein A (2003) Low high-density lipoprotein cholesterol: physiological background, clinical importance and drug treatment. *Drugs* 63: 1907-45.
22. Herz J, Gotthardt M, Willnow TE (2000) Cellular signalling by lipoprotein receptors. *Curr Opin Lipidol* 11: 161-6.
23. Huuskonen J, Olkkonen VM, Ehnholm C, Metso J, Julkunen I, Jauhiainen M (2000) Phospholipid transfer is a prerequisite for PLTP-mediated HDL conversion. *Biochemistry* 39: 16092-8.
24. Jaspard B, Fournier N, Vieitez G, Atger V, Barbaras R, Vieu C, Manent J, Chap H, Perret B, Collet X (1997) Structural and functional comparison of HDL from homologous human plasma and follicular fluid. A model for extravascular fluid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1605-13.
25. Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F (1997) Relation of high TG-low HDL cholesterol and LDL cholesterol to the incidence of ischemic heart disease. An 8-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1114-20.
26. Kyhse-Andersen J (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10: 203-9.
27. Liao H, Langmann T, Schmitz G, Zhu Y (2002) Native LDL upregulation of ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 127-32.
28. Lindstedt L, Lee M, Castro GR, Fruchart JC, Kovanen PT (1996) Chymase in exocytosed rat mast cell granules effectively proteolyzes apolipoprotein AI-containing lipoproteins, so reducing the cholesterol efflux-inducing ability of serum and aortic intimal fluid. *J Clin Invest* 97: 2174-82.

29. Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126: 111-26.
30. Liscum L, Munn NJ (1999) Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1438: 19-37.
31. Lisurek M, Bernhardt R (2004) Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level. *Mol Cell Endocrinol* 215: 149-59.
32. London FS (2003) The protein kinase C inhibitor RO318220 potentiates thrombin-stimulated platelet-supported prothrombinase activity. *Blood* 102: 2472-81.
33. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.
34. Manninen V, Tenkanen L, Koskinen P, Huttunen JK, Manttari M, Heinonen OP, Frick MH (1992) Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. Implications for treatment. *Circulation* 85: 37-45.
35. Matveev S, Li X, Everson W, Smart EJ (2001) The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Adv Drug Deliv Rev* 49: 237-50.
36. May P, Bock HH, Herz J (2003) Integration of endocytosis and signal transduction by lipoprotein receptors. *Sci STKE* 2003: PE12.
37. McGovern PG, Pankow JS, Shahar E, Doliszny KM, Folsom AR, Blackburn H, Luepker RV (1996) Recent trends in acute coronary heart disease-mortality, morbidity, medical care, and risk factors. The Minnesota Heart Survey Investigators. *N Engl J Med* 334: 884-90.
38. Mezdour H, Clavey V, Kora I, Koffigan M, Barkia A, Fruchart JC (1987) Anion-exchange fast protein liquid chromatographic characterization and purification of apolipoproteins A-I, A-II, C-I, C-II, C-III0, C-III1, C-III2 and E from human plasma. *J Chromatogr* 414: 35-45.
39. Michel CC, Curry FE (1999) Microvascular permeability. *Physiol Rev* 79: 703-61.
40. Nanjee MN, Cooke CJ, Olszewski WL, Miller NE (2000) Concentrations of electrophoretic and size subclasses of apolipoprotein A-I-containing particles in human peripheral lymph. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2148-55.
41. Nielsen LB, Nordestgaard BG, Stender S, Niendorf A, Kjeldsen K (1995) Transfer of lipoprotein(a) and LDL into aortic intima in normal and in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1492-502.
42. Nilius B, Droogmans G (2001) Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81: 1415-59.
43. Nofer J, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, Von Eckardstein A (2002) HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 161: 1-16.

44. Norata GD, Callegari E, Inoue H, Catapano AL (2004) HDL₃ induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 871-7.
45. Nordestgaard BG, Nielsen LB (1994) Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 5: 252-7.
46. Nykjaer A, Willnow TE (2002) The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? *Trends Cell Biol* 12: 273-80.
47. Oram JF, Vaughan AM (2000) ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 11: 253-60.
48. PromoCell Herstellungsanleitung für die Isolierung humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC).
49. Rader DJ, Jaye M (2000) Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family. *Curr Opin Lipidol* 11: 141-7.
50. Ramirez M, Amate L, Gil A (2001) Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum Dev* 65 Suppl: S95-S101.
51. Razani B, Lisanti MP (2001) Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J Clin Invest* 108: 1553-61.
52. Razani B, Lisanti MP (2001) Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships. *Exp Cell Res* 271: 36-44.
53. Rye KA, Clay MA, Barter PJ (1999) Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 145: 227-38.
54. Santamarina-Fojo S, Dugi KA (1994) Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 5: 117-25.
55. Scanu AM, Edelstein C (1971) Solubility in aqueous solutions of ethanol of the small molecular weight peptides of the serum very low density and high density lipoproteins: relevance to the recovery problem during delipidation of serum lipoproteins. *Anal Biochem* 44: 576-88
56. Schnitzer JE (2001) Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 49: 265-80.
57. Schubert W, Frank PG, Razani B, Park DS, Chow CW, Lisanti MP (2001) Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem* 276: 48619-22.
58. Schulte H, Cullen P, Assmann G (1999) Obesity, mortality and cardiovascular disease in the Munster Heart Study (PROCAM). *Atherosclerosis* 144: 199-209.
59. Seligman AM, Wasserkrug HL, Hanker JS (1966) A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing membranes and droplets in osmium tetroxide-fixed tissue with osmiophilic thiocarbohydrazide (TCH). *J Cell Biol* 30: 424-32.

60. Shelness GS, Sellers JA (2001) Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 12: 151-7.
61. Simionescu M, Simionescu N (1991) Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev* 25: 5-78.
62. Smith JD, Le Goff W, Settle M, Brubaker G, Waelde C, Horwitz A, Oda MN (2004) ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 45: 635-44.
63. Statistisches Bundesamt Deutschland (2002). Todesursachenstatistik BRD.
64. Sugiyama S, Kugiyama K, Matsumura T, Suga S, Itoh H, Nakao K, Yasue H (1995) Lipoproteins regulate C-type natriuretic peptide secretion from cultured vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1968-74.
65. Völker W, Schon P, Vischer P (1991) Binding and endocytosis of thrombospondin and thrombospondin fragments in endothelial cell cultures analyzed by cuprolinic blue staining, colloidal gold labeling, and silver enhancement techniques. *J Histochem Cytochem* 39: 1385-94.
66. Völker W FV (1993). A two-component silver enhancement method. *Procedures in Electron Microscopy* (pp. 8: 1.2, 1.22 - 1.26).
67. Von Eckardstein A, Funke H, Walter M, Altland K, Benninghoven A, Assmann G (1990) Structural analysis of human apolipoprotein A-I variants. Amino acid substitutions are nonrandomly distributed throughout the apolipoprotein A-I primary structure. *J Biol Chem* 265: 8610-7.
68. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G (2001) High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 13-27.
69. Von Eckardstein A, Walter M, Holz H, Benninghoven A, Assmann G (1991) Site-specific methionine sulfoxide formation is the structural basis of chromatographic heterogeneity of apolipoproteins A-I, C-II, and C-III. *J Lipid Res* 32: 1465-76.
70. Westermeier R (1997). *Electrophoresis in Practice*. VCH Verlagsgesellschaft mbH.

Präsentation

„Transzytose von Apolipoprotein A-I durch Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen.“ Vortrag auf der 31. Jahrestagung des Arbeitskreises „Klinischer Lipidstoffwechsel“, Maikammer, 29.11. bis 1.12.2001

Danksagung

Für die Zurverfügungstellung des Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung während der Arbeit möchte ich vor allem Herrn Prof. Dr. Arnold von Eckardstein danken, der mir mit Rat und vielen Anregungen immer zur Seite stand, dies auch nach seinem Ruf nach Zürich.

Herrn Prof. Dr. Gerd Assmann danke ich für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin für die freundliche Aufnahme und nette Arbeitsatmosphäre, besonders der Arbeitsgruppe von Prof. von Eckardstein.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Alois Roetrige, der mir die grundlegenden Techniken der Laborarbeit beibrachte und mir bei vielen Arbeitsschritten maßgeblich half. Ich entschuldige mich an dieser Stelle für den Verlust seines Lieblingsrührfisches.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Wolfgang Völker und Herrn Daniel Ziomek für die immense Hilfe bei der Licht- und Elektronenmikroskopie und die Erstellung der gelungenen Bilder danken.

Herrn PD Dr. Bodo Levkau und seiner Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die Hilfe bei der Zellkultur und die wertvollen Anregungen für die Planung einiger Experimente.

Last but not least danke meiner Familie und meinen Freunden für die Geduld und Unterstützung während der Arbeit an dieser Dissertation.

Lebenslauf

von Marc Alexander Schlüter

21.12.1977 Geburt in Dortmund als Sohn von Dr. med. Hans-Joachim Schlüter (Facharzt für Innere Medizin) und Dr. med. Margarete Schlüter (Fachärztin für Gynäkologie)

Familienstand Ledig

Schulbildung

08/84-06/97 Besuch der Landgrafen-Grundschule und des Käthe-Kollwitz-Gymnasiums in Dortmund, dort Abitur und Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Studium

10/97-04/04 Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster (WWU), Abschluß nach zwölf Fachsemestern

09/99 Beginn der Promotionsarbeit am Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Münster

Praktische Ausbildung

06/98-07/98 Krankenpflegepraktikum im St. Johanneshospital, Dortmund

02/00-03/00 Famulatur am Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Münster

02/01-03/01 Chirurgie-Praxisfamulatur (Dr. S. Al-Bazaz, Dortmund)

03/02-04/02 Neurologie-Famulatur, Städtische Kliniken Dortmund

08/02-09/02 Kardiologie-Famulatur im Royal Northshore Hospital, Sydney, Australien

04/03-08/03 PJ-Tertial am Institut für klinische Radiologie des Universitätsklinikums Münster

08/03-11/03 PJ-Tertial in der Abteilung für Innere Medizin des Karl Bremer Hospitals, Kapstadt, Südafrika

12/03-03/04 PJ-Tertial in der Klinik für Allgemein- und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Münster

Weiterbildung

09/04 Beginn der Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik D für Nephrologie, Hypertonie und allgemeine Innere Medizin des Universitätsklinikums Münster

10/04 Anstellung als Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik D des Universitätsklinikums Münster bei Abschaffung des AiP

Außeruniversitäre Tätigkeiten

02/96-02/02 Wehersatzdienst im Katastrophenschutz, Sanitätszug des Arbeitersamariterbundes (ASB), Ortsverband Dortmund

09/97 Examinierung zum Rettungssanitäter mit nachfolgender ehrenamtlicher Tätigkeit im Rettungsdienst Dortmund