

Aus der Klinik für Neonatologie, Campus Charité Mitte
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Regulation der Expression von Scavenger Receptor BI (SR-BI) und des
bidirektionalen Cholesterolflox durch den Cholesterol- und Vitamin-E-
Gehalt in HepG2-Zellen und High Density Lipoproteinen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Payman Barikbin

aus Elmshorn

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. sc. nat. B. Rüstow
 2. Prof. Dr. med. E. Köttgen
 3. Prof. Dr. rer. nat. F. Spener

Datum der Promotion: 18.10.2004

1.	EINLEITUNG.....	6
1.1	Vitamin E	6
1.2	Cholesterol	7
1.3	Scavenger Receptor B I.....	9
2.	AUFGABENSTELLUNG	12
3.	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	Materialien	13
3.1.1	Chemikalien	13
3.1.2	Zelllinien	13
3.2	Geräte und Hilfsmittel.....	13
3.3	Methoden.....	14
3.3.1	Lipoprotein-Gewinnung.....	14
3.3.2	Proteinbestimmung.....	14
3.3.3	Cholesterolbestimmung.....	14
3.3.4	Vitamin-E-Bestimmung	14
3.3.5	Effekt des Vitamin-E-Gehalts von HDL auf die Aufnahme von Cholesterol und Vitamin E in HepG2-Zellen	14
3.3.6	Einfluß des zellulären Vitamin-E-Gehalts auf die Expression von PKC α und SR-BI und auf den Cholesterolefflux	16
3.3.7	Einfluß des zellulären Cholesterolgehalts auf die Expression von PKC α und SR-BI und auf den Cholesterolefflux	16
3.3.8	Einfluß der zellulären Cholesterolanreicherung auf die Vitamin-E- und Cholesterol-Aufnahme aus HDL.....	17
3.3.9	Membranpräparation	18
3.3.10	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	19
3.3.11	Western Blot.....	21
3.3.12	Statistik.....	22
4.	ERGEBNISSE.....	23
4.1	Effekt des Vitamin-E-Gehalts von HDL auf die Aufnahme von Cholesterol und Vitamin E in HepG2-Zellen.....	23
4.2	Einfluß des zellulären Vitamin-E-Gehalts auf die Expression von PKC α und SR-BI und auf den Cholesterolefflux	26
4.3	Einfluß des zellulären Cholesterolgehalts auf die Expression von PKC α und SR-BI und auf den bidirektionalen Cholesterolflux	29

5. DISKUSSION	33
5.1 Effekt des Vitamin-E-Gehalts von HDL auf die Aufnahme von Cholesterol und Vitamin E in Hep G2-Zellen.....	33
5.2 Einfluß des zellulären Vitamin-E-Gehalts auf die Expression von PKC α und SR-BI und auf den Cholesterolefflux	36
5.3 Einfluß des zellulären Cholesterolgehalts auf die Expression von PKC α und SR-BI und auf den bidirektionalen Cholesterolflux	38
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	40
7. LITERATUR.....	42

Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ApoE	Apolipoprotein E
BCA	Bicinchonic Acid
BMS	Basales Medium-Supplement
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CE	Cholesterolester
Chol	Cholesterol
DPM	disintegrations per minute
DTT	Dithiothreitol
ER	Endplasmatisches Retikulum
FKS	Fetales Kälberserum
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kD	Kilodalton
KO	Knockout
LDL	Low Density Lipoprotein
MMP	Magermilchpulver
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
M- β -CD	Methyl- β -Cyclodextrin
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PKC	Proteinkinase C
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SR-BI	Scavenger Receptor B I
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
TG	Triglycerid
VitE	Vitamin E
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
wt/v	weight per volume

1. EINLEITUNG

AKTUELLER WISSENSSTAND

1.1 Vitamin E

Funktion als Antioxidans

Vitamin E ist der Oberbegriff für eine Gruppe von lipophilen Antioxidantien, von denen besonders das α -Tocopherol von Bedeutung ist. Diese sind in der Lage, durch Reaktion mit organischen Peroxylradikalen Reaktionsketten zu unterbrechen und damit Lipide vor der oxidativen Schädigung zu schützen. Dies gilt insbesondere für mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Zellmembranen und Lipoproteinen [1, 2].

Klinische Bedeutung

Da die Lipid-Peroxidation in Low Density Lipoproteinen (LDL) als erster Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose angesehen wird, wurde in zahlreichen Studien untersucht, ob Vitamin E die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen verhindern kann und so vorbeugend gegen Herzinfarkt und andere kardiovaskuläre Erkrankungen wirkt. Obwohl einige die antiatherogene Wirkung besonders *in vitro* bestätigen konnten, ist ein gefäßprotektiver Effekt von Vitamin E *in vivo* bis heute umstritten [3, 4, 5, 6].

Nicht antioxidative Funktionen

Zusätzlich zu seinem antioxidativen Potential besitzt α -Tocopherol auch davon unabhängige, spezifische Funktionen innerhalb der Zelle. So inhibiert es die Protein-Kinase C (PKC)[7], ein wichtiges Enzym für Signaltransduktion innerhalb der Zelle, wodurch verschiedene Zellmembranrezeptoren (u.a. Scavenger Receptor B I) moduliert werden [8], die Proliferation von glatten Muskelzellen der Gefäßwand [9] oder auch die Thrombozytenaggregation [10] und die Bildung intraarterieller Thromben [11] gehemmt wird. Außerdem reguliert es die Expression verschiedener Gene (α -Tropomyosin, CD 36, α -Tocopherol Transport Protein) [12, 13]. Die wachsende Zahl bekannter nicht-antioxidativer Funktionen von α -Tocopherol und seine hochspezifische Aufnahme im Körper deuten darauf hin, daß es sich nicht nur um ein hoch potentes Antioxidans,

sondern auch um ein wichtiges regulatorisches Molekül für verschiedene Zellfunktionen handelt [14].

Stoffwechsel

Der tägliche Bedarf an Vitamin E wird auf 15 mg geschätzt, mit gewöhnlicher Nahrung jedoch kaum gedeckt [15]. Nach der Aufnahme im Darm, die die Anwesenheit von Gallensäuren voraussetzt, werden die Tocopherole in Chylomikronen zur Leber transportiert. Da das α -Tocopherol-Transport-Protein der Hepatozyten eine vielfach höhere Affinität zu α -Tocopherol als zu seinen Stereoisomeren hat, findet hier eine Selektion zu Gunsten der α -Form statt. Im Blutplasma wird das Vitamin E ausschließlich in Lipoproteinen transportiert. Hierfür sind besonders Low Density Lipoproteine und High Density Lipoproteine (HDL) von Bedeutung [16, 17, 18].

Zelluläre Aufnahme

Die Hauptwege der Aufnahme von α -Tocopherol in die Zelle sind zum einen die rezeptorvermittelte Endocytose am LDL-Rezeptor, zum anderen der *Selective Lipid Transfer* über den spezifischen HDL-Rezeptor Scavenger Receptor B I (SR-BI). Bei diesem Mechanismus werden Lipide in die Zelle aufgenommen, ohne daß das gesamte Lipoprotein-Partikel internalisiert wird [19, 20].

1.2 Cholesterol

Funktion und Stoffwechsel

Das Cholesterol ist ein essentieller Bestandteil der Zellmembran, wo es eine stabilisierende Wirkung auf spezifische Membranstrukturen hat, aber auch an der Signaltransduktion beteiligt ist. Außerdem dient es als Substrat für die Synthese von Gallensäuren in der Leber, von Steroidhormonen in endokrinen Geweben (Nebenniere, Ovar und Hoden) und Vitamin D in der Haut. Täglich wird ca. 1 g Cholesterol in Form von Gallensäuren ausgeschieden. Da bei durchschnittlicher Ernährung nur ca. 0,3 g mit der Nahrung aufgenommen werden, entsteht der Großteil des Cholesterols durch *de novo* –Synthese in den Zellen [21, 22, 23].

Reverser Cholesterol Transport

Überschüssiges Cholesterol wird durch HDL aus peripheren Geweben abtransportiert; hiervon wird der Großteil durch die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase in Cholesterylester umgewandelt [24, 25]. Mit den HDL gelangt das Cholesterol in Steroidhormon-produzierende Zellen zur Synthese oder Speicherung, und in die Leber, wo es in die Galle ausgeschieden, in Gallensäuren umgewandelt oder mit Very Low Density Lipoproteinen (VLDL) sezerniert wird [26, 27, 28, 29]. Dieser Weg wird als Reverser Cholesterol Transport bezeichnet [30] und als wichtiger Mechanismus zur Erklärung für den antiatherogenen Effekt des HDL-Cholesterol angesehen [31, 32, 33].

Cholesterolhomöostase der Zelle

Da Cholesterol ein unentbehrlicher Bestandteil der Zellmembran ist, in hohen Konzentrationen aber toxisch wirkt, ist seine zelluläre Konzentration in engen Grenzen reguliert. Dies geschieht über eine Vielzahl von Mechanismen, die bisher noch nicht vollständig geklärt werden konnten. Am besten untersucht ist die Kontrolle der Cholesterol-Biosynthese im endoplasmatischen Retikulum (ER): Dort befinden sich membrangebundene Transkriptionsfaktoren, die Sterol Regulatory Element Binding Proteins (SREBP). Bei sinkender Cholesterolkonzentration bewegt sich ein Komplex aus SREBP und dem Co-Faktor SREBP Cleavage Activating Protein aus dem ER in den Golgi-Apparat, wo SREBP durch zwei proteolytische Spaltungen aktiviert wird. Daraufhin aktiviert es im Zellkern Gene, deren Proteine für die Cholesterolsynthese und -aufnahme zuständig sind [23, 34, 35].

Da menschliche Zellen das Cholesterol enzymatisch nicht vollständig abbauen können, geschieht seine Elimination hauptsächlich durch Efflux aus der Zellmembran in extrazelluläre Akzeptorpartikel. Davon kommt dem HDL die größte Bedeutung zu, das im Reversen Cholesterol Transport das Cholesterol der Leber zuführt, wo es in Gallensäuren umgewandelt und in den Verdauungstrakt ausgeschieden wird [21, 36].

Veränderung des zellulären Cholesterolgehalts mit Methyl- β -Cyclodextrin

Um den Cholesterolgehalt von Zellen für experimentelle Zwecke zu manipulieren, eignen sich die Cyclodextrine, zyklische Polysaccharide, die in Lösung der Zelle Cholesterol entziehen. Mischt man Methyl- β -Cyclodextrin (M- β -CD) mit freiem Cholesterol in einem definiertem Verhältnis, bilden sich Cyclodextrin-Cholesterol-Komplexe, die bei der Inkubation mit isolierten Zellen eine Erhöhung des zellulären Cholesterols bewirken können [37].

1.3 Scavenger Receptor B I

Eigenschaften

Der SR-BI ist der einzige bislang charakterisierte Rezeptor für High Density Lipoproteine [38]. Seine Bezeichnung als Scavenger Rezeptor erhielt er wegen der Fähigkeit, acetylierte Low Density Lipoproteine zu binden [39]; er gehört zur Proteinfamilie des CD 36, mit dem er eine große Homologie aufweist. Das SR-BI-Molekül ist stark glykosyliert und wandert in der SDS-Gel-Elektrophorese bei ungefähr 82 kD [40].

In den meisten Zelltypen ist der Rezeptor in Caveolae lokalisiert, cholesterol- und sphingomyelinreichen Mikrodomänen innerhalb der Zellmembran, die für verschiedene Signaltransduktionsprozesse von Bedeutung sind. Morphologisch sind Caveolae 50-100 nm große flaschenförmige Invaginationen der Plasmamembran, die durch das Protein Caveolin-1 gekennzeichnet sind [39, 41, 42, 43].

Selective Lipid Transfer

Selective Lipid Transfer oder *Selective Lipid Uptake*¹ ist ein Prozess, in dem Lipide aus Lipoproteinen in die Zelle aufgenommen werden, ohne daß es zur Endocytose und zum Abbau des Lipoprotein-Partikels kommt. Die Arbeiten von Gwynne et al. [44], Pittman et al. [29, 45] und der Gruppe von Reaven und Azhar [46, 47] aus den letzten 20 Jahren haben gezeigt, daß die selektive Aufnahme der Hauptweg der Cholesterylester-Aufnahme in der Leber und steroidproduzierenden Zellen *in vitro* und *in vivo* ist. Dieses gilt außer für Nagetiere auch für menschliche Hepatozyten und HepG2-Karzinomzellen [48, 49] sowie für ovarielle Granulosazellen [50].

Erst viele Jahre nach der Erstbeschreibung des *Selective Lipid Transfer* konnte gezeigt werden, daß dieser Mechanismus durch SR-BI vermittelt wird [51, 52].

Funktionen des SR-BI

Zusätzlich zur Aufnahme von Cholesterylestern stimuliert SR-BI den bidirektionalen Fluß von freiem Cholesterol zwischen HDL und Zellen [53, 54, 55], also sowohl die zelluläre Aufnahme, als auch den Efflux von Cholesterol aus der Zelle in HDL als Akzeptorpartikel. Die Rate des Cholesterol-Efflux korreliert dabei gut mit der Expression von SR-BI. Damit ist SR-BI an meh-

¹ Selective Lipid Uptake engl. = selektive Lipidaufnahme

renen Schritten des Reversen Cholesterol-Transports beteiligt (Cholesterolefflux zu HDL-Akzeptorpartikeln in peripheren Zellen, selektive Cholesterolaufnahme aus HDL in der Leber). Ferner vermittelt SR-BI den *Selective Lipid Transfer* von Phospholipiden [56], Vitamin E [57, 58] und von Triglyceriden [59] in verschiedene Zellen.

In zahlreichen neueren Studien ist mit Hilfe von Manipulation des SR-BI-Gens (Überexpression durch Transfektion, gezielte Mutation zur Ausschaltung des Gens) der enge Zusammenhang zwischen der Expression von SR-BI und dem HDL- und Cholesterol-Stoffwechsel gezeigt worden [60]. So ist die Überexpression von SR-BI in der Leber mit erniedrigten HDL-Cholesterolspiegeln im Plasma sowie erhöhter Cholesterolausscheidung in die Gallenflüssigkeit verbunden [61, 62, 63, 64, 65]. Dagegen weisen SR-BI-Knockout-Mäuse und Mäuse mit erniedrigter SR-BI-Expression erhöhte HDL-Cholesterol-Konzentrationen [66, 67] und erniedrigte Cholesterolausscheidung in die Gallenflüssigkeit auf.

Regulation der SR-BI-Expression

In Steroidhormon-produzierenden Geweben unterliegt SR-BI einer Regulation durch Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) über den cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat)-Protein Kinase-A-Weg [68, 69].

Der Zusammenhang zwischen dem zellulären Cholesterolgehalt und der SR-BI-Expression ist bislang unklar: Wan fanden eine Erhöhung der SR-BI-mRNA in der Nebenniere von Mäusen mit stark reduziertem zellulärem und plasmatischem Cholesterolgehalt [70], während eine Folgearbeit zu dem Schluß kam, daß die SR-BI-Expression in der Nebenniere relativ unempfindlich gegenüber Veränderungen des Gewebe- und Plasmacholesterols ist [71]. In Rattenleber führten eine Östradiol-induzierte Senkung des Plasmacholesterols, aber auch eine cholesterolreiche Spezialdiät zu einer deutlichen Erniedrigung der SR-BI-Expression und der selektiven Cholesterylester-Aufnahme, während in Kupffer'schen Zellen ein genau entgegengesetzter Effekt festzustellen war [69, 72].

Eindeutiger ist der Einfluß von Vitamin E auf die SR-BI-Expression: Wit konnten zeigen, daß Vitamin-E-arme Ernährung die SR-BI-Expression stark erhöht, während Inkubation von HepG2-Zellen mit α -Tocopherol-angereicherten HDL zu einer Erniedrigung des SR-BI führte [73].

Pathophysiologische Bedeutung

Aus Experimenten mit SR-BI-Knockout(KO)-Mäusen resultierte, daß mit der fehlenden Expression von SR-BI eine Reihe von pathologischen Veränderungen assoziiert sein können. Weibliche SR-BI-KO-Mäuse sind unfruchtbar – ihre Oozyten sind dysfunktionell und daraus entstandene

Embryonen nicht überlebensfähig [74], was vermutlich auf den gestörten Lipoproteinstoffwechsel zurückzuführen ist [75].

Außerdem neigen SR-BI-KO-Mäuse vermehrt zu Atherosklerose, wenn sie mit cholesterol- und fettreicher Nahrung gefüttert werden [76]. Die Vermutung, daß SR-BI-Expression vor Atherogenese schützt, wird durch Studien an mehreren Mausmodellen für Atherosklerose mit veränderter SR-BI-Expression gestützt: SR-BI-ApoE-Doppel-Knockout(dKO)-Mäuse und cholesterol- und fettreich ernährte LDL-Rezeptor-KO-Mäuse entwickeln frühzeitig koronare Herzkrankheit mit Herzinsuffizienz sowie multiple Herzinfarkte und haben eine verkürzte Lebenszeit [74, 77, 78, 79]. Dagegen reduziert die hepatische Überexpression von SR-BI das Ausmaß der Atherosklerose in verschiedenen Mausmodellen [80, 81, 82]. Diese gefäßprotektive Eigenschaft könnte neben der Schlüsselposition von SR-BI im Reversen Cholesterol-Transport unter anderem auch auf seine Bedeutung für die Vitamin-E-Aufnahme zurückzuführen sein [78, 83, 84].

Auch wird ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von Cholesterol-Gallensteinen und SR-BI-Expression diskutiert, jedoch gibt es bislang keine eindeutigen Anhaltspunkte für eine lithogene Wirkung von SR-BI [85, 86, 87].

2. AUFGABENSTELLUNG

Der Scavenger Rezeptor BI vermittelt den *Selective Uptake* von HDL-gebundenem Cholesterol und Vitamin E sowie den Efflux von Cholesterol von der Zellmembran zu HDL-Akzeptorpartikeln. Die Tatsache, daß verschiedene Lipide über den gleichen Weg am selben Rezeptor aufgenommen werden, wirft die Frage auf, ob die Zellen die Aufnahme von Vitamin E und Cholesterol unabhängig voneinander ihrem Bedarf entsprechend regulieren können.

Der Mechanismus für die selektiven Aufnahme einzelner Lipide aus HDL ist jedoch weitgehend unbekannt. Ein regulatives Element – zumindest bei apolaren Lipiden – scheint die Zusammensetzung der HDL-Partikel zu sein. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von Rodrigueza et al. gestützt, die zeigen konnten, daß der *Selective Uptake* von Cholesterylestern von ihrem Gehalt im HDL-Partikel abhängig ist [88]. Außerdem zeigte die zelluläre Aufnahme von Cholesterylestern und Triglyceriden eine lineare Abhängigkeit vom Gehalt beider Lipide im HDL [89].

Die Erhöhung des zellulären Vitamin-E-Gehalts in HepG2-Zellen führt zu einer Verminderung der SR-BI-Expression [73]. Dagegen konnte bisher noch kein eindeutiger Effekt einer Erhöhung des zellulären Cholesterolgehalts auf die Expression des Scavenger Receptor B I und die Vitamin-E- bzw. Cholesterolaufnahme und –abgabe nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit ist daher zu klären,

- i. ob der Vitamin-E-Gehalt von HDL die Cholesterolaufnahme aus den gleichen Partikeln beeinflusst und ob die zelluläre Tocopherolaufnahme Auswirkungen auf den Cholesterolefflux hat.
- ii. ob Veränderungen des Cholesterolgehalts von HepG2-Zellen die Expression von SR-BI und PKC α und den Cholesterolefflux beeinflussen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien haben den Reinheitsgrad „zur Analyse“ (p.a.) und wurden von verschiedenen kommerziellen Anbietern bezogen.

3.1.2 Zelllinien

HepG2-Zellen (ATCC HB 8065) aus menschlichem hepatozellulärem Karzinom wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur, Braunschweig, bezogen.

3.2 Geräte und Hilfsmittel

für die Vitamin-E-Bestimmung: Hochdruckchromatograph SHIMADZU, Pumpe LC-6A, UV-Detektor SPD-6A

für die Radioaktivitätsmessung: WALLAC Liquid Scintillation Counter 1410

für die photometrischen Messungen: BIO-RAD Microplate Reader Model 450 und UV 2101PC SHIMADZU UV Vis Scanning Spectrophotometer

für die Ultrazentrifugationen: BECKMANN Ultrazentrifuge L8-70 mit den Rotoren SW 28 und Ti 70.1

für die Kultivierung der HepG2-Zellen: HERAEUS INSTRUMENTS Begasungsbrutschrank BB6220

für die SDS-PAGE: Gelgießkammer HOEFER SE 200 Mighty Small und Elektrophoresevorrichtung LKB Bromma 2050

für das Semi-Dry-Blotverfahren: Semi-Dry-Blotvorrichtung PHASE (max. 40 V) und Nitrocellulosemembran SCHUELLER & SCHLEICHER Protran 45 µm

für die Auswertung der Immunoblots X-Omat Filme (KODAK EASTMAN, Rochester, NY) und Densitometer mit automatischer Kalibrierung GS-710 (BIO-RAD, Hercules, CA)

N₂-Trockenvorrichtung : TECHNE Dri-Bloc DB 3

3.3 Methoden

3.3.1 Lipoprotein-Gewinnung

Alle in den Versuchen verwendeten Lipoproteine wurden aus frischem Plasma gesunder männlicher Spender mittels KBr-Dichtegradientenultrazentrifugation, modifiziert nach Chapman [90], gewonnen.

3.3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels eines kommerziellen Kits mit Bradford-Reagenz oder nach der Bicinchonic-Acid (BCA)-Methode [91].

3.3.3 Cholesterolbestimmung

Die quantitative Bestimmung des Cholesterols wurde mit einem enzymatischen Farbstest der Firma *Boehringer Mannheim* durchgeführt. Dabei entsteht durch enzymatische Oxidation des Cholesterols u.a. H_2O_2 , welches in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion zu einem farbigen Chinonimin umgesetzt wird. Die Extinktion des Farbstoffs ist zur Cholesterolkonzentration proportional und wird photometrisch (UV 2101PC SHIMADZU UV Vis Scanning Spectrophotometer) gemessen.

3.3.4 Vitamin-E-Bestimmung

Vitamin E wird nach Catignani und Bieri [92] mittels HPLC auf einer LiChrosorb RP-18 Säule bestimmt. Als interner Standard wird der Probe vor der Hexanextraktion der Zellen Tocopherolacetat zugesetzt.

3.3.5 Effekt des Vitamin-E-Gehalts von HDL auf die Aufnahme von Cholesterol und Vitamin E in HepG2-Zellen

Aufnahme in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt des HDL

HepG2-Zellen werden in Zellkulturflaschen in RPMI-Medium mit 25 mM Glucose und Zusatz von 10 % Fetalem Kälberserum (FKS), Streptomycin (50 μ g/ml) und 2 mM Glutamin unter 5 % CO_2 bei 37 °C kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgt alle 2-3 Tage.

Pro Ansatz werden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 10 cm-Petrischalen überführt und für einen Tag in RPMI-Medium und für 2 weitere Tage in 10 %-BMS (Basales Medium Supplement, lipoproteinfrei, *Biochrom KG, Berlin*)-RPMI-Medium kultiviert, bis eine ca. 90 %ige Konfluenz erreicht ist.

Die Zellen werden dann dreimal mit BMS-Medium gewaschen und schließlich für 3 h mit ^3H -Cholesterol-markiertem HDL (je 20000 DPM²/ml BMS-Medium) inkubiert. HDL wurde mit endogenem Vitamin-E-Gehalt von 1,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein oder mit Vitamin E angereichert (19,48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein), sowie mit drei durch Mischen dieser beiden erzeugten mittleren Konzentrationen (6,22 und 10,54 bzw. 15,06 μg α -Tocopherol/mg Protein) angeboten.

Danach werden die Zellen dreimal in eiskaltem PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen und in 1,5 ml Homogenisationspuffer modifiziert nach Rooney abgekratzt. Nach der Homogenisation durch Ultraschall (2 x 20 Stöße à 200 W, je 0,6 s) unter Eiskühlung werden 900 μl für die Messung von Protein, Cholesterol, Vitamin E und Radioaktivität verwendet, die restlichen 600 μl der Zell-Membranpräparation zugeführt. Ausgehend von der spezifischen Radioaktivität des HDL-Cholesterols und der Radioaktivität in den Zellen, wird die Aufnahme von Cholesterol in μg berechnet und auf 1 mg Zellprotein bezogen.

Zeitabhängigkeit der Aufnahme

HepG2-Zellen werden in Zellkulturflaschen in RPMI-Medium mit 25 mM Glucose und Zusatz von 10 % Fetalem Kälberserum (FKS), Streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 2 mM Glutamin unter 5 % CO_2 bei 37 °C kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgt alle 2-3 Tage.

Pro Ansatz werden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 10 cm-Petrischalen überführt und für einen Tag in RPMI-Medium und für 2 weitere Tage in 10 %-BMS (Basales Medium Supplement, lipoproteinfrei, *Biochrom KG, Berlin*)-RPMI-Medium kultiviert, bis eine ca. 80 %ige Konfluenz erreicht ist.

Nach dreimaligem Waschen mit BMS-Serum werden die Zellen für 1 h, 3 h, 6 h, 9 h und 12 h mit ^3H -Cholesterol-markiertem HDL mit endogenem (1,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein) bzw. erhöhtem Vitamin-E-Gehalt (19,48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein) in BMS-RPMI-Medium inkubiert.

Danach werden die Zellen dreimal in eiskaltem PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen und in 1,5 ml Homogenisationspuffer modifiziert nach Rooney abgekratzt. Nach der Homogenisation durch Ultraschall (2 x 20 Stöße à 200 W, je 0,6 s) unter Eiskühlung werden 900 μl für die Messung von Protein, Cholesterol, Vitamin E und Radioaktivität verwendet, die restlichen 600 μl der Membranpräparation zugeführt. Ausgehend von der spezifischen Radioaktivität des HDL- ^3H -Cholesterols und der Radioaktivität in den Zellen, wird die Aufnahme von Cholesterol in μg berechnet und auf 1 mg Zellprotein bezogen.

² DPM = Disintegrations Per Minute

3.3.6 Einfluß des zellulären Vitamin-E-Gehalts auf die Expression von PKC α und SR-BI und auf den Cholesterolefflux

HepG2-Zellen werden in Zellkulturflaschen in RPMI-Medium mit 25 mM Glucose und Zusatz von 10 % Fetalem Kälberserum (FKS), Streptomycin (50 μ g/ml) und 2 mM Glutamin unter 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgt alle 2-3 Tage.

Pro Ansatz werden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 10 cm-Petrischalen überführt und für 2 Tage in 10 %-BMS (Basales Medium Supplement, lipoproteinfrei, *Biochrom KG, Berlin*)-RPMI-Medium kultiviert, bis eine ca. 50 %ige Konfluenz erreicht ist. Nach der anschließenden Inkubation über 40 h mit ³H-Cholesterol-markierten HDL mit endogenem (1,8 μ g/mg Protein) oder erhöhtem Vitamin-E-Gehalt (19,48 μ g/mg Protein) werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min mit nativem HDL (60 μ g Protein/ml RPMI-Medium) als Cholesterol-Akzeptor inkubiert. Das Medium wird abgenommen und nach dreimaligem Waschen des Zellrasens mit eiskaltem PBS Protein, Cholesterol, Vitamin E und Radioaktivität in den Zellen und im Medium gemessen. Dazu wird das Medium 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Aus der spezifischen Radioaktivität des zellulären Cholesterols wird schließlich der Efflux von Cholesterol in μ g/mg HDL-Protein berechnet.

3.3.7 Einfluß des zellulären Cholesterolgehalts auf die Expression von PKC α und SR-BI und auf den Cholesterolefflux

Ansetzen der Zellkulturen

HepG2-Zellen werden in Zellkulturflaschen in RPMI-Medium mit 25 mM Glucose und Zusatz von 10 % Fetalem Kälberserum (FKS), Streptomycin (50 μ g/ml) und 2 mM Glutamin unter 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgt alle 2-3 Tage.

Pro Ansatz werden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 10 cm-Petrischalen überführt und für einen Tag in RPMI-Medium und für 2 weitere Tage in 10 %-BMS (Basales Medium Supplement, lipoproteinfrei, *Biochrom KG, Berlin*)-RPMI-Medium kultiviert, bis ca. 80 % Konfluenz erreicht sind.

Für die Bestimmung des Efflux von freiem Cholesterol aus Kontrollzellen werden diese dann für 24 h mit ³H-Cholesterol-markiertem BMS-RPMI-Medium inkubiert.

Erhöhung des zellulären Cholesterolgehalts

In Glasgefäßen werden 4,8 mg Cholesterol in Chloroform-Methanol und 50 μ Ci ³H-Cholesterol zusammengegeben und unter N₂ getrocknet. Anschließend werden 10 ml 5 mM M- β -CD in RPMI-Medium zugesetzt und bei 60 °C über Nacht gerührt. Die Lösung wird gefiltert (Porenweite 0,45 μ m) und auf 37 °C abgekühlt. Die zu ca. 80-90 % konfluierten HepG2-Zellen werden

einmal mit warmem PBS gewaschen und mit M- β -CD-Cholesterol-Komplex in Medium für 1 h inkubiert. Danach werden die Zellen dreimal mit warmem PBS gewaschen und für 3 h oder 6 h mit lipoproteinfreiem Medium inkubiert. Ein Teil dieser Zellen wird dreimal in eiskaltem PBS gewaschen und in 1,5 ml Homogenisationspuffer modifiziert nach Rooney abgekratzt. Nach der Homogenisation durch Ultraschall (2 x 20 Stöße à 200 W, je 0,6 s) unter Eiskühlung werden 900 μ l für die Messung von Protein, Cholesterol, Vitamin E und Radioaktivität verwendet, die restlichen 600 μ l der Zell-Membranpräparation zugeführt. Die restlichen Zellkulturschalen werden zur Bestimmung des Cholesterolefflux verwendet: Nach erneutem Waschen in warmem PBS erfolgt die 30-minütige Inkubation mit nativem HDL (60 μ g Protein/ml RPMI-Medium). Anschließend wird das Medium abgenommen und nach dreimaligem Waschen des Zellrasens in eiskaltem PBS Protein, Cholesterol, Vitamin E und Radioaktivität in den Zellen und im Medium gemessen. Dazu wird das Medium 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Das weitere Vorgehen erfolgt analog zu 3.3.6; aus der Radioaktivität des Mediums und der spezifischen Radioaktivität des zellulären Cholesterols wird schließlich der zelluläre Efflux von Cholesterol in μ g/mg HDL-Protein berechnet.

Erniedrigung des zellulären Cholesterolgehalts

Die zu ca. 80-90 % konfluierten HepG2-Zellen werden einmal mit warmem PBS gewaschen und mit 5 mM M- β -CD in RPMI-Medium für 1 h inkubiert. Danach werden die Zellen dreimal mit warmem PBS gewaschen und für 3 h oder 6 h mit lipoproteinfreiem Medium inkubiert, dann dreimal in eiskaltem PBS gewaschen und in 1,5 ml Homogenisationspuffer modifiziert nach Rooney abgekratzt. Nach der Homogenisation durch Ultraschall (2 x 20 Stöße à 200 W, je 0,6 s) unter Eiskühlung werden 900 μ l für die Messung von Protein, Cholesterol, und Vitamin E verwendet, die restlichen 600 μ l der Zell-Membranpräparation zugeführt.

3.3.8 Einfluß der zellulären Cholesterolanreicherung auf die Vitamin-E- und Cholesterol-Aufnahme aus HDL

Ansetzen der Zellkulturen

HepG2-Zellen werden in Zellkulturflaschen in RPMI-Medium mit 25 mM Glucose und Zusatz von 10 % Fetalem Kälberserum (FKS), Streptomycin (50 μ g/ml) und 2 mM Glutamin unter 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgt alle 2-3 Tage.

Pro Ansatz werden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 10 cm-Petrischalen überführt und für einen Tag in RPMI-Medium und für 2 weitere Tage in 10 %-BMS (Basales Medium Supplement, lipoproteinfrei, *Biochrom KG, Berlin*)-RPMI-Medium kultiviert, bis eine ca. 80 %ige Konfluenz erreicht ist.

Präparation des Cyclodextrin-Cholesterol-Mediums

In Glasgefäßen werden 4,8 mg Cholesterol in Chloroform-Methanol unter N₂ getrocknet. Anschließend werden 10 ml 5 mM M-β-CD in RPMI-Medium zugesetzt und bei 60 °C über Nacht gerührt. Die Lösung wird gefiltert (Porenweite 0,45 µm) und auf 37 °C abgekühlt.

Versuchsansatz

Die zu ca. 80-90 % konfluierten HepG2-Zellen werden einmal mit warmem PBS gewaschen und mit dem M-β-CD-Cholesterol-Komplex in Medium für 3 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit warmem PBS werden den Cholesterol-angereicherten Zellen, wie auch den Kontrollzellen, die in BMS-RPMI verblieben sind, für 1 h bzw. 2 h ³H-Cholesterol-markiertes, Vitamin-E-angereichertes (19,48 µg/mg Protein) HDL angeboten. Danach werden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1,5 ml Homogenisationspuffer modifiziert nach Rooney abgekratzt. Nach der Homogenisation durch Ultraschall (2 x 20 Stöße à 200 W, je 0,6 s) unter Eiskühlung werden 900 µl für die Messung von Protein, Cholesterol, Vitamin E und Radioaktivität verwendet, aus den restlichen 600 µl wird die Membranfraktion isoliert. Ausgehend von der spezifischen Radioaktivität des Cholesterol im HDL und der Radioaktivität in den Zellen, wird die Aufnahme von Cholesterol in µg berechnet und auf 1 mg Zellprotein bezogen.

3.3.9 Membranpräparation

Verwendete Puffer

Homogenisationspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 µg/ml Pepstatin, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 Boehringer Proteinaseinhibitortablette /10ml.

Lysepuffer: Homogenisationspuffer mit 1% Triton X-100 (v/v).

doppelt konzentrierter SDS- 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 20 % Glycerol,
PAGE-Auftragspuffer: 75 mM DTT, Bromphenolblau ad libitum.

Durchführung der Membranpräparation (modifiziert nach [93, 94])

Aus den einzelnen Versuchen werden 600 µl HepG2-Schallat für die Membranpräparation verwendet. Nach Differentialzentrifugation bei 800 g, 4 °C über 10 min zur Entfernung nicht zerstörter Zellreste, erfolgt die Ultrazentrifugation bei 100.000 x g, 4 °C über 1h. Das Membranpellet wird mit 100-200 µl Lysepuffer über 1 h bei 4 °C aufgenommen und anschließend für 3 min bei 20.000 x g abzentrifugiert. Nach Proteinbestimmung mittels der BCA-Methode und Versetzen mit Auftragspuffer können nun 20 µg Protein für die SDS-PAGE mit aufgetragen werden.

3.3.10 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der eindimensionalen SDS-PAGE nach Laemmli [95] werden die Proteine einer Probe nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Beim Erhitzen im Auftragspuffer werden die Polypeptide hitzedenaturiert, während durch den Zusatz von SDS (Natriumlaurylsulfat) Eigenladungen überdeckt werden und anionische Micellen mit konstanter Nettoladung pro Masseinheit entstehen. DTT (Dithiothreitol) reduziert Disulfidbrücken in den Proteinen. Durch diese Behandlung entsteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichts eines Proteins und seiner Wanderungstrecke im Polyacrylamidgel. Mit Hilfe von Markerproteinen von definierter Molekülmasse lassen sich die Molekulargewichte der Moleküle bestimmen. Der Name „diskontinuierliche SDS-PAGE“ bezieht sich auf die Verwendung eines Sammelgels mit großer Polyacrylamid-Porenweite (5 %) vor dem eigentlichen Trenngel. Die im Sammelpuffer enthaltenen Chlorid-Ionen wandern schneller als die zu trennenden Proteine, während im Elektrophoresepuffer Glycin-Ionen vorherrschen, die langsamer als die Proteine wandern. Zwischen den Chlorid-Ionen und den Proteinen entsteht im Resultat eine Zone geringer Leitungsfähigkeit und somit ein größerer Spannungsgradient. Die dadurch erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit bewirkt eine Fokussierung der Proteine in einer scharfen Bande beim Eintritt ins Trenngel [96].

Verwendete Puffer

Stammlösungen:

8 % Trenngel: 4,5 % Sammelgel:

Acryl/Bisacrylamid	40 % / 0,8 % (wt/v)	6000 µl	1126 µl
Tris/HCL-Puffer (Sammelgel)	0,5 M , pH 6,8		2500 µl
Tris/HCL-Puffer (Trenngel)	1,5 M , pH 8,8	7500 µl	
SDS	10 % (wt/v)	300 µl	100 µl
TEMED		20 µl	6 µl
Ammoniumperoxidsulfat	10 % (wt/v)	300 µl	100 µl
		ad 30 ml Aqua dest.	ad 10 ml Aqua dest.

doppelt konzentrierter SDS-PAGE-Auftragspuffer: 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 20 % Glycerol, 75 mM DTT, Bromphenolblau ad lib.

Elektrophoresepuffer: Tris 25 mM, Glycin 192 mM, SDS 0,1 % (wt/v).

Durchführung der SDS-PAGE

Zur Durchführung der Elektrophorese wird eine Kammer (HOEFER SE 200 Mighty Small) mit einer Gelgröße von 180 x 150 x 1 mm verwendet. Zunächst wird ca. 20 ml Trenngel in die Kammer gegossen, das Trenngel mit ca. 100 µl Aqua dest. überschichtet und die Polymerisation des Gels abgewartet. Nach Abgießen des überschüssigen Aqua dest. wird ca. 7,5 ml Sammelgel in die Kammer gefüllt und der Probenkamm mit zehn Vertiefungen eingesetzt. Während des gesamten Gießvorganges ist die Oberseite der Gießkammer stets feucht zu halten.

Nach Polymerisation des Sammelgels wird die Kammer in die Elektrophorese-Apparatur (LKB Bromma 2050) gestellt, mit Elektrophoresepuffer bedeckt und der Kamm entfernt. Die mit Probenpuffer versetzten Proteinlösungen und der Proteinstandard werden für drei Minuten im Thermomixer auf 95 °C erhitzt und daraufhin je nach Versuchsanordnung 10 – 60 µl der Proben in die Geltaschen transferiert.

Dann wird die Elektrophorese pro Gel mit 30 mA (max. 250 V) etwa 1 h lang durchgeführt.

3.3.11 Western Blot

Das Verfahren des „Western Blotting“ [97] wird zum Nachweis eines bestimmten Proteins innerhalb einer Proteinmischung verwendet. Hierzu wird die Probe zunächst mittels der diskontinuierlichen SDS-PAGE (siehe 3.3.9) aufgetrennt und im Semi-Dry-Blotverfahren elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, so daß die Proteine darauf im gleichen Muster wie auf dem Gel immobilisiert sind. Optional findet dann die reversible Färbung mit Ponceau S [98] zur Kontrolle der Transfereffizienz statt. Danach erfolgt das „Blocken“ in 5 % Magermilchpulver (MMP) in TBSt (5 % wt/v) zur Absättigung überschüssiger Proteinbindungsstellen der Membran und zum Verhindern unspezifischer Antikörperbindung.

Schließlich wird die Folie mit einer Lösung des ersten Antikörpers inkubiert, der spezifisch an das gesuchte Protein bindet. Danach wird die Folie zur Entfernung überschüssiger freier Antikörper gespült und schließlich mit dem zweiten Antikörper inkubiert, der gegen konstante Anteile des ersten Antikörpers gerichtet ist. Zur Visualisierung ist dieser mit einem Enzym (zum Beispiel Meerrettichperoxidase) gekoppelt, das durch Umsetzen eines Substrats ein Chemilumineszenz-Signal erzeugt, welches durch Schwärzung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht wird [96]. Die Größe und Dichte der entstandenen Bande läßt Rückschlüsse auf die Menge des Proteins auf der Folie zu.

Verwendete Puffer

Kathodenpuffer:	0,025 M Tris-Base, 0,040 M e-Aminocapronsäure / 20 % Methanol (v/v).
Anode-I-Puffer:	0,03 M Tris-Base / 20 % Methanol (v/v).
Anode-II-Puffer:	0,3 M Tris-Base / 20 % Methanol (v/v).
TBSt:	Tris-Base 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % (v/v).

Durchführung des Western Blots

Unmittelbar nach Ende der Elektrophorese werden die bei (Gelgröße in cm² x 0,8) mA im Semi-Dry-Blottingverfahren 70 min horizontal auf Nitrocellulosemembran übertragen und mit Ponceau S reversibel angefärbt.

Anschließend wird die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4 °C in 5 % Magermilchpulver (MMP) in TBSt (5 % wt/v) geblockt. Nach dem Blocken erfolgt dreimaliges Spülen mit TBSt über 10 min und die Inkubation mit dem jeweiligen ersten Antikörper in einer Verdünnung von

1 : 100 bis 1 : 1000 (5 % MMP / TBSt wt/v bzw. Blotting-Reagenz) über 1-2 h. Hierauf folgt wieder ein dreimaliger Spülvorgang, dann die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Horse-Raddish-Peroxidase) in einer Verdünnung von 1: 1.000 bis 1: 2.000 (5 % MMP / TBSt bzw. Blotting Reagenz) für 1 Stunde mit anschließendem oben beschriebenen dreimaligen Spülvorgang. Danach werden die nun Antikörper-markierten Proteine mittels *Enhanced Chemoluminescence* Verfahren photographisch sichtbar gemacht.

3.3.12 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software *Graph-PadPrism*, Version 3.00. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem zweiseitigen Student-t-Test untersucht. $p < 0,05$ gilt als statistisch signifikant (siehe Beschriftung der Abbildungen).

4. ERGEBNISSE

4.1 Effekt des Vitamin-E-Gehalts von HDL auf die Aufnahme von Cholesterol und Vitamin E in HepG2-Zellen

Zur Klärung der Frage, ob HDL-gebundenes Cholesterol (Chol) und Vitamin E (VitE) um die Aufnahme in HepG2-Zellen konkurrieren oder ob ihre Aufnahme unabhängig voneinander reguliert wird, wurden HepG2-Zellen für 3 h in Gegenwart von HDL mit steigendem Vitamin-E-Gehalt in RPMI-Medium inkubiert und die zelluläre Aufnahme von Vitamin E und Cholesterol bestimmt. Aus Abbildung 1 A geht hervor, daß mit zunehmendem Vitamin-E-Gehalt im HDL die zelluläre Vitamin-E-Aufnahme stieg, während die Aufnahme von Cholesterol aus HDL sich nicht veränderte. Der zelluläre Gesamtcholesterolgehalt blieb konstant (siehe Tabelle 1), so daß ein signifikanter Cholesterol-Efflux ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 1. Zellulärer Cholesterolgehalt der mit HDL von ansteigendem VitE-Gehalt inkubierten HepG2-Zellen.

Vitamin E-Gehalt des HDL [$\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein]	zelluläres Gesamtcholesterol [$\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein]	
1,8	28,01	\pm 7,91
6,22	28,46	\pm 5,64
10,64	29,95	\pm 4,15
15,06	30,42	\pm 7,28
19,48	33,71	\pm 5,87

Abbildung 1 B zeigt, daß eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Verhältnis von Vitamin E und Cholesterol in den HDL-Partikeln und dem Verhältnis der von HepG2 Zellen aufgenommenen Lipide besteht (lineare Regressionsgerade, $r^2=0,9832$, Analyse mit *GraphPadPrism* Software, Version 3.00). In der Western Blot-Analyse zeigt sich eine schrittweise Verminderung der SR-BI-Expression mit ansteigender Vitamin-E-Konzentration im HDL (Abb. 1 C).

Um auszuschließen, daß die gefundene Unabhängigkeit der Cholesterolaufnahme vom α -Tocopherolgehalt des HDL mit der Inkubationszeit variiert, wurden HepG2-Zellen für verschiedene Zeiträume mit ^3H -Cholesterol-markiertem HDL mit endogenem ($0,019 \mu\text{g}/\text{mg}$ Protein) bzw. erhöhtem Vitamin-E-Gehalt ($19,48 \mu\text{g}/\text{mg}$ Protein) in RPMI-HDL-Medium inkubiert. In Abbildung 1 D ist die zelluläre Aufnahme beider Lipide aus endogenem (weiße Kreise) und Vitamin-E-angereichertem HDL (schwarze Dreiecke) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dar-

gestellt: Eine Zunahme der α -Tocopherolaufnahme kann nur bei Vitamin-E-angereichertem, nicht aber bei endogenem HDL gemessen werden. Hingegen zeigt die Cholesterolaufnahme aus beiden HDL-Populationen keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf (zur besseren Übersicht ist die nichtlineare Regressionskurve der arithmetischen Mittel aus den Wertepaaren für endogenes und Vitamin-E-reiches HDL dargestellt). Das Ergebnis aus Abb. 1 A ist also nicht von der Inkubationszeit abhängig.

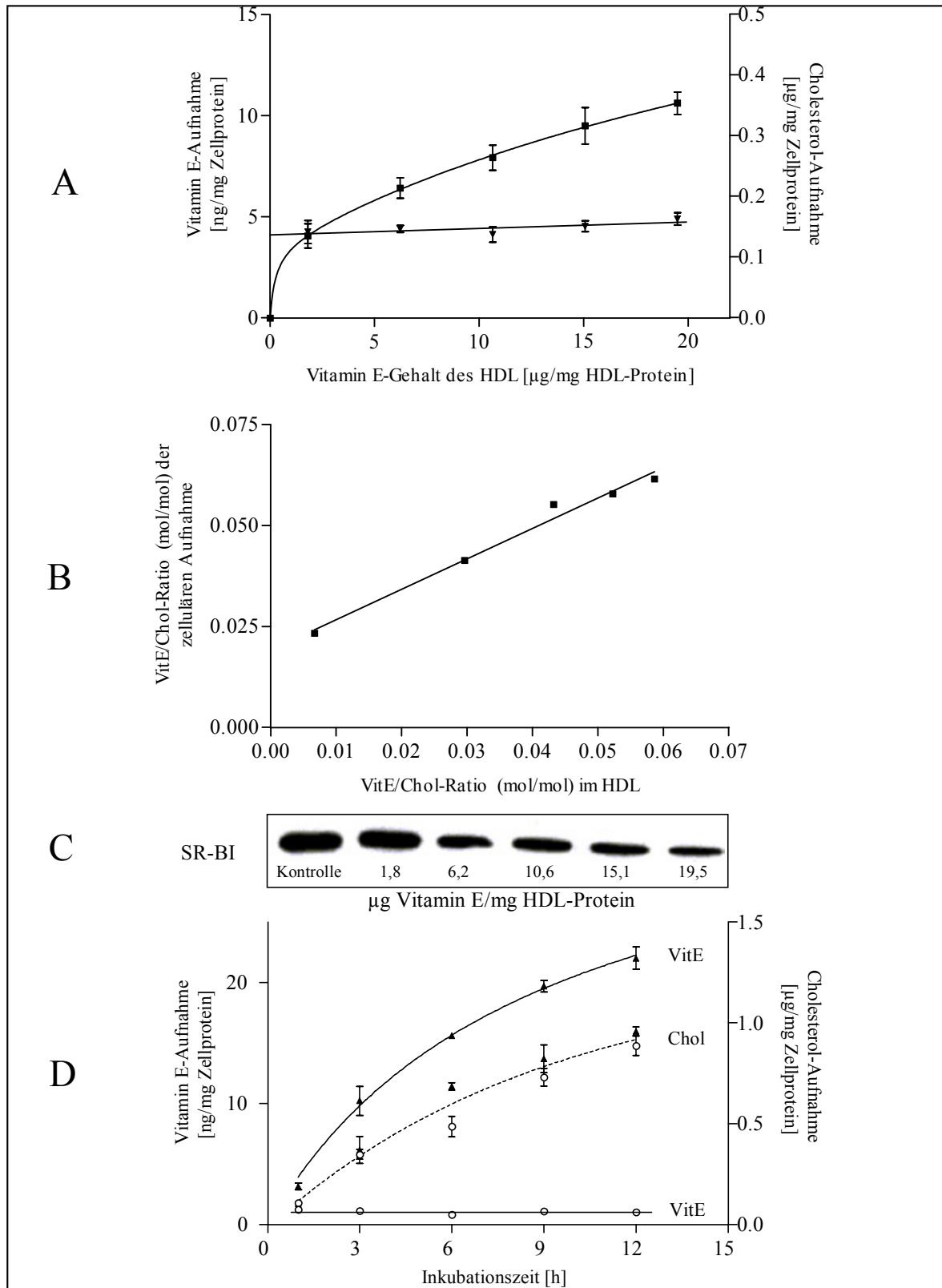


Abbildung 1. Vitamin-E- und Cholesterolaufnahme aus HDL in HepG2-Zellen. **A:** HepG2-Zellen wurden für 3h mit ^3H -Cholesterol-markiertem HDL mit unterschiedlichen Vitamin-E-Gehalt inkubiert und die zelluläre Aufnahme von Vitamin-E und Cholesterol gemessen. **B:** Verhältnis der Lipidaufnahme als Funktion des Verhältnisses von VitE/Chol im Donor-HDL. **C:** Western Blot-Analyse der SR-BI Expression in Abhängigkeit vom Vitamin-E-Gehalt der Donor-HDL-Partikel. **D:** Cholesterol- und Vitamin-E-Aufnahme aus ^3H -Cholesterol-markiertem endogenem (weiße Kreise) und ^3H -Cholesterol-markiertem Vitamin-E-angereichertem HDL (schwarze Dreiecke) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 6$ (A) bzw. 3 (D) unabhängigen Versuchen.

4.2 Einfluß des zellulären Vitamin-E-Gehalts auf die Expression von PKC α und SR-BI und auf den Cholesterolefflux

Um den Einfluß einer durch Vitamin-E-Anreicherung der Zellen modulierten SR-BI-Expression auf den Cholesterolefflux zu messen, wurden HepG2-Zellen über 40 h mit ^3H -Cholesterol-markiertem HDL mit endogenem oder erhöhtem Vitamin-E-Gehalt präinkubiert. Durch die Inkubation mit Vitamin-E-angereichertem HDL verringerte sich die SR-BI-Expression. Die so vorbehandelten Zellen wurden dann mit nativem HDL als Cholesterolakzeptor (60 μg Protein/ml) inkubiert und der Cholesterolefflux anhand der ins HDL aufgenommenen Radioaktivität berechnet. Um auszuschließen, daß zelluläres Cholesterol unspezifisch durch Zellzerstörung ins Medium gelangt, wurde gezeigt, daß mehr als 90 % der Radioaktivität nach Dichtegradientenultrazentrifugation des Überstandes an HDL gebunden waren (Abbildung 2, Analyse mit *GraphPadPrism* Software, Version 3.00).

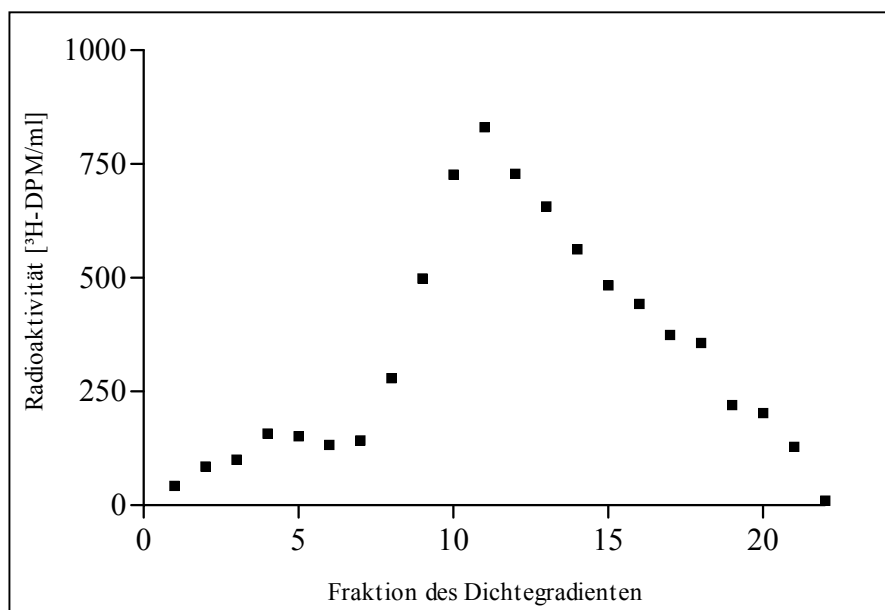


Abbildung 2. Cholesterolefflux aus HepG2-Zellen zu HDL als Akzeptor. Mit ^3H -Cholesterol markierte Zellen wurden für 30 min mit RPMI-Medium unter Zusatz von nativem HDL (60 μg Protein/ml) inkubiert. Nach Dichtegradientenultrazentrifugation des Überstandes befindet sich der Großteil der Radioaktivität in der HDL-Fraktion ($d = 1,12\text{-}1,21$ g/ml).

Die Ergebnisse des oben beschriebenen Experimentes sind in Abbildung 3 zusammengefasst: Abbildung 3 A zeigt, daß sich durch die Präinkubation mit Vitamin-E-angereichertem HDL erwartungsgemäß der zelluläre Vitamin-E-Gehalt, nicht aber der Cholesterolgehalt verändert hat.

Die Erhöhung der zellulären Vitamin-E-Konzentration vermindert die Expression des SR-BI und der PKC α (3 B).

Es wird vermutet, daß die Vitamin-E-induzierten Veränderungen der SR-BI-Expression über die Modulation der Protein-Kinase-C α -Aktivität vermittelt werden [73]. In Abbildung 3 C ist die densitometrische Auswertung verschiedener SR-BI- und PKC α -Western Blots dargestellt. Die beobachtete hochsignifikante Reduktion der SR-BI-Expression war mit einer ebenfalls hochsignifikanten ca. 50 % igen Verminderung der PKC α in der Membranfraktion der HepG2-Zellen verbunden. Gleichzeitig war der Cholesterolefflux in natives HDL signifikant erniedrigt (3 D).

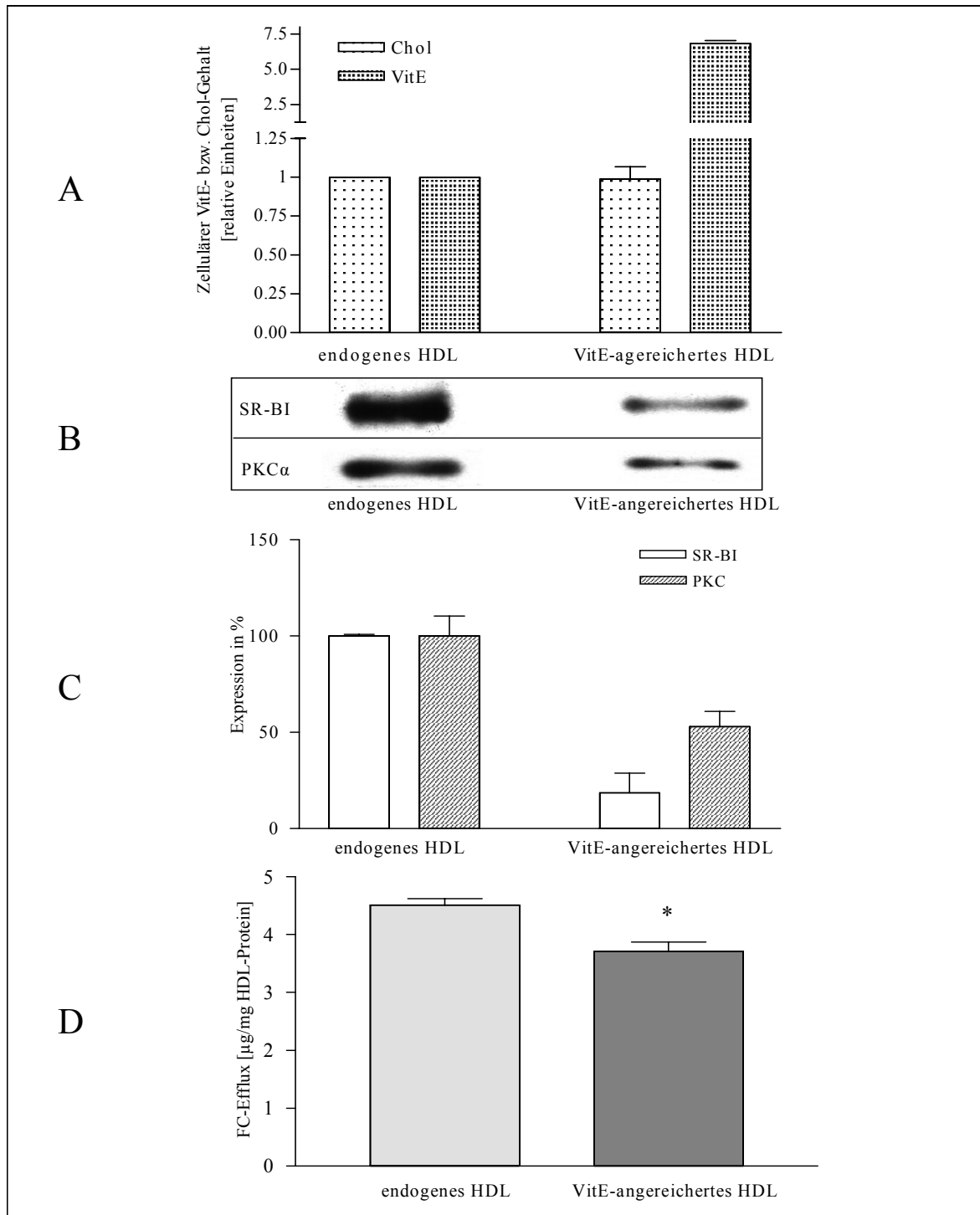


Abbildung 3. Effekt der Vitamin-E-vermittelten Erniedrigung der SR-BI-Expression auf den Cholesterolefflux. HepG2-Zellen wurden für 40 h mit endogenem HDL oder Vitamin-E-angereichertem ^3H -Cholesterol-markiertem HDL inkubiert. **A:** der zelluläre Vitamin-E- und Cholesterolgehalt wurde gemessen und die SR-BI- und PKC α -Expression mittels Western Blot bestimmt (**B, C**). Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation der Zellen mit nativem HDL (60 μg Protein/ml) für 30 min. **D:** Vitamin-E-angereicherte Zellen mit PKC-vermittelter Reduktion der SR-BI-Expression zeigten einen signifikant (* $P < 0,05$) verminderten Efflux von freiem Cholesterol (FC) zu HDL als Akzeptorpartikeln. Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen.

4.3 Einfluß des zellulären Cholesterolgehalts auf die Expression von PKC α und SR-BI und auf den bidirektionalen Cholesterolflox

Zur Modifikation des Cholesterolgehalts der HepG2-Zellen wurde Methyl- β -Cyclodextrin (M- β -CD) gewählt, da es den Zellen sehr rasch Cholesterol entziehen, in Form M- β -CD-Cholesterol-Komplexen dagegen die zelluläre Cholesterolkonzentration erhöhen kann (auf ca. ein Drittel bzw. das Doppelte der Kontrolle innerhalb von 1 h). Im Unterschied zu dem für die Cholesterolanreicherung ebenfalls einsetzbaren LDL kann bei Verwendung von M- β -CD eine zelluläre Aufnahme von anderen Lipiden - insbesondere Vitamin E - ausgeschlossen werden, welche die SR-BI-Expression verändern könnten.

Die in ihrem Cholesterolgehalt veränderten Zellen wurden für 3 h bzw. 6 h mit lipoproteinfreiem Serum inkubiert und auf ihren Cholesterol- und Vitamin-E-Gehalt bzw. die Expression von SR-BI und PKC untersucht. Da SR-BI ein mäßig stabiles Protein ist [41], sollten Expressionsveränderungen von SR-BI nach 3 bzw. 6 h gut messbar sein. Ein Teil der Cholesterol-angereicherten Zellen wurde mit nativem HDL (60 μ g Protein/ml) für 30 min inkubiert und der Efflux von freiem Cholesterol zu HDL als Akzeptorpartikel bestimmt.

Erhöhung des zellulären Cholesterolgehalts:

Wie aus Abbildung 4 A hervorgeht, bewirkte die Inkubation mit dem M- β -CD-Cholesterol-Komplex eine Erhöhung des zellulären Gesamtcholesterols auf 198 ± 22 %, während der Vitamin-E-Gehalt keine signifikanten Veränderungen zeigte. Die Expression von SR-BI und PKC α blieb in Cholesterol-angereicherten Zellen sowohl nach 3, als auch nach 6 Stunden konstant (4 B, C). Dennoch war der zelluläre Cholesterolefflux zu HDL als Akzeptor signifikant erhöht (4 D).

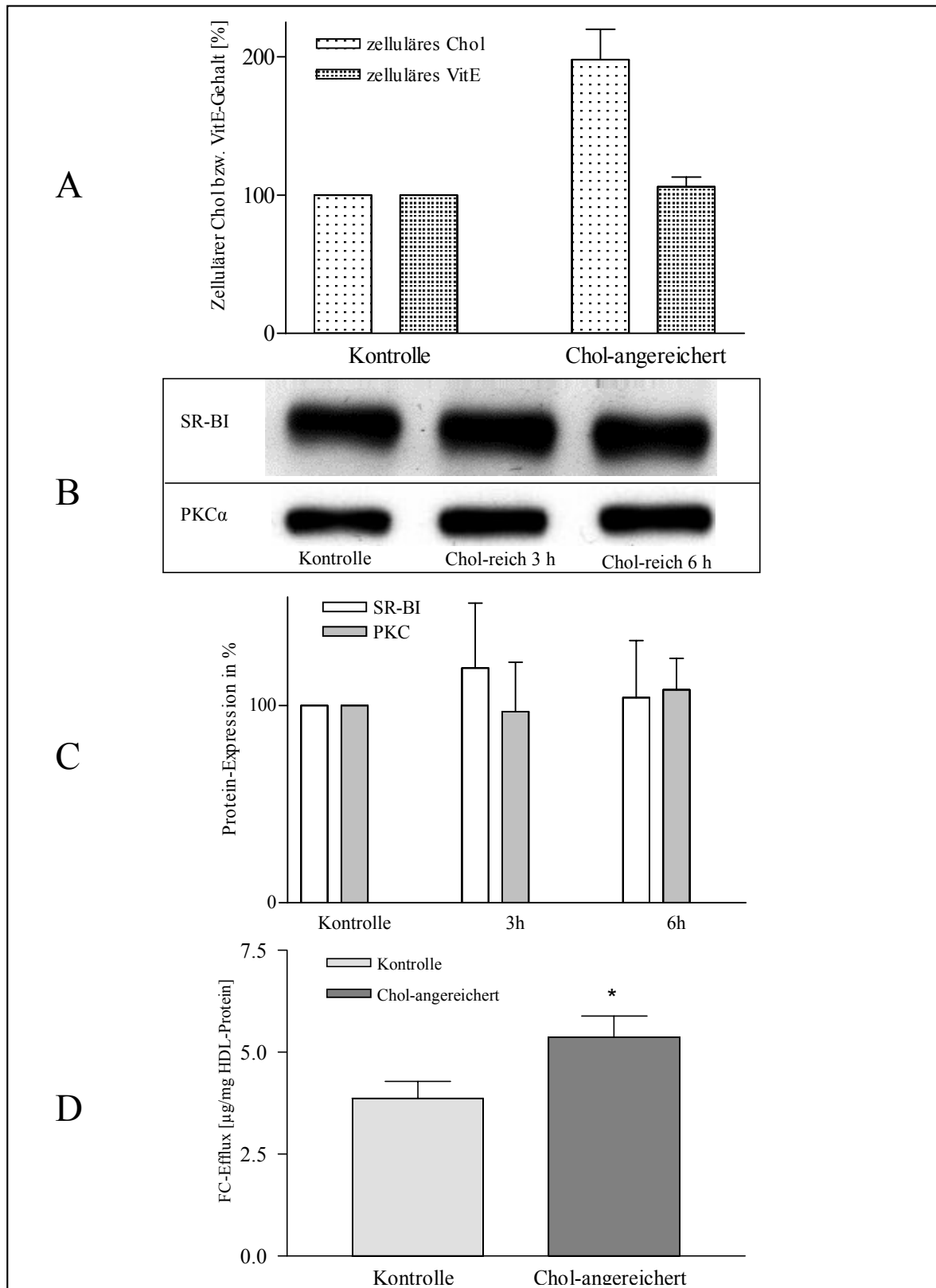


Abbildung 4. Effekt der zellulären Cholesterolanreicherung auf die Expression von SR-BI und PKC und den Cholesterolefflux. HepG2-Zellen wurden für 1 h mit M- β -CD-Cholesterol-Komplex an Cholesterol angereichert, gewaschen und für 3 bzw. 6 h mit lipoproteinfreiem Medium inkubiert. Der zelluläre Cholesterolgehalt wurde so auf 198 ± 22 % der Kontrolle erhöht, während der Vitamin-E-Gehalt gleich blieb (A). In der Western Blot-Analyse ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der SR-BI- bzw. PKC-Expression (B,C). D: Densitometrische Auswertung verschiedener Western Blots. E: Der Cholesterolefflux zu HDL als Akzeptor aus Cholesterol-angereicherten Zellen war signifikant erhöht (*signifikant, $P < 0,01$). Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen.

Kontrollzellen und Cholesterol-angereicherte Zellen wurden mit ^3H -Cholesterol-markiertem und Vitamin-E-angereichertem HDL ($19,48 \mu\text{g}/\text{mg}$ Protein; 1h; 37°C) inkubiert. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Aufnahme beider Lipide (siehe Abbildung 5) nach 1 h bzw. 2 h Inkubationszeit, während der Cholesterolefflux trotz unveränderter SR-BI Expression erhöht war (vgl. Abbildung 4 D).

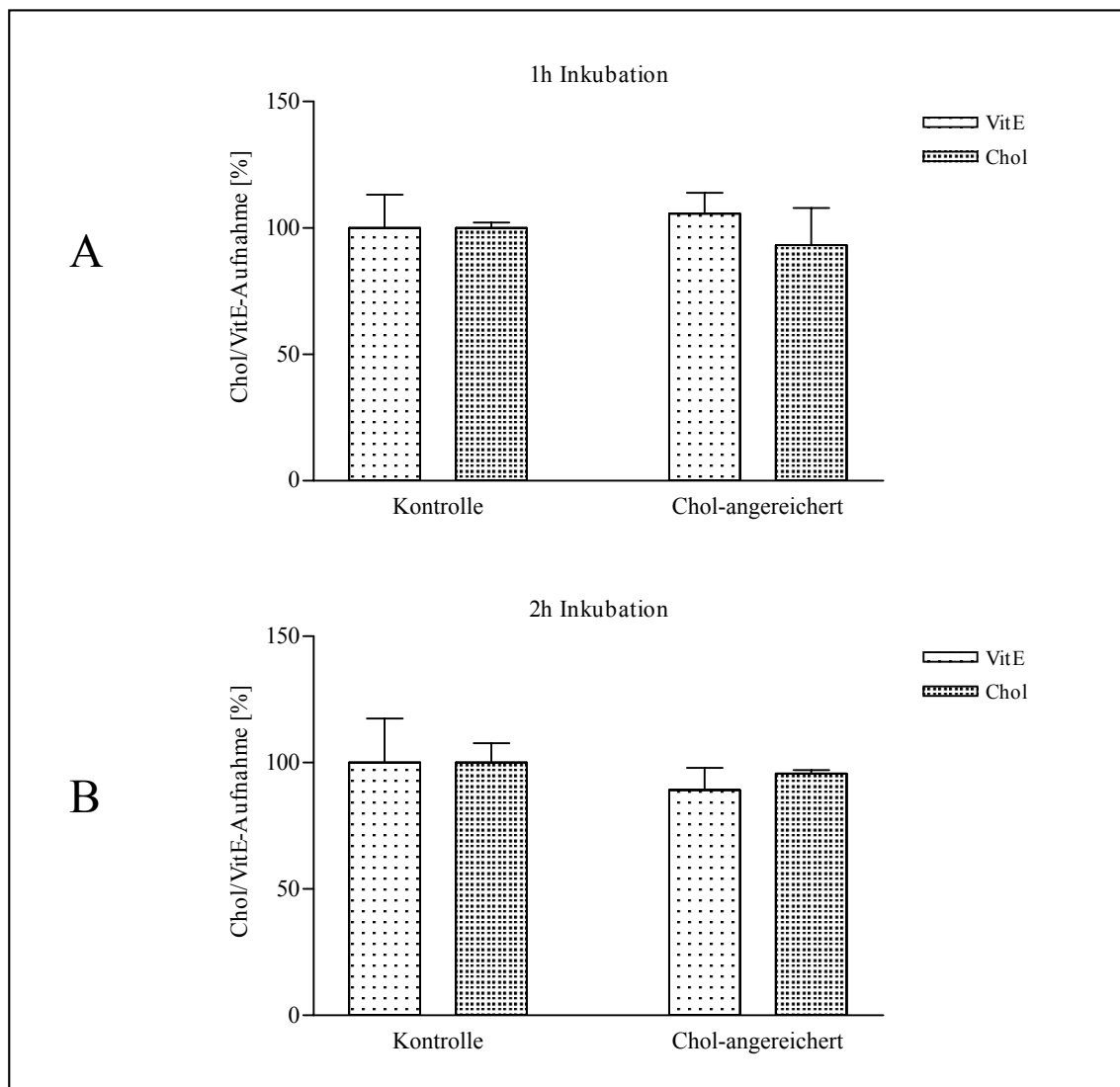


Abbildung 5. Vitamin-E- und Cholesterol-Aufnahme aus HDL in Cholesterol-angereicherte und Kontrollzellen. Zelluläre Aufnahme von HDL-gebundenem Cholesterol und Vitamin E in Kontroll- und Cholesterol-angereicherte Zellen nach 1 h (A) und 2 h (B) Inkubationszeit. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen.

Erniedrigung des zellulären Cholesterolgehalts:

Durch Inkubation mit 5 mM M- β -CD für 1 h wurde der zelluläre Cholesterolgehalt auf $34 \pm 9 \%$ der Kontrolle gesenkt. Der endogene Vitamin-E-Gehalt der Zellen war sehr niedrig und lag hauptsächlich in Form von Vitamin-E-Chinon vor. Nach einstündiger Inkubation mit M- β -CD

blieb der zelluläre Vitamin-E-Gehalt unverändert (siehe Abbildung 6A). Hingegen war die SR-BI- und PKC-Expression nach der anschließenden Inkubation der Cholesterolverarmten Zellen mit lipoproteinfreiem Medium zunehmend erniedrigt (6 B-D).

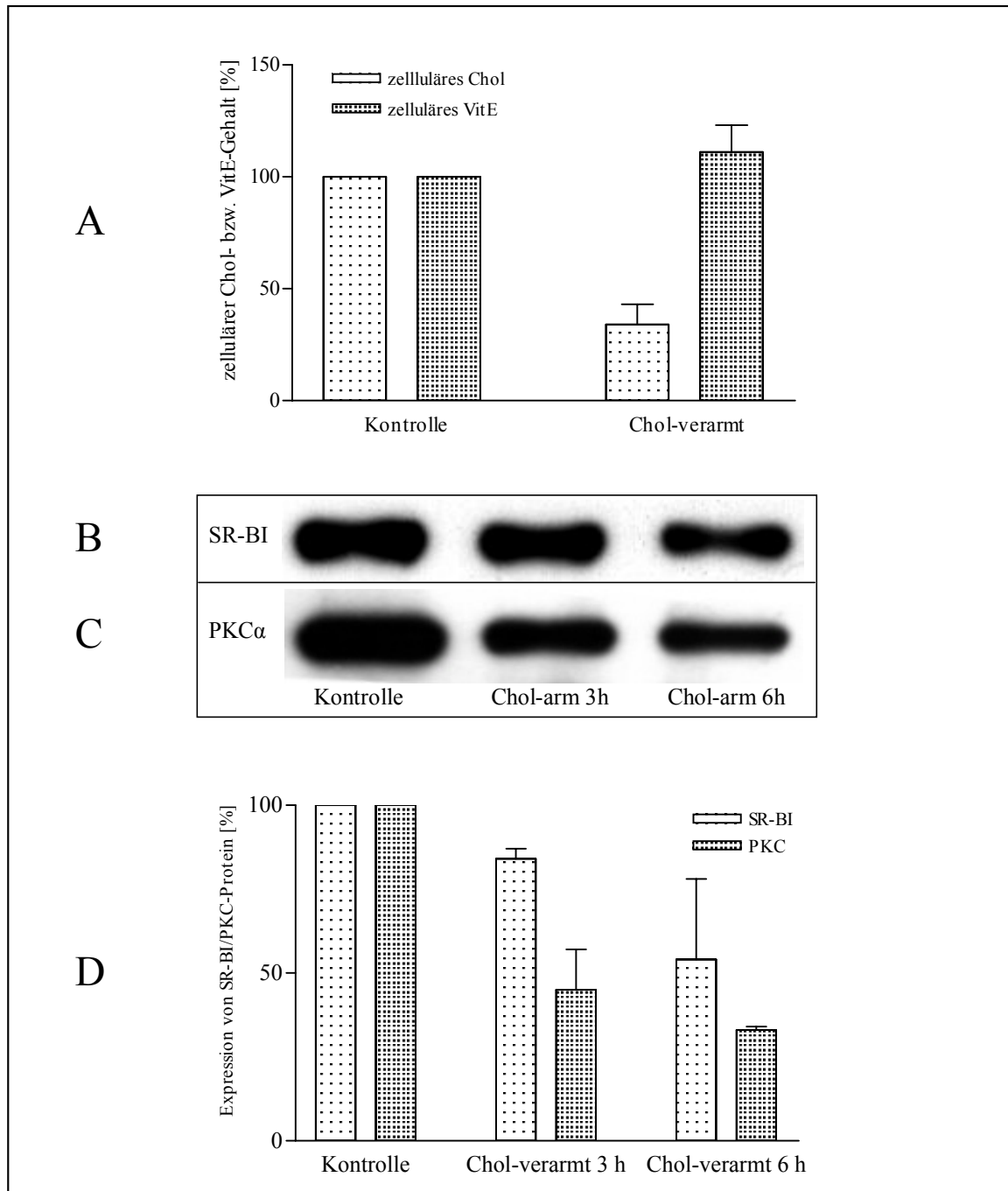


Abbildung 6. Effekt der Cholesterolverarmung von HepG2-Zellen auf die Expression von SR-BI und PKC. HepG2-Zellen wurden durch Inkubation mit 5 mM M- β -CD in RPMI-Medium an Cholesterolverarmt und nach dem Waschen für 3 bzw. 6 h mit lipoproteinfreiem Medium inkubiert. **A:** Der zelluläre Cholesterolgehalt wurde so auf 34 ± 9 % der Kontrolle reduziert, während der zelluläre Vitamin-E-Gehalt keine signifikanten Veränderungen zeigte. Die Western Blot-Analyse der SR-BI- (**B**) und PKC- (**C**) Expression zeigte eine schrittweise Reduktion in Cholesterolverarmten Zellen nach 3 bzw. 6 h. **D:** Quantifizierung der Proteinexpression durch densitometrische Analyse. Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen.

5. DISKUSSION

5.1 Effekt des Vitamin-E-Gehalts von HDL auf die Aufnahme von Cholesterol und Vitamin E in Hep G2-Zellen

Cholesterol und Vitamin E sind für eine normale Zellfunktion essentiell. Während Cholesterol die physikochemischen Eigenschaften der Plasmamembran reguliert und eine wichtige Rolle in Signaltransduktions- und Stoffwechselfvorgängen spielt, schützt Vitamin E die Zelle vor der Schädigung durch Lipid-Peroxidation und ist in Form von α -Tocopherol an regulativen Prozessen in der Zelle beteiligt.

Cholesterol kann von menschlichen Zellen nur in begrenztem Maße synthetisiert werden, Vitamin E wird von eukariontischen Zellen nicht produziert. Beide Stoffe müssen daher aus dem extrazellulären Raum aufgenommen werden. Cholesterol und Vitamin E sind lipophil und werden im Blutplasma in Bindung an Lipoproteine transportiert. Es ist beschrieben, daß sowohl Cholesterol als auch Vitamin E aus High Density Lipoproteinen über Scavenger Receptor B I-vermittelten *Selective Lipid Transfer* aufgenommen werden kann [20, 51].

Daraus ergibt sich die Frage, ob die beiden Moleküle um den Transport am Rezeptor konkurrieren. Hierdurch könnte bei erhöhtem Umsatz von Cholesterol ein zellulärer Vitamin-E-Mangel entstehen, der zu einer verstärkten Apoptoseneigung führen kann [99]. Denkbar wäre auch ein Ko-Transport beider Substanzen in einem festen Verhältnis, wodurch Zellen bei verstärkter Vitamin-E-Aufnahme (z.B. Hyperoxie bei Typ II-Pneumozyten [100]) auch mehr Cholesterol aufnehmen müßten und so zu „Schaumzellen“ werden könnten. Schließlich könnten die Zellen auch in der Lage sein, beide Lipide unabhängig voneinander ihrem Bedarf entsprechend aufzunehmen.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden HepG2-Zellen mit endogenem oder mit unterschiedlich stark Vitamin-E-angereichertem HDL inkubiert. Wir konnten bei ansteigender Vitamin-E-Konzentration im HDL eine zunehmende Aufnahme in die Zelle feststellen, während Cholesterol in gleichbleibender Menge aufgenommen wurde.

Dieses Ergebnis war von der Inkubationszeit unabhängig: Wir fanden zu verschiedenen Zeitpunkten keinen Unterschied in der Cholesterolaufnahme aus beiden HDL-Fractionen, während die α -Tocopherol-Aufnahme aus Vitamin-E-angereichertem HDL anstieg, aus endogenem HDL

jedoch konstant blieb. Zusammengenommen weisen diese Resultate darauf hin, daß der Vitamin-E-Gehalt im HDL-Donorpartikel die zelluläre Vitamin-E-Aufnahme reguliert.

Diese Erklärung deckt sich mit den Ergebnissen von Rodriguez [88], die fanden, daß der *Selective Uptake* von Cholesterylestern proportional zu ihrem Gehalt in den Donorpartikeln stattfindet. Sie vermuteten, daß der Transport von Lipiden aus dem Inneren des HDL-Partikels in die Zellmembran durch einen bei der Bindung der Lipoproteine an den Rezeptor entstehenden hydrophoben Tunnel stattfindet und vom Konzentrationsgradienten angetrieben wird.

In einem ähnlichen Versuchsansatz haben Greene et al. [89] die Aufnahme von Triglyceriden (TG) und Cholesterylestern (CE) aus HDL untersucht. Dabei war die Menge des aus *in vitro* modifizierten HDL verschiedenen TG- und CE-Konzentrationen aufgenommenen Substrates abhängig von seinem Anteil im HDL-Partikel, und es ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem TG/CE-Verhältnis im HDL und dem Verhältnis der in die Zelle aufgenommenen Lipide. Die jeweiligen Anteile der verschiedenen Substrate im HDL spiegeln sich also im Verhältnis ihrer zellulären Aufnahme wieder. Diese Ergebnisse stimmen mit dem von uns gefundenen linearen Zusammenhang zwischen dem Cholesterol/Vitamin-E-Verhältnis im HDL und der zellulären Aufnahme der beiden Substanzen überein.

Außerdem maßen Greene et al. eine abnehmende CE-Aufnahme mit steigendem TG-Gehalt des HDL. Hingegen konnten wir keine Abnahme der Cholesterolaufnahme bei steigender Vitamin-E-Aufnahme feststellen. Dies ist insofern nicht überraschend, als der *Selective Uptake* von polaren und apolaren Lipiden vermutlich durch verschiedene Mechanismen vermittelt wird [40]. Ein weiterer möglicher Grund ist, daß das von uns verwendete HDL erheblich weniger Tocopherol als Cholesterol enthielt (0,67 bis 5,86 Moleküle α -Tocopherol auf 100 Moleküle Cholesterol), während in dem von Green modifizierten HDL Triglyceride und Cholesterolester in ähnlicher Menge vorlagen (30 bis 125 Moleküle TG auf 100 Moleküle CE).

In Erweiterung der Ergebnisse von Witt et al. [73] zeigt die vorliegende Arbeit, daß eine schrittweise Erhöhung der zellulären Vitamin-E-Konzentration zu einer schrittweise erniedrigten SR-BI-Expression in HepG2-Zellen führt. Dabei nahm die Vitamin-E-Aufnahme weiter zu, während die Aufnahme von Cholesterol gleich blieb, obwohl SR-BI in geringerem Maße exprimiert wurde. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, daß die Kapazität von SR-BI für die Aufnahme von Cholesterol und Vitamin E in HepG2-Zellen sehr hoch ist, so daß eine graduelle Abnahme von SR-BI keine Auswirkungen auf die Menge der aufgenommenen Substrate hat. Diese Vermutung wird durch die Feststellung bestätigt, daß die Reduktion der SR-BI-Expression auf 5,5 % der Kontrollwerte in HepG2-Zellen nur eine Verminderung der Vitamin-E-Aufnahme auf 32 % und der Cholesterolaufnahme lediglich auf 62 % bewirkt [73].

Eine andere Erklärung wäre, daß die Aufnahme beider Lipide in die Zellen durch SR-BI-unabhängige Mechanismen vermittelt sein könnte. Diese Annahme scheint durch das Ergebnis gestützt zu werden, daß der Vitamin-E-Gehalt in der Leber von SR-BI-Knockout-Mäusen unverändert und der Cholesterolgehalt nur leicht erhöht ist [101, 102]. Jedoch könnte dies auch als vollständige Kompensation des SR-BI-Mangels durch andere, unter physiologischen Bedingungen untergeordnete Mechanismen verstanden werden. Für diese Argumentation spricht die physiologischerweise hohe hepatische Expression von SR-BI, die mit der entscheidenden Rolle der Leber für die selektive Cholesterolaufnahme und den HDL-Stoffwechsel *in vivo* korrespondiert [40].

5.2 Einfluß des zellulären Vitamin-E-Gehalts auf die Expression von PKC α und SR-BI und auf den Cholesterolefflux

Der Fluß von freiem Cholesterol (FC) zwischen HDL und Zellen ist bidirektional. In Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten zwischen den Zellen und den Donorpartikeln resultiert ein Netto-Influx bzw. -Efflux von freiem Cholesterol [103, 104]. Wenn Zellen SR-BI exprimieren, wird der bidirektionale Cholesterolfux beschleunigt [53, 54, 104]. De la Llera-Moy konnten zeigen, daß SR-BI den Cholesterolefflux über einen weiten Bereich von HDL-Konzentrationen stimuliert, wobei die Konzentrations-Efflux-Kurve einen biphasischen Verlauf mit halbmaximalen Effluxraten bei 30 bzw. 1130 μg HDL-Protein/ml aufwies. Die niedrigere Konzentration liegt im Bereich der Dissoziationskonstante für die Bindung von HDL an SR-BI [38, 55]. Diese hocheffiziente Komponente des SR-BI-vermittelten Cholesterolefflux scheint von der HDL-Bindung an den Rezeptor abhängig zu sein [105, 106]. Jedoch blieb bei höheren HDL-Konzentrationen trotz Sättigung der SR-BI-HDL-Bindung eine Proportionalität zum FC-Efflux bestehen. Dies weist auf die Existenz eines anderen Mechanismus von geringerer Effizienz hin, für den die Bindung des Akzeptors an SR-BI kaum relevant ist. Damit könnte auch erklärt werden, daß SR-BI den zellulären Efflux auch zu Phospholipid-Vesikeln stimuliert [54, 55] die keine Bindung mit dem Rezeptor eingehen. Außerdem gehen mehrere Autoren davon aus, daß SR-BI Lipiddomänen in der Plasmamembran modifiziert und so den Flux von freiem Cholesterol erleichtert [40, 107]. Die in unseren Experimenten verwendete HDL-Konzentration liegt mit 60 μg Protein/ml im Bereich des hocheffizienten SR-BI-vermittelten Cholesterolefflux.

Bei den Experimenten zur Vitamin-E-Aufnahme in HepG2-Zellen fanden wir eine dosisabhängige *Downregulation* der SR-BI-Expression in HepG2-Zellen mit steigendem Vitamin-E-Gehalt des angebotenen HDL. Witt et al. [73] konnten zeigen, daß die Anreicherung verschiedener Zelltypen mit Vitamin E zu einer Erniedrigung der SR-BI-Expression führt, die Protein-Kinase-C α -vermittelt ist und zu einer reduzierten Aufnahme von Cholesterol und α -Tocopherol führt.

Wir fanden keine signifikanten Unterschiede im Cholesterolgehalt der mit endogenem oder Vitamin-E-reichem HDL inkubierten Zellen. Es zeigte sich jedoch eine hochsignifikante Verringerung der Expression des SR-BI und der PKC α in der Membranfraktion von Vitamin-E-angereicherten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Diese zellulären Veränderungen waren mit einer ebenfalls hochsignifikanten Erniedrigung des Cholesterolefflux in die HDL-Partikel assoziiert.

Unsere Ergebnisse werden bestätigt durch die grundlegenden Arbeiten von J und Jia, die in den ersten Arbeiten zum HDL-vermittelten Cholesterolefflux mit stabil SR-BI-transfizierten Mäusen

eine starke Korrelation zwischen der Expression des SR-BI und der Effluxrate in HDL und verschiedene andere Akzeptoren fanden [54, 62]. Lange [108] konnten zeigen, daß Testosteron eine Erhöhung der SR-BI-Expression und einen gesteigerten Efflux von Cholesterol aus Makrophagen bewirkt, und so demonstrieren, daß auch die Modifikation der SR-BI-Expression durch exogene Substanzen den Cholesterolefflux beeinflusst.

Die von uns gefundene starke Erniedrigung der SR-BI-Expression durch Vitamin-E-Anreicherung der Zelle sollte eine deutliche Abnahme des Cholesterolefflux bewirken, jedoch führte eine Reduktion des SR-BI-Gehalts in der HepG2-Membran auf 20 % der Kontrolle nur zu einer Erniedrigung des Efflux auf ca. 80 %. Analog zu den moderaten Auswirkungen einer deutlichen SR-BI-*Downregulation* auf die Cholesterolaufnahme könnte auch diese vergleichsweise leichte Verminderung des Cholesterol-Efflux mit der hohen Kapazität des Rezeptors erklärt werden. Zudem könnte sich der Rezeptor zum Teil nicht in einem voll funktionellen Zustand befinden haben oder funktionell inadäquat in der Zelle lokalisiert gewesen sein [73].

Es scheint unwahrscheinlich, daß der hohe zelluläre Vitamin-E-Gehalt den Efflux von Cholesterol gehemmt hat, da die beiden Lipide nicht um denselben Efflux-Mechanismus konkurrieren. Ein Efflux von Vitamin-E aus Hepatozyten könnte im Rahmen der intrazellulären Bildung von naszierenden VLDL stattfinden [16], während Cholesterolefflux aus der Zelle außer durch SR-BI auch durch verschiedene andere Mechanismen vermittelt werden kann. Zellen können Cholesterol ebenso durch freie Diffusion [109] bzw. über aktiven Transport durch die *Multidrug Transporter* MDR-1 und ABC1 aus der Familie der ABC(ATP-binding cassette)-Transmembrantransporter [110, 111] abgeben. Ebenso kommt „Microsolubilization“ für den Efflux von zellulärem Cholesterol in Frage [112] - ein neuer Mechanismus, definiert als multi-molekulare Dissoziation von Cholesterol- und Phospholipidkomplexen aus der Zellmembran in Anwesenheit von Apo A-I, dem Hauptapolipoprotein von HDL [113].

5.3 Einfluß des zellulären Cholesterolgehalts auf die Expression von PKC α und SR-BI und auf den bidirektionalen Cholesterolflix

Während die durch Vitamin-E-Anreicherung der Zellen bewirkte PKC-vermittelte SR-BI-*Downregulation* gut dokumentiert ist, sind verschiedene Arbeiten zur Regulation von SR-BI durch den Cholesterolgehalt der Zelle zu widersprüchlichen Ergebnissen gekommen. Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluß des zellulären Cholesterolgehalts auf die Expression von SR-BI und PKC und den Cholesterolefflux in HepG2-Zellen.

Wie in der Einleitung beschrieben, haben mehrere Studien einen wechselseitigen Zusammenhang zwischen dem Plasmacholesterolgehalt und der Expression von SR-BI festgestellt [61, 65, 67, 71, 114]. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß Cholesterole die SR-BI-Expression in der Leber regulieren könnte. Jedoch ist der direkte Effekt einer Erhöhung des zellulären Cholesterolgehalts auf die SR-BI-Expression in Leberzellen bislang kaum untersucht worden. Die Erniedrigung des zellulären Cholesterolgehalts mit β -Cyclodextrin in Y1-BS1-Zellen führte zu einer schnellen Erhöhung der SR-BI-Expression auf mRNA- und Proteinebene [115]. Dagegen zeigte die drastische Anreicherung von ovariellen Zellen mit HDL-Cholesterole keinen Effekt auf die SR-BI-Expression [116]. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß die Erniedrigung des zellulären Cholesterolgehalts die PKC- und SR-BI-Expression in HepG2-Zellen signifikant reduziert, während die Erhöhung des zellulären Cholesterolgehalts die SR-BI-Expression nicht beeinflußt.

Die Cholesterolanreicherung der Zellen war dennoch mit einem Anstieg des Cholesterolefflux verbunden, weil vermutlich die Kapazität des verbliebenen funktionellen SR-BI für einen gesteigerten Efflux entlang dem Konzentrationsgradienten ausreichend war. Hingegen zeigten sich analog zur unveränderten SR-BI-Expression keine Unterschiede in der Aufnahme von Cholesterole und Vitamin E in Cholesterole-angereicherte Zellen, die offenbar noch nicht vollständig mit Cholesterole gesättigt waren. Wenn bei einer Erhöhung des zellulären Cholesterols also die zellwärts gerichtete Komponente des bidirektionalen Flusses zunächst gleich bleibt, die Effluxrate aber gesteigert ist, verschiebt sich der Netto-Flux von freiem Cholesterole zugunsten des Efflux.

Die Regulation der hepatischen SR-BI-Expression ist von großem Interesse, weil der Reverse Cholesterole Transport SR-BI-vermittelt ist und sich zum Teil in der Leber abspielt. Transformierte Zelllinien wie HepG2 sind hierfür ein praktisches Modell, da menschliche Hepatozyten in Zellkultur kaum erhältlich sind und HepG2-Zellen viele biochemische Eigenschaften menschlicher Hepatozyten behalten haben [117, 118, 119]. Wenn die mit HepG2-Zellen erhaltenen Er-

gebnisse also auf Leberzellen übertragbar sind, kann man schlußfolgern, daß der zelluläre Vitamin-E- und Cholesterol-Gehalt die hepatische SR-BI-Expression und somit den bidirektionalen Cholesterolfluß regulieren. Während es ein direktes *feed back* zwischen dem Vitamin-E-Gehalt in den Zellen oder im Plasma und der hepatischen SR-BI-Expression gibt, ist ihre Abhängigkeit vom zellulären Cholesterolgehalt um einiges schwächer.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Scavenger Rezeptor BI (SR-BI) ist, zusammen mit seiner splicing-Variante SR-BII, der einzige bislang charakterisierte Rezeptor für High Density Lipoproteine (HDL). In zahlreichen aktuellen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die Expression von SR-BI einen anthiatherogenen Effekt hat und für die Fertilität und den Lipidstoffwechsel von Bedeutung ist. SR-BI wird besonders in Steroidhormon-produzierenden Zellen und Leberzellen stark exprimiert, wo er eine Schlüsselstellung im Reversen Cholesterol Transport einnimmt. In diesem Zusammenhang ist die Regulation der SR-BI-Expression und der selektiven Aufnahme verschiedener Lipide in der Leber von besonderem Interesse.

Sowohl Cholesterol, als auch Vitamin E werden über den SR-BI-vermittelten *Selective Lipid Transfer* aus HDL in Leberzellen aufgenommen. Aus der Aufnahme verschiedener Substrate über den gleichen Mechanismus am gleichen Rezeptor ergibt sich die Frage, ob die beiden Prozesse einander beeinflussen. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, daß die Aufnahme verschiedener Lipidklassen aus HDL von der Lipidzusammensetzung der Donorpartikel bestimmt werden könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der Vitamin-E-Gehalt des Donor-HDL die Vitamin-E-Aufnahme in HepG2-Zellen bestimmt, die gleichzeitige Aufnahme von freiem Cholesterol jedoch nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis war von der Inkubationszeit unabhängig. Die schrittweise Erhöhung der zellulären Vitamin-E-Konzentration führte zu einer schrittweisen *Downregulation* der SR-BI-Expression.

Der Fluß von freiem Cholesterol zwischen Zellen und HDL ist bidirektional. In Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten zwischen den Zellen und den Donorpartikeln resultiert ein Netto-Influx bzw. -Efflux von freiem Cholesterol. SR-BI beschleunigt den bidirektionalen Cholesterolflux. Wir konnten zeigen, daß durch Vitamin-E-Anreicherung der Zellen und dadurch reduzierte PKC α - und SR-BI-Expression der Cholesterol-Efflux aus HepG2-Zellen zu HDL als Akzeptorpartikel signifikant erniedrigt wird.

Da frühere Studien einen wechselseitigen Zusammenhang zwischen der SR-BI-Expression und dem Plasmacholesterolgehalt von Versuchstieren zeigten, wurde vermutet, daß Cholesterol die Expression von SR-BI in der Leber reguliert. Jedoch erbrachten Experimente, in denen der Cholesterolgehalt auf zellulärer Ebene manipuliert wurde, widersprüchliche Ergebnisse.

Diese Arbeit zeigt, daß eine Erhöhung des Cholesterolgehalts von HepG2-Zellen keinen Einfluß auf die Expression von PKC α und SR-BI und die selektive Aufnahme von Vitamin-E und Cholesterol hat. Der Cholesterolefflux aus Zellen mit erhöhtem Cholesterolgehalt ist jedoch signifikant erhöht. Wurden die Zellen an Cholesterol verarmt, resultierte eine Erniedrigung der Expression von SR-BI und PKC α . Hieraus ergibt sich die Schlußfolgerung, daß die zelluläre Konzentration von Vitamin E und Cholesterol die SR-BI-Expression und den SR-BI-vermittelten Cholesterolefflux in HepG2-Zellen reguliert.

7. LITERATUR

- [1] Tappel, A.L. (1962): Vitamin E as the biological lipid antioxidant, *Vit.Horm.* 20, Seite 493-510.
- [2] Burton, G.W.; Joyce, A. und Ingold, K.U. (1983): Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?, *Arch Biochem Biophys* 221 [1], Seite 281-290.
- [3] Steinberg, D. (1997): Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance, *J Biol Chem* 272 [34], Seite 20963-20966.
- [4] Pryor, W.A. (2000): Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Radic Biol Med* 28 [1], Seite 141-164.
- [5] Stephens, N.G.; Parsons, A.; Schofield, P.M.; Kelly, F.; Cheeseman, K. und Mitchinson, M.J. (1996): Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS), *Lancet* 347 [9004], Seite 781-786.
- [6] Spector, R. und Vesell, E.S. (2002): Which studies of therapy merit credence? Vitamin E and estrogen therapy as cautionary examples, *J Clin Pharmacol* 42 [9], Seite 955-962.
- [7] Ricciarelli, R.; Tasinato, A.; Clement, S.; Ozer, N.K.; Boscoboinik, D. und Azzi, A. (1998): alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state, *Biochem J* 334 (Pt 1), Seite 243-249.
- [8] Kolley, I.; Witt, W.; Wissel, H.; Sinha, P. und Rustow, B. (2000): HDL and vitamin E in plasma and the expression of SR-BI on lung cells during rat perinatal development, *Lung* 178 [4], Seite 191-200.
- [9] Boscoboinik, D.; Szewczyk, A.; Hensey, C. und Azzi, A. (1991): Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C, *J Biol Chem* 266 [10], Seite 6188-6194.

- [10] Szuwart, T.; Brzoska, T.; Luger, T.A.; Filler, T.; Peuker, E. und Dierichs, R. (2000): Vitamin E reduces platelet adhesion to human endothelial cells in vitro, *Am J Hematol* 65 [1], Seite 1-4.
- [11] Saldeen, T.; Li, D. und Mehta, J.L. (1999): Differential effects of alpha- and gamma-tocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis, *J Am Coll Cardiol* 34 [4], Seite 1208-1215.
- [12] Aratri, E.; Spycher, S.E.; Breyer, I. und Azzi, A. (1999): Modulation of alpha-tropomyosin expression by alpha-tocopherol in rat vascular smooth muscle cells, *FEBS Lett* 447 [1], Seite 91-94.
- [13] Ricciarelli, R.; Zingg, J.M. und Azzi, A. (2000): Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells, *Circulation* 102 [1], Seite 82-87.
- [14] Azzi, A.; Ricciarelli, R. und Zingg, J.M. (2002): Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E), *FEBS Lett* 519 [1-3], Seite 8-10.
- [15] Horwitt, M.K. (2001): Critique of the requirement for vitamin E, *Am J Clin Nutr* 73 [6], Seite 1003-1005.
- [16] Traber, M.G. und Sies, H. (1996): Vitamin E in humans: demand and delivery, *Annu Rev Nutr* 16, Seite 321-347.
- [17] Brigelius-Flohe, R. und Traber, M.G. (1999): Vitamin E: function and metabolism, *FASEB J* 13 [10], Seite 1145-1155.
- [18] Sattler, W. und Stocker, R. (1993): Greater selective uptake by Hep G2 cells of high-density lipoprotein cholesteryl ester hydroperoxides than of unoxidized cholesteryl esters, *Biochem J* 294 (Pt 3), Seite 771-778.
- [19] Traber, M.G. und Kayden, H.J. (1984): Vitamin E is delivered to cells via the high affinity receptor for low-density lipoprotein, *Am J Clin Nutr* 40 [4], Seite 747-751.

- [20] Goti, D.; Reicher, H.; Malle, E.; Kostner, G.M.; Panzenboeck, U. und Sattler, W. (1998): High-density lipoprotein (HDL3)-associated alpha-tocopherol is taken up by HepG2 cells via the selective uptake pathway and resecreted with endogenously synthesized apo-lipoprotein B-rich lipoprotein particles, *Biochem J* 332 (Pt 1), Seite 57-65.
- [21] Löffler, G. und Petrides, P. (1997): *Biochemie und Pathobiochemie*, Berlin Heidelberg New York.
- [22] Krieger, M. (1999): Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI, *Annu Rev Biochem* 68, Seite 523-558.
- [23] Simons, K. und Ikonen, E. (2000): How cells handle cholesterol, *Science* 290 [5497], Seite 1721-1726.
- [24] Fielding, C.J. und Fielding, P.E. (1995): Molecular physiology of reverse cholesterol transport, *J Lipid Res* 36 [2], Seite 211-228.
- [25] Pieters, M.N.; Schouten, D. und Van Berkel, T.J. (1994): In vitro and in vivo evidence for the role of HDL in reverse cholesterol transport, *Biochim Biophys Acta* 1225 [2], Seite 125-134.
- [26] Krieger, M. (1998): The "best" of cholesterol, the "worst" of cholesterol: a tale of two receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [8], Seite 4077-4080.
- [27] Botham, K.M. und Bravo, E. (1995): The role of lipoprotein cholesterol in biliary steroid secretion. Studies with in vivo experimental models, *Prog Lipid Res* 34 [1], Seite 71-97.
- [28] Gwynne, J.T. und Strauss, J.F., 3rd (1982): The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands, *Endocr Rev* 3 [3], Seite 299-329.
- [29] Glass, C.; Pittman, R.C.; Weinstein, D.B. und Steinberg, D. (1983): Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipopro-

- tein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad, Proc Natl Acad Sci U S A 80 [17], Seite 5435-5439.
- [30] Glomset, J.A. (1968): The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction, J Lipid Res 9 [2], Seite 155-167.
- [31] Gwynne, J.T. (1989): High-density lipoprotein cholesterol levels as a marker of reverse cholesterol transport, Am J Cardiol 64 [13], Seite 10G-17G.
- [32] Gwynne, J.T. und Mahaffee, D.D. (1989): Rat adrenal uptake and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester, J Biol Chem 264 [14], Seite 8141-8150.
- [33] Oram, J.F. und Yokoyama, S. (1996): Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids, J Lipid Res 37 [12], Seite 2473-2491.
- [34] Brown, M.S. und Goldstein, J.L. (1999): A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood, Proc Natl Acad Sci U S A 96 [20], Seite 11041-11048.
- [35] Brown, M.S.; Ye, J.; Rawson, R.B. und Goldstein, J.L. (2000): Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans, Cell 100 [4], Seite 391-398.
- [36] Yokoyama, S. (2000): Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body, Biochim Biophys Acta 1529 [1-3], Seite 231-244.
- [37] Christian, A.E.; Haynes, M.P.; Phillips, M.C. und Rothblat, G.H. (1997): Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content, J Lipid Res 38 [11], Seite 2264-2272.
- [38] Acton, S.; Rigotti, A.; Landschulz, K.T.; Xu, S.; Hobbs, H.H. und Krieger, M. (1996): Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor, Science 271 [5248], Seite 518-520.

- [39] Acton, S.L.; Scherer, P.E.; Lodish, H.F. und Krieger, M. (1994): Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor, *J Biol Chem* 269 [33], Seite 21003-21009.
- [40] Williams, D.L.; Connelly, M.A.; Temel, R.E.; Swarnakar, S.; Phillips, M.C.; de la Llera-Moya, M. und Rothblat, G.H. (1999): Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking, *Curr Opin Lipidol* 10 [4], Seite 329-339.
- [41] Babitt, J.; Trigatti, B.; Rigotti, A.; Smart, E.J.; Anderson, R.G.; Xu, S. und Krieger, M. (1997): Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae, *J Biol Chem* 272 [20], Seite 13242-13249.
- [42] Lisanti, M.P.; Scherer, P.E.; Vidugiriene, J.; Tang, Z.; Hermanowski-Vosatka, A.; Tu, Y.H.; Cook, R.F. und Sargiacomo, M. (1994): Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease, *J Cell Biol* 126 [1], Seite 111-126.
- [43] Kurzchalia, T.V. und Parton, R.G. (1999): Membrane microdomains and caveolae, *Curr Opin Cell Biol* 11 [4], Seite 424-431.
- [44] Gwynne, J.T. und Hess, B. (1980): The role of high density lipoproteins in rat adrenal cholesterol metabolism and steroidogenesis, *J Biol Chem* 255 [22], Seite 10875-10883.
- [45] Pittman, R.C.; Knecht, T.P.; Rosenbaum, M.S. und Taylor, C.A., Jr (1987): A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesterol esters, *J Biol Chem* 262 [6], Seite 2443-2450.
- [46] Azhar, S.; Tsai, L. und Reaven, E. (1990): Uptake and utilization of lipoprotein cholesterol esters by rat granulosa cells, *Biochim Biophys Acta* 1047 [2], Seite 148-160.

- [47] Reaven, E.; Chen, Y.D.; Spicher, M. und Azhar, S. (1984): Morphological evidence that high density lipoproteins are not internalized by steroid-producing cells during in situ organ perfusion, *J Clin Invest* 74 [4], Seite 1384-1397.
- [48] Rinninger, F. und Pittman, R.C. (1988): Regulation of the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by human fibroblasts and Hep G2 hepatoma cells, *J Lipid Res* 29 [9], Seite 1179-1194.
- [49] Rinninger, F.; Brundert, M.; Jackle, S.; Galle, P.R.; Busch, C.; Izbicki, J.R.; Rogiers, X.; Henne-Bruns, D.; Kremer, B. und Broelsch, C.E. (1994): Selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters by human hepatocytes in primary culture, *Hepatology* 19 [5], Seite 1100-1114.
- [50] Azhar, S.; Tsai, L.; Medicherla, S.; Chandrasekher, Y.; Giudice, L. und Reaven, E. (1998): Human granulosa cells use high density lipoprotein cholesterol for steroidogenesis, *J Clin Endocrinol Metab* 83 [3], Seite 983-991.
- [51] Temel, R.E.; Trigatti, B.; DeMattos, R.B.; Azhar, S.; Krieger, M. und Williams, D.L. (1997): Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is the major route for the delivery of high density lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in cultured mouse adrenocortical cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [25], Seite 13600-13605.
- [52] Rigotti, A.; Trigatti, B.L.; Penman, M.; Rayburn, H.; Herz, J. und Krieger, M. (1997): A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [23], Seite 12610-12615.
- [53] Ji, Y.; Jian, B.; Wang, N.; Sun, Y.; Moya, M.L.; Phillips, M.C.; Rothblat, G.H.; Swaney, J.B. und Tall, A.R. (1997): Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux, *J Biol Chem* 272 [34], Seite 20982-20985.

- [54] Jian, B.; de la Llera-Moya, M.; Ji, Y.; Wang, N.; Phillips, M.C.; Swaney, J.B.; Tall, A.R. und Rothblat, G.H. (1998): Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors, *J Biol Chem* 273 [10], Seite 5599-5606.
- [55] de la Llera-Moya, M.; Rothblat, G.H.; Connelly, M.A.; Kellner-Weibel, G.; Sakr, S.W.; Phillips, M.C. und Williams, D.L. (1999): Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface, *J Lipid Res* 40 [3], Seite 575-580.
- [56] Urban, S.; Zieseniss, S.; Werder, M.; Hauser, H.; Budzinski, R. und Engelmann, B. (2000): Scavenger receptor BI transfers major lipoprotein-associated phospholipids into the cells, *J Biol Chem* 275 [43], Seite 33409-33415.
- [57] Kolley, I.; Schlame, M.; Fechner, H.; Looman, A.C.; Wissel, H. und Rustow, B. (1999): HDL is the major source of vitamin E for type II pneumocytes, *Free Radic Biol Med* 27 [7-8], Seite 882-890.
- [58] Goti, D.; Hrzenjak, A.; Levak-Frank, S.; Frank, S.; van der Westhuyzen, D.R.; Malle, E. und Sattler, W. (2001): Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated vitamin E, *J Neurochem* 76 [2], Seite 498-508.
- [59] Green, S.R. und Pittman, R.C. (1991): Comparative acyl specificities for transfer and selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters, *J Lipid Res* 32 [3], Seite 457-467.
- [60] Rigotti, A.; Miettinen, H.E. und Krieger, M. (2003): The Role of the High-Density Lipoprotein Receptor SR-BI in the Lipid Metabolism of Endocrine and Other Tissues, *Endocr Rev* 24 [3], Seite 357-387.

- [61] Kozarsky, K.F.; Donahee, M.H.; Rigotti, A.; Iqbal, S.N.; Edelman, E.R. und Krieger, M. (1997): Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels, *Nature* 387 [6631], Seite 414-417.
- [62] Ji, Y.; Wang, N.; Ramakrishnan, R.; Sehayek, E.; Huszar, D.; Breslow, J.L. und Tall, A.R. (1999): Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile, *J Biol Chem* 274 [47], Seite 33398-33402.
- [63] Sehayek, E.; Ono, J.G.; Shefer, S.; Nguyen, L.B.; Wang, N.; Batta, A.K.; Salen, G.; Smith, J.D.; Tall, A.R. und Breslow, J.L. (1998): Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [17], Seite 10194-10199.
- [64] Ueda, Y.; Royer, L.; Gong, E.; Zhang, J.; Cooper, P.N.; Francone, O. und Rubin, E.M. (1999): Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice, *J Biol Chem* 274 [11], Seite 7165-7171.
- [65] Wang, N.; Arai, T.; Ji, Y.; Rinninger, F. und Tall, A.R. (1998): Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice, *J Biol Chem* 273 [49], Seite 32920-32926.
- [66] Rigotti, A.; Trigatti, B.; Babitt, J.; Penman, M.; Xu, S. und Krieger, M. (1997): Scavenger receptor BI--a cell surface receptor for high density lipoprotein, *Curr Opin Lipidol* 8 [3], Seite 181-188.
- [67] Varban, M.L.; Rinninger, F.; Wang, N.; Fairchild-Huntress, V.; Dunmore, J.H.; Fang, Q.; Gosselin, M.L.; Dixon, K.L.; Deeds, J.D.; Acton, S.L.; Tall, A.R. und Huszar, D. (1998):

- Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [8], Seite 4619-4624.
- [68] Rigotti, A.; Edelman, E.R.; Seifert, P.; Iqbal, S.N.; DeMattos, R.B.; Temel, R.E.; Krieger, M. und Williams, D.L. (1996): Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland, *J Biol Chem* 271 [52], Seite 33545-33549.
- [69] Landschulz, K.T.; Pathak, R.K.; Rigotti, A.; Krieger, M. und Hobbs, H.H. (1996): Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat, *J Clin Invest* 98 [4], Seite 984-995.
- [70] Wang, N.; Weng, W.; Breslow, J.L. und Tall, A.R. (1996): Scavenger receptor BI (SR-BI) is up-regulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase knock-out mice as a response to depletion of cholesterol stores. In vivo evidence that SR-BI is a functional high density lipoprotein receptor under feedback control, *J Biol Chem* 271 [35], Seite 21001-21004.
- [71] Spady, D.K.; Woollett, L.A.; Meidell, R.S. und Hobbs, H.H. (1998): Kinetic characteristics and regulation of HDL cholesteryl ester and apolipoprotein transport in the apoA-I-/- mouse, *J Lipid Res* 39 [7], Seite 1483-1492.
- [72] Fluiter, K.; van der Westhuijzen, D.R. und Van Berkel, T.J. (1998): In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells, *J Biol Chem* 273 [14], Seite 8434-8438.
- [73] Witt, W.; Kolleyck, I.; Fechner, H.; Sinha, P. und Rustow, B. (2000): Regulation by vitamin E of the scavenger receptor BI in rat liver and HepG2 cells, *J Lipid Res* 41 [12], Seite 2009-2016.

- [74] Trigatti, B.; Rayburn, H.; Vinals, M.; Braun, A.; Miettinen, H.; Penman, M.; Hertz, M.; Schrenzel, M.; Amigo, L.; Rigotti, A. und Krieger, M. (1999): Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [16], Seite 9322-9327.
- [75] Miettinen, H.E.; Rayburn, H. und Krieger, M. (2001): Abnormal lipoprotein metabolism and reversible female infertility in HDL receptor (SR-BI)-deficient mice, *J Clin Invest* 108 [11], Seite 1717-1722.
- [76] Van Eck, M.; Twisk, J.; Hoekstra, M.; Van Rij, B.T.; Van der Lans, C.A.; Bos, I.S.; Kruijt, J.K.; Kuipers, F. und Van Berkel, T.J. (2003): Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver, *J Biol Chem* 278 [26], Seite 23699-23705.
- [77] Braun, A.; Trigatti, B.L.; Post, M.J.; Sato, K.; Simons, M.; Edelberg, J.M.; Rosenberg, R.D.; Schrenzel, M. und Krieger, M. (2002): Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice, *Circ Res* 90 [3], Seite 270-276.
- [78] Trigatti, B.L.; Krieger, M. und Rigotti, A. (2003): Influence of the HDL Receptor SR-BI on Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 [10], Seite 1732-1738.
- [79] Purcell-Huynh, D.A.; Farese, R.V., Jr; Johnson, D.F.; Flynn, L.M.; Pierotti, V.; Newland, D.L.; Linton, M.F.; Sanan, D.A. und Young, S.G. (1995): Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high-fat diet, *J Clin Invest* 95 [5], Seite 2246-2257.

- [80] Arai, T.; Wang, N.; Bezouevski, M.; Welch, C. und Tall, A.R. (1999): Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene, *J Biol Chem* 274 [4], Seite 2366-2371.
- [81] Kozarsky, K.F.; Donahee, M.H.; Glick, J.M.; Krieger, M. und Rader, D.J. (2000): Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 [3], Seite 721-727.
- [82] Ueda, Y.; Gong, E.; Royer, L.; Cooper, P.N.; Francone, O.L. und Rubin, E.M. (2000): Relationship between expression levels and atherogenesis in scavenger receptor class B, type I transgenics, *J Biol Chem* 275 [27], Seite 20368-20373.
- [83] Pratico, D.; Tangirala, R.K.; Rader, D.J.; Rokach, J. und FitzGerald, G.A. (1998): Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice, *Nat Med* 4 [10], Seite 1189-1192.
- [84] Thomas, S.R.; Leichtweis, S.B.; Pettersson, K.; Croft, K.D.; Mori, T.A.; Brown, A.J. und Stocker, R. (2001): Dietary cosupplementation with vitamin E and coenzyme Q(10) inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 [4], Seite 585-593.
- [85] Kusters, A.; Jirsa, M. und Groen, A.K. (2003): Genetic background of cholesterol gallstone disease, *Biochim Biophys Acta* 1637 [1], Seite 1-19.
- [86] Fuchs, M.; Ivandic, B.; Muller, O.; Schalla, C.; Scheibner, J.; Bartsch, P. und Stange, E.F. (2001): Biliary cholesterol hypersecretion in gallstone-susceptible mice is associated with hepatic up-regulation of the high-density lipoprotein receptor SRBI, *Hepatology* 33 [6], Seite 1451-1459.
- [87] Rigotti, A.; Zanolungo, S.; Miquel, J.F. und Wang, D.Q. (2002): HDL receptor SR-BI and cholesterol gallstones, *Hepatology* 35 [1], Seite 240-242.

- [88] Rodriguez, W.V.; Thuahnai, S.T.; Temel, R.E.; Lund-Katz, S.; Phillips, M.C. und Williams, D.L. (1999): Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells, *J Biol Chem* 274 [29], Seite 20344-20350.
- [89] Greene, D.J.; Skeggs, J.W. und Morton, R.E. (2001): Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI), *J Biol Chem* 276 [7], Seite 4804-4811.
- [90] Chapman, M.J.; Goldstein, S.; Lagrange, D. und Laplaud, P.M. (1981): A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum, *J Lipid Res* 22 [2], Seite 339-358.
- [91] Walker, J.M. (1994): The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation, *Methods Mol Biol* 32, Seite 5-8.
- [92] Catignani, G.L. und Bieri, J.G. (1983): Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography, *Clin Chem* 29, Seite 708-712.
- [93] Gobran, L.I. und Rooney, S.A. (1998): PKC isoforms and other signaling proteins involved in surfactant secretion in developing rat type II cells, *Am J Physiol* 274 [6 Pt 1], Seite 901-907.
- [94] Gobran, L.I. und Rooney, S.A. (1999): Surfactant secretagogue activation of protein kinase c isoforms in cultured rat type II cells, *Am J Physiol* 277 [2 Pt 1], Seite 251-256.
- [95] Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [259], Seite 680-685.
- [96] Schrimpf, G. und Gassen, R. (1999): *Gentechnische Methoden*.
- [97] Burnette, W.N. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic

- detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal Biochem* 112 [2], Seite 195-203.
- [98] Salinovich, O. und Montelaro, R.C. (1986): Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal Biochem* 156 [2], Seite 341-347.
- [99] Sinha, P.; Kollack, I.; Volk, H.D.; Schlame, M. und Rustow, B. (2002): Vitamin E deficiency sensitizes alveolar type II cells for apoptosis, *Biochim Biophys Acta* 1583 [1], Seite 91-98.
- [100] Tolle, A.; Kollack, I.; Schlame, M.; Wauer, R.; Stevens, P.A. und Rustow, B. (1997): Effect of hyperoxia on the composition of the alveolar surfactant and the turnover of surfactant phospholipids, cholesterol, plasmalogens and vitamin E, *Biochim Biophys Acta* 1346 [2], Seite 198-204.
- [101] Mardones, P.; Quinones, V.; Amigo, L.; Moreno, M.; Miquel, J.F.; Schwarz, M.; Miettinen, H.E.; Trigatti, B.; Krieger, M.; VanPatten, S.; Cohen, D.E. und Rigotti, A. (2001): Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice, *J Lipid Res* 42 [2], Seite 170-180.
- [102] Mardones, P.; Strobel, P.; Miranda, S.; Leighton, F.; Quinones, V.; Amigo, L.; Rozowski, J.; Krieger, M. und Rigotti, A. (2002): Alpha-tocopherol metabolism is abnormal in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice, *J Nutr* 132 [3], Seite 443-449.
- [103] Johnson, W.J.; Bamberger, M.J.; Latta, R.A.; Rapp, P.E.; Phillips, M.C. und Rothblat, G.H. (1986): The bidirectional flux of cholesterol between cells and lipoproteins. Effects of phospholipid depletion of high density lipoprotein, *J Biol Chem* 261 [13], Seite 5766-5776.

- [104] Rothblat, G.H.; de la Llera-Moya, M.; Atger, V.; Kellner-Weibel, G.; Williams, D.L. und Phillips, M.C. (1999): Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights, *J Lipid Res* 40 [5], Seite 781-796.
- [105] Gu, X.; Kozarsky, K. und Krieger, M. (2000): Scavenger receptor class B, type I-mediated [3H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor, *J Biol Chem* 275 [39], Seite 29993-30001.
- [106] Yancey, P.G.; Bortnick, A.E.; Kellner-Weibel, G.; de la Llera-Moya, M.; Phillips, M.C. und Rothblat, G.H. (2003): Importance of Different Pathways of Cellular Cholesterol Efflux, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* EDAT- // : MHDA- // : PHST- /Jan/ [aheadofprint] AID - /.ATV...DD [doi] AID - .ATV...DD [pii] PST - ppublish 23 [5], Seite 712-719.
- [107] Kellner-Weibel, G.; de la Llera-Moya, M.; Connelly, M.A.; Stoudt, G.; Christian, A.E.; Haynes, M.P.; Williams, D.L. und Rothblat, G.H. (2000): Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution, *Biochemistry* 39 [1], Seite 221-229.
- [108] Langer, C.; Gansz, B.; Goepfert, C.; Engel, T.; Uehara, Y.; von Dehn, G.; Jansen, H.; Assmann, G. und von Eckardstein, A. (2002): Testosterone up-regulates scavenger receptor BI and stimulates cholesterol efflux from macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 296 [5], Seite 1051-1057.
- [109] Fielding, C.J. und Fielding, P.E. (2001): Cellular cholesterol efflux, *Biochim Biophys Acta* 1533 [3], Seite 175-189.
- [110] Bortnick, A.E.; Rothblat, G.H.; Stoudt, G.; Hoppe, K.L.; Royer, L.J.; McNeish, J. und Francone, O.L. (2000): The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines, *J Biol Chem* 275 [37], Seite 28634-28640.
- [111] Liscovitch, M. und Lavie, Y. (2000): Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways?, *Trends Biochem Sci* 25 [11], Seite 530-534.

- [112] Gillotte, K.L.; Zaiou, M.; Lund-Katz, S.; Anantharamaiah, G.M.; Holvoet, P.; Dhoest, A.; Palgunachari, M.N.; Segrest, J.P.; Weisgraber, K.H.; Rothblat, G.H. und Phillips, M.C. (1999): Apolipoprotein-mediated plasma membrane microsolubilization. Role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid, *J Biol Chem* 274 [4], Seite 2021-2028.
- [113] Gillotte, K.L.; Davidson, W.S.; Lund-Katz, S.; Rothblat, G.H. und Phillips, M.C. (1998): Removal of cellular cholesterol by pre-beta-HDL involves plasma membrane microsolubilization, *J Lipid Res* 39 [10], Seite 1918-1928.
- [114] Wang, L.; Connelly, M.A.; Ostermeyer, A.G.; Chen, H.H.; Williams, D.L. und Brown, D.A. (2003): Caveolin-1 does not affect SR-BI-mediated cholesterol efflux or selective uptake of cholesteryl ester in two cell lines, *J Lipid Res* 44 [4], Seite 807-815.
- [115] Sun, Y.; Wang, N. und Tall, A.R. (1999): Regulation of adrenal scavenger receptor-BI expression by ACTH and cellular cholesterol pools, *J Lipid Res* 40 [10], Seite 1799-1805.
- [116] Azhar, S.; Nomoto, A.; Leers-Sucheta, S. und Reaven, E. (1998): Simultaneous induction of an HDL receptor protein (SR-BI) and the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in a physiologically relevant steroidogenic cell model, *J Lipid Res* 39 [8], Seite 1616-1628.
- [117] Rothblat, G.H.; de la Llera-Moya, M.; Favari, E.; Yancey, P.G. und Kellner-Weibel, G. (2002): Cellular cholesterol flux studies: methodological considerations, *Atherosclerosis* 163 [1], Seite 1-8.
- [118] Knowles, B.B.; Howe, C.C. und Aden, D.P. (1980): Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen, *Science* 209 [4455], Seite 497-499.
- [119] Rash, J.M.; Rothblat, G.H. und Sparks, C.E. (1981): Lipoprotein apolipoprotein synthesis by human hepatoma cells in culture, *Biochim Biophys Acta* 666 [2], Seite 294-298.

Danksagung

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Lipidlabors und der Klinik für Neonatologie, Campus Charité Mitte, für die herzliche Aufnahme, für ihre Geduld und die hervorragende Zusammenarbeit. Ich danke insbesondere Dr. Florian Guthmann, Ruth Herrmann, Dr. Ingrid Kolley, Julia Henriette Preiß, Friedemann Schmidt, Dr. Angelika Tölle, und Sven Christian Thomas Weber.

Herzlichen Dank an Prof. Dr. B. Rüstow für die intensive Betreuung und Förderung meiner Arbeit.

Desweiteren danke ich meinen Eltern Christiane und Djavad Barikbin, denen diese Arbeit gewidmet ist, meinen Geschwistern Roja und Matin Barikbin, Max Thiemann, Mathias Griethe sowie Frau Dipl. Ing. Frauke Steuer – Ihr wißt wofür.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Payman Barikbin
Anschrift: Kastanienallee 17
10435 Berlin
Tel. 030/44041528
0174/2516261
Geburtstag und -ort: 01.05.1976 in Elmshorn

Schulbildung

1982-1986 Besuch der Grundschule
1986-1995 Besuch des Gymnasiums
Jun 95 Abitur

Zivildienst

1995-1996 Ausbildung zum Rettungssanitäter beim
Rettungsdienst des Kreises Pinneberg

Studium

Okt 95 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der
Humboldt Universität zu Berlin
Aug 98 Ärztliche Vorprüfung
Aug 99 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mrz 03 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Apr 04 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

Oktober 2000 bis Mai 2004 Durchführung der Experimente und
Fertigstellung der Dissertation

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind zur Publikation in einer Fachzeitschrift eingereicht.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und nur unter der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, 21.05.2004

Payman Barikbin