

Aus dem Institut für klinische Chemie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel

Zellulärer Lipidimport durch
Klasse B Scavenger Rezeptoren und die
Biogenese von Membrandomänen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Markus K.H. Wiedmann

aus

Tübingen

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. B. Engelmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Keller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Lorenz
Priv. Doz. Dr. R. Gräf

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2006

Gewidmet
Christiane Wiedmann

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Struktur und Bedeutung von Phospholipiden und Cholesterol in Zellmembranen.....	1
1.1.1 Lipidstruktur.....	1
1.1.2 Membranaufbau und vertikale Asymmetrie.....	2
1.1.3 Laterale Membranasymmetrie durch Rafts und Caveolae.....	4
1.2 SR-BI und CD36.....	7
1.3 Selektive Phospholipidinternalisierung über Proteine.....	10
1.4 Membrandomänen und Endozytose.....	11
1.4.1 Intrazelluläre Verzahnung verschiedener Endozytosewege.....	11
1.4.2 Endozytose und SR-BI.....	14
1.5 Zielsetzung.....	16
2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	17
2.1 Materialien.....	17
2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel.....	17
2.1.2 Materialien und Geräte.....	19
2.1.3 Antikörper, Proteasen und Inhibitoren.....	21
2.1.4 Radioaktive Substanzen.....	22
2.1.5 Zellkultur, Zellen und Substanzen.....	22
2.1.6 Substanzen mit Fluorophoren.....	23
2.1.7 Puffer.....	24
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Isolierung der Monozyten.....	27
2.2.2 Kultivierung der HeLa Zellen.....	28
2.2.3 Kultivierung der CHO Zellen.....	28
2.2.4 Herstellung der Phospholipidvesikel.....	29
2.2.5 Fluoreszenzmessungen.....	29
2.2.6 Radioaktivität.....	30
2.2.7 Isolierung der Detergens-resistenten Membranen (DRM).....	31
2.2.8 Elektronenmikroskopie.....	32
2.2.9 Proteinchemische Methoden.....	33
2.2.10 Konfokale Mikroskopie.....	34
2.2.11 Isolierung und Präparation der Lipoproteine.....	36
3 ERGEBNISSE.....	37
3.1 Proteine der CD36 Familie als selektive Phospholipid-Transporter.....	37
3.1.1 CD36 vermittelt selektiv die Aufnahme von SM und PC.....	37
3.1.2 CD36 und SR-BI vermitteln den gesamten Phospholipidimport in Monozyten.....	41

3.2	SR-BI vermittelt die Bildung neuer Cholesterol-reicher Domänen	42
3.2.1	Die DRM-Bausteine SM und Chol werden hauptsächlich über DSM in die Zellen inkorporiert	42
3.2.2	Unterschiedliche Verteilung von neu inkorporiertem SM und PE in Membrandomänen	49
3.2.3	Internalisierung von SM	50
3.2.4	SM und Chol werden ATP-abhängig internalisiert.....	51
3.2.5	SR-BI als Mediator der Endozytose von SM und Chol	53
3.2.6	Die Endozytose von SR-BI / Lipid-Komplexen ist Clathrin-vermittelt.....	57
4	DISKUSSION	62
4.1	Die selektive Aufnahme von SM und PC wird exklusiv über CD36 und SR-BI vermittelt	62
4.2	DRM-Isolierung durch Detergenzien	63
4.3	Zellmembranbindung und Inkorporierung der Phospholipide in DRM und DSM	64
4.4	SM und Chol werden Clathrin-abhängig endozytiert und bilden dabei mit SR-BI Detergens-resistente Domänen	65
4.5	Die Schwierigkeit der Darstellung endozytotischer Prozesse aufgrund ihrer Dynamik und Komplexität.....	68
4.6	SR-BI führt zur Endozytose neuer DRM.....	68
4.7	Modell für die SR-BI-abhängige DRM-Entstehung und den membranösen Lipidverkehr	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	DANKSAGUNGEN.....	85
8	LEBENS LAUF.....	86
9	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	87

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster of differentiation
CHO	Chinese hamster ovary
Chol	Cholesterol
CTxB	Choleratoxin subunit B
DRM	Detergens-resistente Membranen
DSM	Detergens-soluble Membranen
ERC	Endocytic recycling compartment
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
HDL	High density lipoprotein
HeLa	Cervixkarzinomzellen von Henrietta Lachs
LDL	Low density lipoprotein
min	Minuten
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PM	Plasmamembran
PS	Phosphatidylserin
SA	Standardabweichung
SE	Sorting endosomes
SM	Sphingomyelin
SR-BI	Scavenger receptor Klasse B Typ I
VLDL	Very low density lipoprotein
wt	Wild-Typ

1 Einleitung

1.1 Struktur und Bedeutung von Phospholipiden und Cholesterol in Zellmembranen

1.1.1 Lipidstruktur

Phospholipide spielen eine Schlüsselrolle in der Genese biologischer Membranen. Erst die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften bestimmter Lipide, insbesondere der Phospholipide und Sterole, machten die Entstehung von Membranen und damit die Entwicklung von Zellen und Leben vor Hunderten von Millionen Jahren möglich. Phospholipide lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen: Die erste Gruppe leitet sich von dem Alkohol Glyzerol ab, und die Lipide werden deshalb Phosphoglyzeride genannt (Abb. 1.1). Diese bestehen aus einem Glyzerol-Grundgerüst, zwei hydrophoben Fettsäureketten und einem phosphorylierten Alkohol mit hydrophilen Eigenschaften als Kopfgruppe. So entstehen, je nach Kopfgruppe, unter anderem Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE) oder Phosphatidylinositol (PI). Die zweite Gruppe besteht aus nur einem Phospholipid, dem Sphingomyelin (SM), von dem sich die große Gruppe der Sphingolipide ableitet (Abb. 1.1). Sein Grundgerüst wird von dem komplexeren Amino-Alkohol Sphingosin gebildet, an den eine lange gesättigte Fettsäurekette gebunden ist. Die polare Kopfgruppe des Sphingomyelins entsteht durch Veresterung der primären Hydroxylgruppe des Sphingosins mit Phosphorylcholin.

Ein weiterer entscheidender Baustein für den Aufbau tierischer Zellmembranen ist das Lipid Cholesterol (Chol), das aus einem planaren Steroid-Ringsystem mit einem flexiblen hydrophoben Schwanz und einer 3- β -hydroxyl-Gruppe besteht (Yeagle, 1985) (Abb. 1.1). Die Plasmamembran eukaryoter Zellen ist sehr reich an Cholesterol, wohingegen sich dieses neutrale Lipid typischerweise weniger in Zellorganellen befindet (Schroeder et al., 1996).

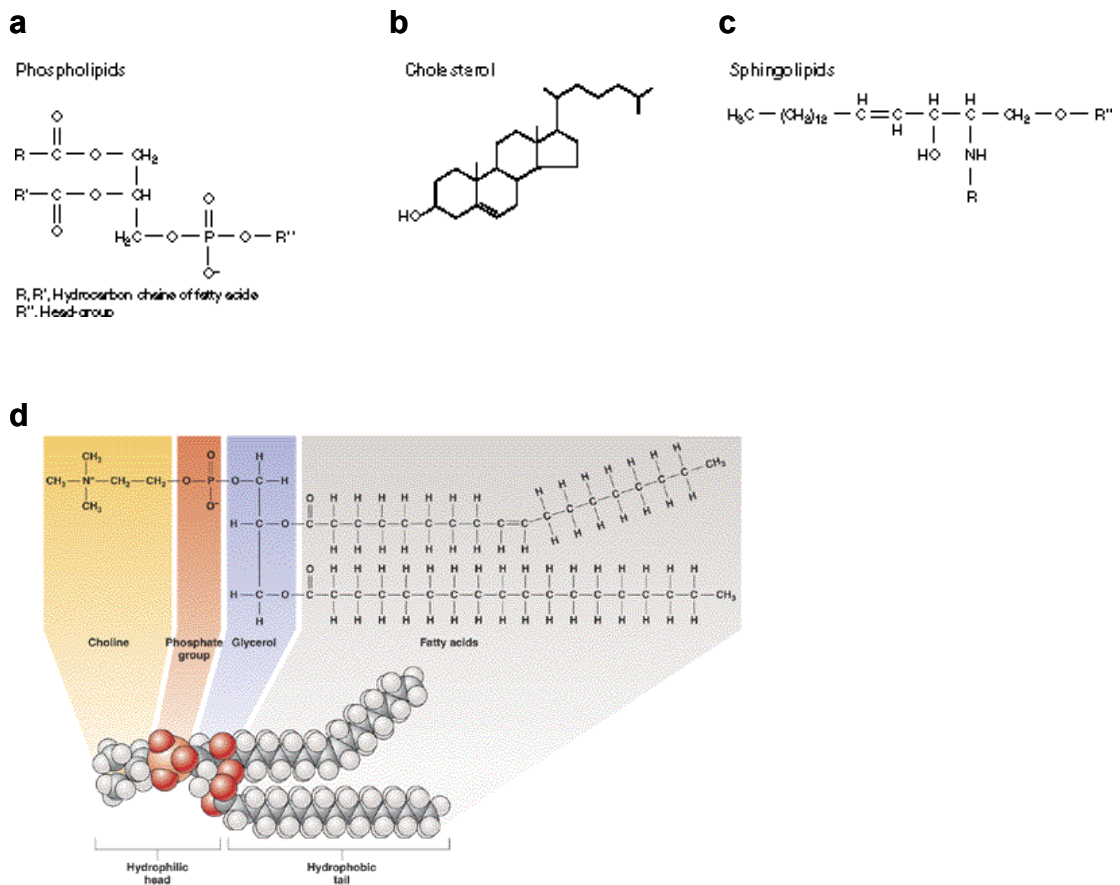


Abb. 1.1: Struktur der Phospholipide, Sphingolipide und Cholesterol
Phospholipide bestehen aus einem Glycerol-Grundgerüst, zwei hydrophoben Fettsäureketten und einer hydrophilen Kopfgruppe (a, d). Das planare Steroid-Ringsystem des Cholesterol hat eine flexible Fettsäurekette und eine hydrophile Hydroxyl-Gruppe auf der gegenüberliegenden Seite (b). Sphingomyelin besteht aus dem komplexen Sphingosin-Grundgerüst verestert mit einer langkettigen Fettsäure und Phosphorylcholin als Kopfgruppe (c). Modifiziert nach Stryer, Biochemistry, 1995 und Koning, 2005.

1.1.2 Membranaufbau und vertikale Asymmetrie

Vor ungefähr 30 Jahren wurde durch das Fluid Mosaic Modell von Singer und Nicolson die Grundlage zum Verständnis des Aufbaus biologischer Membranen gelegt (Singer und Nicolson, 1972). Danach bestehen Membranen aus einer Phospholipid-doppelschicht, wobei die polaren hydrophilen Lipidköpfe jeweils zur wässrigen Phase ausgerichtet sind und die langen hydrophoben Kohlenwasserstoffketten in das Membraninnere ragen. Die Phospholipide sind dabei nicht gleichmäßig in der Plasmamembran verteilt. SM und PC befinden sich hauptsächlich im äußeren Blatt, wohingegen PE und PS fast ausschließlich im inneren Blatt lokalisiert sind. Dadurch

entsteht eine Lipidasymmetrie in der Plasmamembran, die unter Energieaufwand aufrechterhalten wird (Abb. 1.2).

Während Chol schnell zwischen den beiden Membranblättern hin und her wechseln kann, ist die spontane Diffusion der meisten Phospholipide zwischen den Plasmamembranhälften ein sehr langsamer Prozess ($T_{1/2}$ = Stunden bis Tage) (Zachowski, 1993). Deshalb findet ein spontanes, Protein-unabhängiges Zusammenbrechen der Lipidasymmetrie nicht statt, sondern die entscheidende Rolle im Phospholipidaustausch spielen bestimmte Membranproteine.

In den letzten Jahren konnten einige dieser Proteine identifiziert werden, die die Transbilayer-Bewegung der Phospholipide vermitteln (Abb. 1.2). So transportiert die Aminophospholipid-Translokase / „Flippase“ (Seigneuret und Devaux, 1984), die Aminophospholipide PE und PS, nicht jedoch SM und PC, vom äußeren zum inneren Blatt der Plasmamembran (Bever et al., 1999; Devaux, 1991). Dabei wird für jedes transportierte Aminophospholipid ein ATP-Molekül hydrolysiert (Belezny et al., 1993). Den Transport innerhalb des Lipidbilayers von innen nach außen ermöglicht ein ebenfalls ATP-verbrauchendes Protein, genannt „Floppase“. Diese transportiert jedoch neben den Aminophospholipiden auch die Cholinphospholipide PC und SM (Connor et al., 1992). Ein drittes Transmembran-Protein, welches die Lipidverteilung in der Plasmamembran beeinflusst, ist die sogenannte Phospholipid-Scramblase. Dieses Protein wird durch einen intrazellulären Calcium-Anstieg aktiviert und vermittelt einen Lipidaustausch von PE mit PS und SM mit PC zwischen den Zellmembranhälften in beide Richtungen (Smeets et al., 1994; Williamson et al., 1995). Dieser Prozess ist ATP unabhängig und führt zum Verlust der Membranasymmetrie, da die Lipide entlang ihres Konzentrationsgefälles transportiert werden. Dies führt unter anderem zur Exposition von PS und PE an der Zelloberfläche aktivierter oder verletzter Blutzellen und stimuliert damit die Blutgerinnung (Bever et al., 1999). Weiterhin wird durch die Exposition der Aminophospholipide die Phagozytose vermittelt (Fadok et al., 2000).

Eine besondere Rolle im intramembranären Lipidverkehr spielt das integrale Membranprotein ABCA1, welches Cholesterol und Phospholipide transportiert (Abb. 1.2). Es gehört zu der großen Familie der ATP-binding cassette (ABC) Proteine, die ATP abhängig Substrate zwischen verschiedenen Zellkompartimenten transportieren (Klein

et al., 1999; Dean et al., 2001). ABCA1 vermittelt dabei den ersten Schritt des Rücktransportes von Cholesterol und Phospholipiden aus Zellen in die Leber, indem es die Lipide in HDL-Partikel transferiert (Rothblat et al., 1999; Oram, 2000). Mutationen im ABCA1 Protein führen beim Menschen zur sogenannten Tangier-Krankheit, einem schweren HDL-Mangelsyndrom (Brooks-Wilson et al., 1999; Bodzioch et al., 1999). Die Mutationen im ABCA1 führen zu einem gestörten Cholesterol- und Phospholipid-Transport (Francis et al., 1995; Remaley et al., 1997) mit massiver Hypercholesterinämie und Lipidablagerung in zahlreichen Organen.

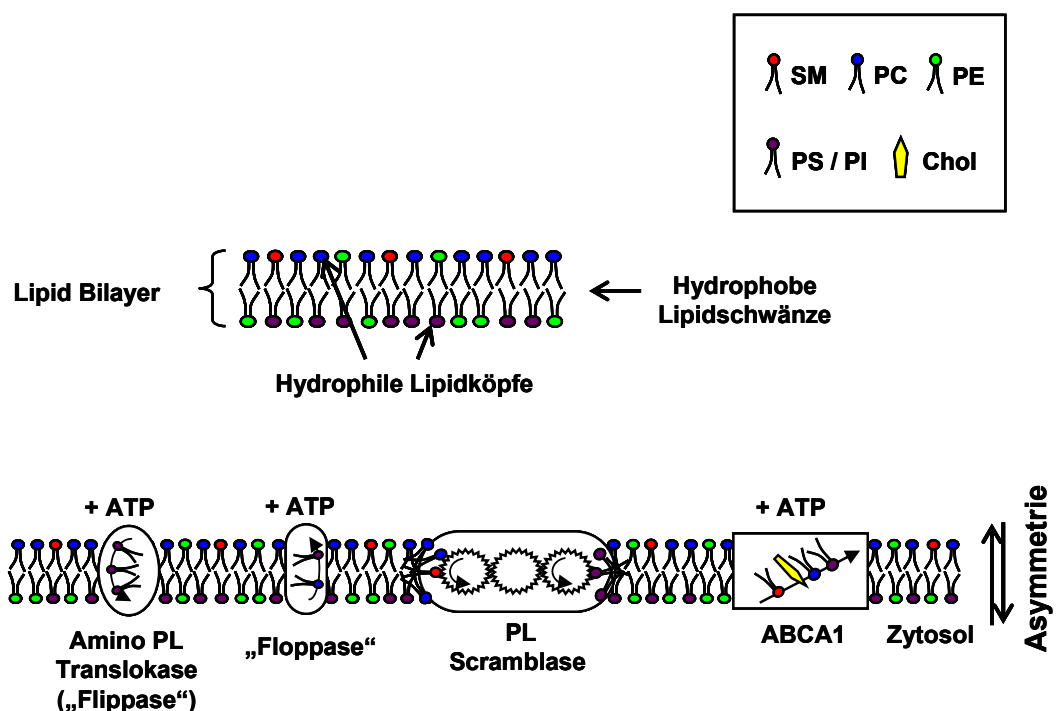


Abb. 1.2: Modell der Phospholipidasymmetrie und ihrer Aufrechterhaltung
 Oben: Während die Phospholipide PC und SM vor allem im äußeren Blatt der PM lokalisiert sind, stellen PS, PE und PI den Großteil der Innenseite des Lipid Bilayers.
 Unten: Verschiedene Membranproteine vermitteln den Transfer von Phospholipiden zwischen den beiden Membranhälften.

1.1.3 Laterale Membranasymmetrie durch Rafts und Caveolae

In den letzten Jahren zeigte sich, dass in Plasmamembranen neben der erwähnten Asymmetrie zwischen den Membranhälften auch laterale Lipiddomänen existieren. Es handelt sich dabei nicht um starre, streng voneinander abgegrenzte Strukturen, sondern vielmehr um Flüssigkeiten mit verschiedenen Ordnungsgraden. In vitro Modelle konnten zeigen, dass diese Membrandomänen durch mehr oder weniger stark

ausgeprägte Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichen Membranlipiden entstehen. Entscheidend sind dabei offensichtlich die Länge und der Grad der Sättigung der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten, sowie die Größe der polaren Kopfgruppe (Mukherjee und Maxfield, 2000). So kommt es zwischen langen gesättigten Kohlenwasserstoffketten, die normalerweise in einer „all-trans“ Stellung ausgestreckt sind zu Wechselwirkungen, die in Membranmodellen zu festen Lipidgelen führen. Die zusätzliche Anwesenheit von Cholesterol bedingt dann wiederum die Lockerung dieser starren Strukturen, wodurch sie wieder den Charakter von Flüssigkeiten annehmen (Edidin, 1997) (Abb. 1.3). Aus diesem Grund spricht man von „Flüssigkeiten mit geordneter Struktur“ (Liquid-ordered Domains) (Ahmed et al., 1997; Schroeder et al., 1998). Diese mit Cholesterol angereicherten Liquid-ordered Domains weisen eine hohe Ordnung der Kohlenwasserstoffketten auf. Auch in biologischen Membranen häufen sich mehr und mehr Hinweise auf die Existenz solcher Liquid-ordered Domains. Allerdings gibt es bislang nur eine Vielzahl indirekter Nachweismethoden für diese Domänen. Da diese Membrandomänen vermutlich sehr klein (10-500 nm) und außerdem sehr dynamisch zu sein scheinen, gibt es bisher noch keine direkten Nachweismethoden (Brown, 2001).

In biologischen Membranen ermöglichen vor allem die Sphingolipide mit ihren langen gesättigten Acylketten eine stabilere Lipidorganisation. In Verbindung mit Cholesterol entstehen hier Liquid-ordered Domains, die hypothetisch als Rafts bezeichnet werden (Brown und London, 1998; Ahmed et al., 1997; Schroeder et al., 1998) (Abb. 1.3). Diese Sphingolipid- und Cholesterol-reichen Rafts sind somit Teil der Plasmamembran. Sie sind umgeben von Glycerophospholipiden mit ungesättigten und damit „geknickten“ Fettsäuren, die eine lockerere Packung und damit einen ungeordneteren Zustand der Membran bedingen.

Weiterhin können von fast allen eukaryotischen Zellen bestimmte Detergens-unlösliche Membranbestandteile isoliert werden (Brown und Rose, 1992). Am Häufigsten wird dazu das nicht-ionische Detergens Triton X-100 bei 4°C verwendet. Man geht davon aus, dass diese Detergens-resistenten Membranen (DRM) die molekulare Zusammensetzung der Rafts widerspiegeln. Die Lipid-Lipid-Interaktionen der DRM scheinen stabiler zu sein, als die Interaktionen zwischen dem Detergens und den DRM-Lipiden. Es besteht damit eine enge Verbindung zwischen Rafts und den DRM und die

Isolation der DRM ist heute eine der Methoden zur Untersuchung von Rafts (Brown und London, 2000; Pike, 2003; Brown und Rose, 1992). Weiterhin kommt es in Rafts typischerweise zur Lokalisierung von Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-verankerten Proteinen und zur Ansammlung von Tyrosinkinase, weshalb diese Proteine auch als Raft-Marker verwendet werden (Brown und Rose, 1992; Foster et al., 2003; Niv et al., 2002).

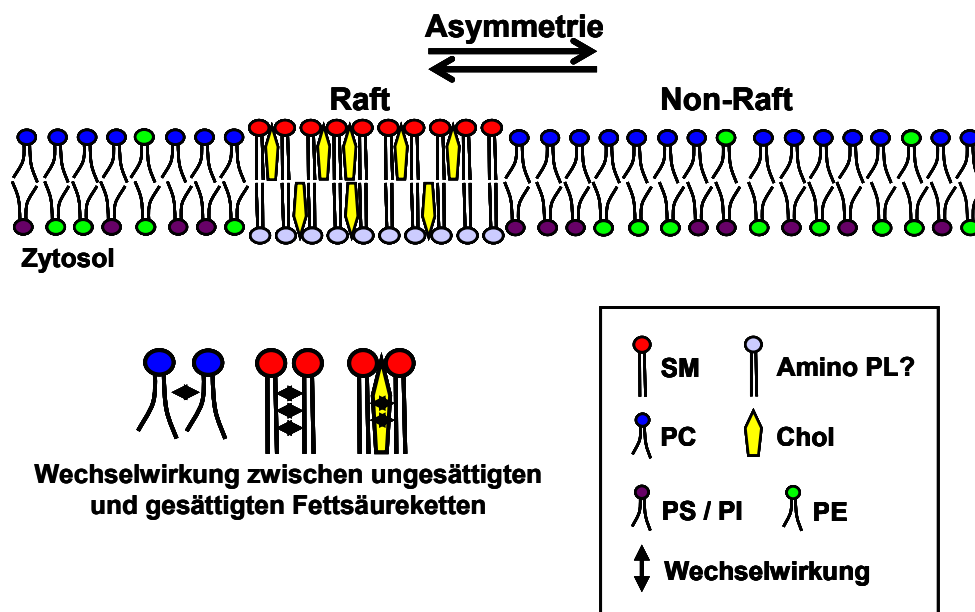


Abb. 1.3: Hypothese der lateralen Asymmetrie durch verschiedene Membrandomänen (Rafts / Non-Rafts)
Durch die unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen den PL kommt es zur Ausbildung verschiedener Membrandomänen. Es handelt sich dabei ausschließlich um flüssige Strukturen, die sich lediglich im Grad ihrer Ordnung bzw. ihrer Viskosität unterscheiden und so zur Aufteilung der Membran in verschiedene Bereiche führen.

Caveolae sind ebenfalls bestimmte Membrandomänen, die bereits vor 50 Jahren im Gallenblasenepithel und in Endothelzellen entdeckt wurden (Yamada, 1955). Durch ihre typische Gestalt in Form von runden, von der Plasmamembran ausgehenden Einstülpungen (50-150 nm) können sie im Gegensatz zu den Rafts im Elektronenmikroskop detektiert werden (Abb. 1.4). Diese Flaschenhals-ähnlichen Strukturen werden durch das Protein Caveolin-1 ermöglicht (Rothberg et al., 1992). Ansonsten haben Caveolae vermutlich die gleiche Lipidstruktur wie die Rafts. Sie stellen damit eine Untergruppe der Rafts dar, charakterisiert durch Caveolin-1 (Abb. 1.4). Sie können deshalb ebenfalls durch das Detergens Triton X-100 isoliert

werden. Caveolae spielen unter anderem eine Rolle bei endozytotischen Prozessen und bei der Signaltransduktion (Anderson, 1998).

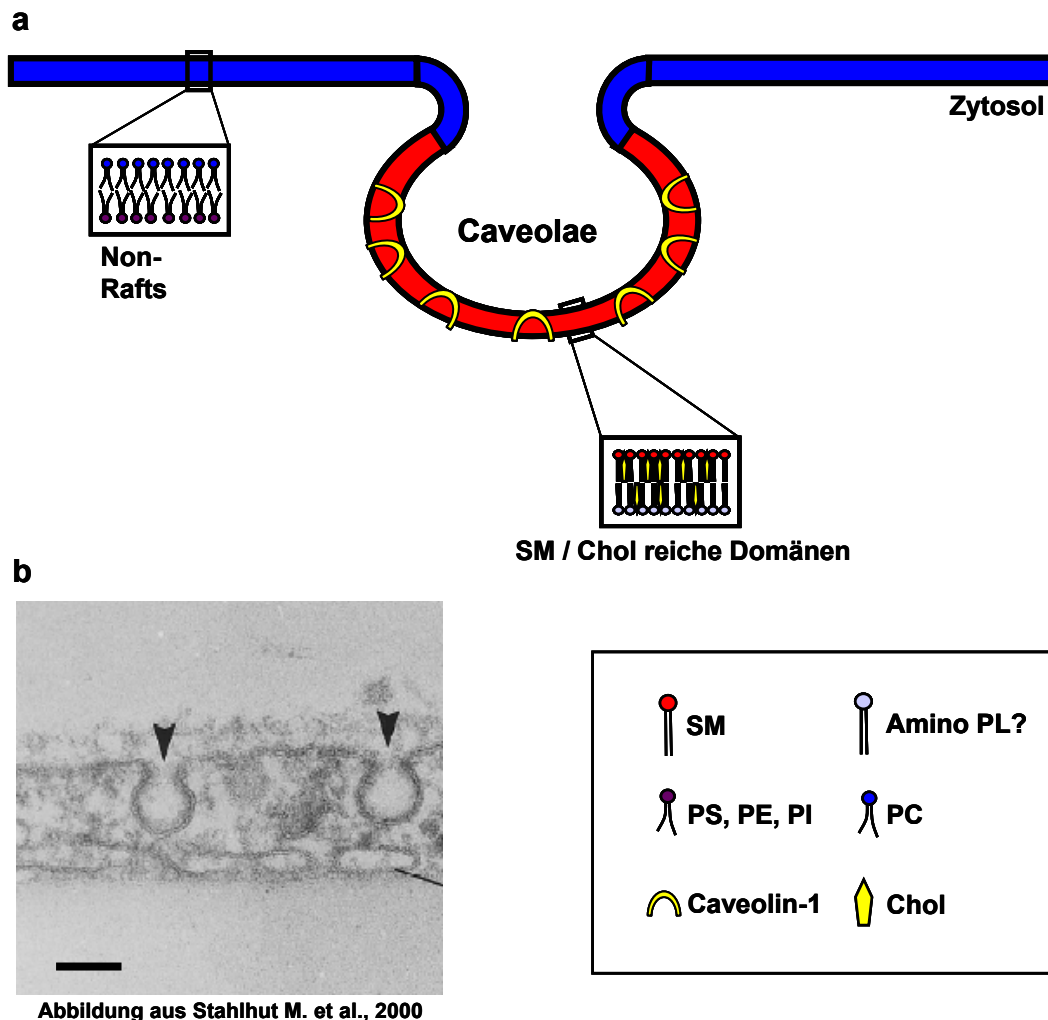


Abb. 1.4: Caveolae sind 50-150 nm große Einstülpungen in der Plasmamembran, vermittelt durch das Protein Caveolin-1. Ihr Lipidaufbau entspricht demjenigen der Rafts und sie stellen damit eine Untergruppe jener dar (a). Im Elektronenmikroskop lassen sich Caveolae morphologisch detektieren (b).

1.2 SR-BI und CD36

Die Proteine SR-BI und CD36 gehören beide zur Gruppe der Scavenger Rezeptoren der Klasse B. Ursprünglich bezeichnete man als Scavenger Rezeptoren Zellmembranproteine, die die Bindung von chemisch veränderten Lipoproteinen, wie zum Beispiel von acetyliertem LDL oder oxidiertem LDL vermitteln (Goldstein et al., 1979; Brown und Goldstein, 1983). SR-BI wurde 1994 von Monty Krieger und seiner Arbeitsgruppe

als LDL bindendes Protein identifiziert und zwei Jahre später als erstes HDL bindendes Protein mit physiologischer Funktion beschrieben (Acton et al., 1996).

CD36 wurde zunächst als Glycoprotein (Glycoprotein IV) in der Plasmamembran von Thrombozyten beschrieben und später in seiner Funktion als Thrombospondin-1 Rezeptor identifiziert (Endemann et al., 1993; Crombie und Silverstein, 1998). Später entdeckte man die Fähigkeit des CD36 Lipoproteine zu binden und zählt es seitdem zu den Scavenger Rezeptoren. Inzwischen ist eine Vielzahl verschiedener CD36 Liganden bekannt. Diese sind interessanterweise von einer großen Vielfalt, wie zum Beispiel langkettige Fettsäuren, modifiziertes LDL, anionische Phospholipide, Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten bei Malaria, apoptotische Zellen und Kollagen I und IV (Oquendo et al., 1989; Matthew et al., 1998; Azeddine et al., 1999; Sfeir et al., 1997; Tandon et al., 1989; Rigotti et al., 1995).

Neben seiner Funktion als Scavenger Rezeptor spielt CD36 auch eine wichtige Rolle als Fettsäuretransporter und bei der Regulation der Angiogenese (Coort et al., 2002; Simantov und Silverstein, 2003). Weiterhin ist CD36 in den Plasmamembranen bevorzugt in DRM lokalisiert (Lisanti et al., 1994; Zeng et al., 2003; Dorahy et al., 1996).

Die Nukleotidsequenz der humanen cDNA von CD36 kodiert für ein Protein mit 471 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 53 kDa (Oquendo et al., 1989). Durch die starke Glykosylierung des Proteins resultiert jedoch meist ein tatsächliches Molekulargewicht von 84-88 kDa. CD36 besitzt zwei Transmembrandomänen und eine große extrazelluläre Schleife (Gruarin et al., 2000).

Das Protein CD36 wird im menschlichen Organismus in verschiedenen Organen und Geweben exprimiert. Beispiele hierfür sind das mikrovaskuläre Endothel, Adipozyten, Skelettmuskulatur, glatte Muskulatur, hämatopoetische und dendritische Zellen (Keizer et al., 2004; Salah-Uddin et al., 2002; Sampson et al., 2003).

Das auf Chromosom 12 lokalisierte SR-BI Gen kodiert für ein Protein von 509 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 57 kDa (Acton et al., 1994; Johnson et al., 1998; Calvo und Vega, 1993) (Abb. 1.5). Aufgrund der starken Glykosylierung der extrazellulären Domäne findet man SR-BI in Western Blots jedoch meist bei 82-85 kDa (Babitt et al., 1997; Calvo et al., 1997; Acton et al., 1996). Die cDNAs von SR-BI und

CD36 sind zu circa 30% identisch (Freeman, 1997; Krieger, 1999). SR-BI hat eine große extrazelluläre Schleife, deren Kristallstruktur jedoch noch nicht aufgeklärt ist und verfügt ebenso wie CD36 über zwei Transmembrandomänen und zwei kurze c-terminale zytoplasmatische Anteile (Acton et al., 1994; Calvo und Vega, 1993; Babitt et al., 1997). In der extrazellulären Schleife befinden sich sechs Cysteine, von denen fünf auch in CD36 konserviert sind (Calvo und Vega, 1993), womit beide Proteine die Fähigkeit zur Bildung von Disulfid-Brücken besitzen.

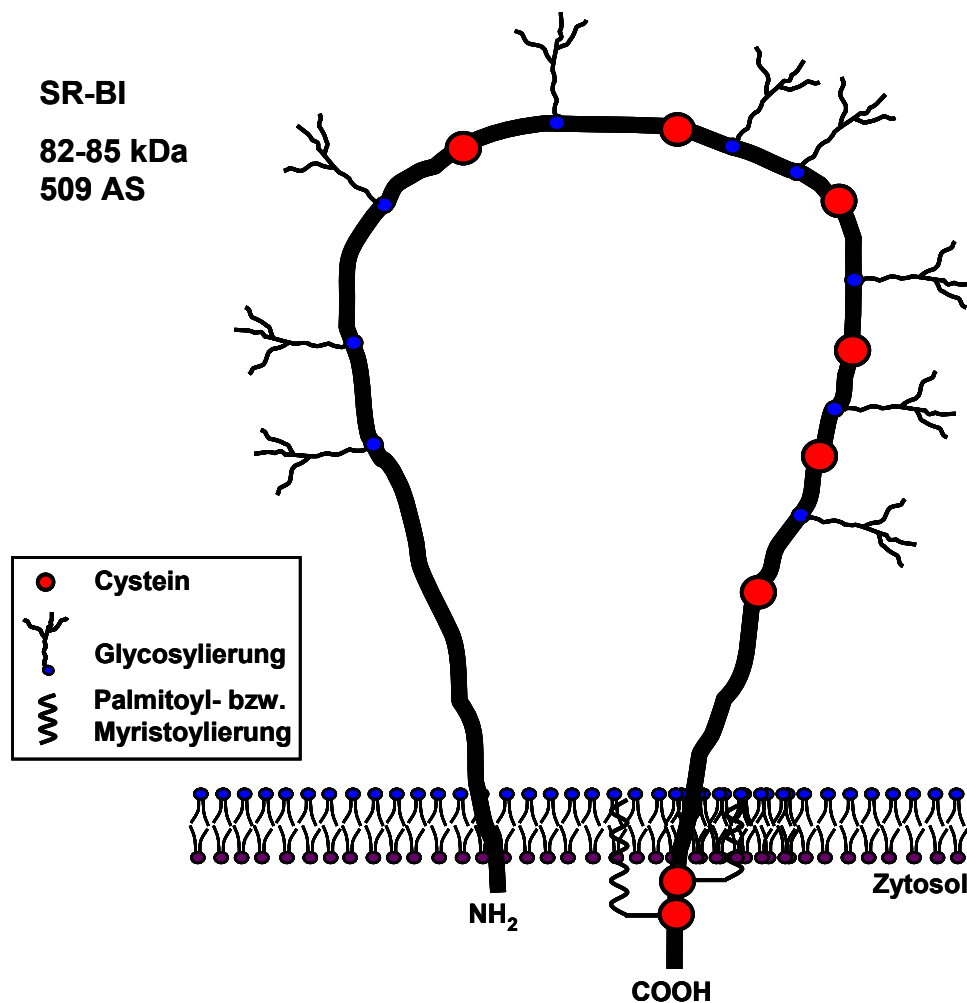


Abb. 1.5: SR-BI ist ein Transmembranprotein mit einer großen extrazellulären Schleife und zwei kurzen zytoplasmatischen Schwänzen. Durch die ausgeprägte extrazelluläre Glycosylierung besitzt SR-BI ein Molekulargewicht von 82-85 kDa. Die beiden Fettsäureketten spielen eventuell eine Rolle bei der Assoziation mit Lipiddomänen.

Während über die Lokalisierung von CD36 in DRM weitgehend Übereinstimmung herrscht, findet man zu SR-BI unterschiedliche Aussagen (Thorne et al., 2000; Babitt et

al., 1997). Inzwischen kennt man verschiedene Eigenschaften, die zur Assemblierung von Proteinen in DRM führen können. Ein Charakteristikum dieser Proteine ist zum Beispiel ihre Acylierung. Da CD36 an den zytoplasmatisch lokalisierten Cysteinen 3 und 7 palmitoyliert ist (Tao et al., 1996; Gruarin et al., 2000), könnte dies sein Targeting zu den DRM bedingen. Obwohl gezeigt werden konnte, dass SR-BI sowohl mit einer Palmitinsäure als auch einer Myristoyle Säure verknüpft ist (Gu et al., 1998), beschreiben verschiedene Gruppen eine Verteilung des SR-BI sowohl in DRM, als auch in Detergens-lösliche Membranen (DSM) (Babitt et al., 1997; Matveev et al., 2001; Graf et al., 2001).

Die Expression des SR-BI in verschiedenen Geweben hängt vor allem von deren Anteil am Cholesterol-Metabolismus ab. Deshalb findet man zum Beispiel eine hohe SR-BI Expression in der Leber, den Nebennieren und den Ovarien. Jedoch findet sich das Protein auch in Makrophagen (Buechler et al., 1999), Endothelzellen (Goti et al., 2001), verschiedenen Zellen des Intestinaltraktes (Lobo et al., 2001; Werder et al., 2001) und in Monozyten (Urban et al., 2000).

Ebenso wie CD36 ist auch SR-BI ein Rezeptor für verschiedene Liganden, wie natives und modifiziertes LDL, HDL und VLDL (Acton et al., 1994; Acton et al., 1996; Calvo et al., 1997) und für anionische Phospholipide (Rigotti et al., 1995). Nichtsdestotrotz werden alle diese Liganden spezifisch an beide Proteine gebunden, was vermutlich durch mehrere Bindungsstellen in den extrazellulären Domänen ermöglicht wird (Rhains und Brissette, 2004).

In der Plasmamembran vermittelt SR-BI selektiv sowohl die Aufnahme, als auch den Export von bestimmten Lipiden. In vergleichenden Experimenten konnte dabei eine unterschiedliche Lipidaffinität des Proteins festgestellt werden. Unter Verwendung von HDL als Donor wurde vorzugsweise freies Cholesterol internalisiert, gefolgt von Cholesterol-Estern, Triglyzeriden und Phospholipiden (Thuahnai et al., 2001).

1.3 Selektive Phospholipidinternalisierung über Proteine

Phospholipide spielen, abgesehen von ihrer einzigartigen Funktion als Membranbausteine, eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse. So sind sie unter anderem essentielle Bestandteile bei der intrazellulären Signaltransduktion und

wichtige Kofaktoren von Enzymkomplexen der Blutgerinnung (Acton et al., 1994; Acton et al., 1996). Um die verschiedenen, zum Teil hoch spezialisierten Funktionen und das empfindliche Gleichgewicht der Zellmembranen aufrechtzuerhalten, bedarf es eines fein regulierten Systems aus Import, Export, Neusynthese und Abbau. Die Aufnahme von Phospholipiden über extrazelluläre Donoren (HDL, LDL) spielt hierbei eine außerordentliche Rolle, da bestimmte, mehrfach ungesättigte Fettsäureketten, wie zum Beispiel Arachidonsäure, nicht von den Zellen selbst synthetisiert werden können.

Beim Menschen sind die Plasmalipoproteine die entscheidenden Phospholipidlieferanten für die Zellen des vaskulären Systems. SM, PC und PE repräsentieren fast 90% aller Phospholipide in HDL- und LDL-Partikeln. Die Phospholipide können zwar einerseits unspezifisch durch die Endozytose ganzer LDL-Partikel aufgenommen werden, aber diese Fähigkeit zur Rezeptor-vermittelten Endozytose variiert von Zelle zu Zelle erheblich. Manche Blutzellen, wie zum Beispiel Erythrozyten oder Thrombozyten, exprimieren den klassischen LDL-Rezeptor überhaupt nicht und müssen Phospholipide auf anderem Wege aufnehmen (Engelmann et al., 1996). So führt die Bindung von LDL an die Zellmembran von Thrombozyten zur selektiven Phospholipidaufnahme, die durch physiologische Plättchenstimuli beeinflusst werden kann (Dobner et al., 1999; Engelmann et al., 1998). Deshalb war anzunehmen, dass es noch andere, spezifisch proteinvermittelte Eintrittspforten gibt. Dabei konnte als erstes und bisher einziges Protein SR-BI als selektiver Phospholipidimporter identifiziert werden (Urban et al., 2000). Es zeigte sich, dass die selektive Aufnahme von SM, PC und PE aus Lipidvesikeln in Monozyten durch Antikörper gegen SR-BI um 62%, 70% und 77% vermindert werden konnte (Urban et al., 2000). Bestätigt wurden diese Beobachtungen auch an SR-BI transfizierten Zellen und mit anderen Lipiddonatoren (HDL, LDL) (Urban et al., 2000).

1.4 Membrandomänen und Endozytose

1.4.1 Intrazelluläre Verzahnung verschiedener Endozytosewege

Ein großer Teil der Internalisierung von Molekülen aus der Plasmamembran in das Zellinnere erfolgt durch die endozytotische Aufnahme über „Clathrin coated Pits“ (Mukherjee et al., 1997). Auf diese Weise aufgenommene Proteine und Lipide können

entweder wieder zurück zur Zellmembran zirkulieren, oder in „Late Endosomes“ und Lysosomen abgebaut werden (Maxfield und McGraw, 2004) (Abb. 1.6).

Eine weitere Art der Endozytose wurde für Choleratoxin (CTxB) und GPI verankerte Proteine vorgeschlagen, die beide in Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Domänen (Rafts bzw. Caveolae) lokalisiert sind (Nichols et al., 2001; Lamaze et al., 2001; Simons und Ikonen, 1997). Diese werden offensichtlich in Caveolin-1 positiven Endosomen von der Plasmamembran zum Golgi-Komplex transportiert, ohne dass es zu einer Kollokalisierung mit Markern der klassischen Endozytose und der „Early“- und „Recycling Endosomes“ kommt (Nichols, 2002).

Für Lipide, die durch die Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert werden, bilden nach einer Halbwertszeit von 1-2 Minuten die „Sorting Endosomes“ (SE) die erste intrazelluläre Schaltstelle. Es kommt dabei zur Fusion mehrerer solcher Vesikel untereinander und nach 5-10 Minuten verändern sich die bisher submembranös lokalisierten Strukturen, indem ihr pH Wert sinkt und sie das Enzym Saure Hydroxylase aquirieren (Maxfield und McGraw, 2004) (Abb. 1.6). Dieser Reifungsprozess ist gleichzeitig einer der Sortierungswege der Sorting Endosomes, an dessen Ende die „Late Endosomes“ stehen. Unter diesem Begriff subsumiert man eine heterogene Gruppe von Organellen mit unterschiedlichen Eigenschaften, die nicht direkt am endozytotischen Recycling teilnehmen. Ihre funktionelle Bedeutung ist bisher nur unzureichend bekannt. Die Reifung von Sorting Endosomes zu Late Endosomes wurde unter anderem in CHO Zellen genau untersucht, wobei die Sorting Endosomes eine Halbwertszeit von 8 Minuten aufwiesen (Maxfield und McGraw, 2004). Proteine, die nicht in Late Endosomes degradiert werden sollen, müssen also vorher die Sorting Endosomes verlassen. So beträgt die Halbwertszeit für den Transferrin-Rezeptor in den Sorting Endosomes nur 2 Minuten und über 95% der Moleküle rezyklieren zurück zur Plasmamembran (Dunn et al., 1989; Major et al., 1993).

Bisher kennt man zwei verschiedene Wege des Recyclings von Sorting Endosomes zurück zur Plasmamembran. Der eine besteht aus der direkten Rückkehr von Molekülen zur Plasmamembran ($T_{1/2} = 1-2$ Minuten) (Maxfield und McGraw, 2004). Der andere Weg führt zunächst zum „Endocytic Recycling Compartment“ (ERC) (Hao und Maxfield, 2000) (Abb. 1.6). Dieses umfasst eine Ansammlung tubulärer Organellen, die

mit Mikrotubuli assoziiert sind (Scheff et al., 1999; McGraw et al., 1993; Yamashiro et al., 1984). Die intrazelluläre Lokalisierung des ERC variiert von Zelle zu Zelle. So findet man in CHO Zellen eine charakteristische Verdichtung des ERC im Organisationszentrum der Mikrotubuli (Richtung Zellmitte), während es bei anderen Zellen gleichmäßig über das Zytoplasma verteilt ist (Lin et al., 2002). Auch wenn Moleküle vom ERC aus zu verschiedenen Zielen gelangen können, werden die meisten zurück zur Plasmamembran transportiert. Auf diese Weise gelangen zum Beispiel der Transferrin-Rezeptor und das Fluorophor-markierte Lipid SM (C6-NBD-SM) mit gleicher Kinetik ($T_{1/2} = 10$ Minuten) zurück zur Plasmamembran (Mayor et al., 1993). Da das ERC ein relativ langlebiges Kompartiment darstellt, müssen sich Moleküle, die zur Plasmamembran zurücktransportiert werden sollen, bestimmter Transportvehikel bedienen. Andererseits werden Glycosphingolipide, die mit Shiga-Toxin markiert sind, vom ERC zum Trans Golgi Netzwerk (TGN) transportiert (Sandvig und van Deurs, 2001). Auch die in Mikrodomänen angeordneten Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol verankerten Proteine erfahren eine spezielle Sortierung. In CHO Zellen werden sie zunächst ebenfalls ins ERC transportiert. Im Vergleich zum Transferrin-Rezeptor und C6-NBD-SM dauert der Rücktransfer an die Zellmembran bei den GPI-verankerten Proteinen allerdings durchschnittlich 30 Minuten. Wird den Zellen Cholesterol entzogen, so erfolgt das Recycling der GPI-verankerten Proteine mit gleicher Geschwindigkeit, wie für den Transferrin-Rezeptor und C6-NBD-SM (Mayor et al., 1998). Dies deutet darauf hin, dass Sphingolipid- und Cholesterol-reiche Domänen (DRM) eine gewichtige Rolle im Sortiermechanismus des ERC spielen.

In der Literatur wird der Begriff Early Endosomes häufig verwendet. Dieser umfasst die Sorting Endosomes und das Endocytic Recycling Compartment (Maxfield und McGraw, 2004).

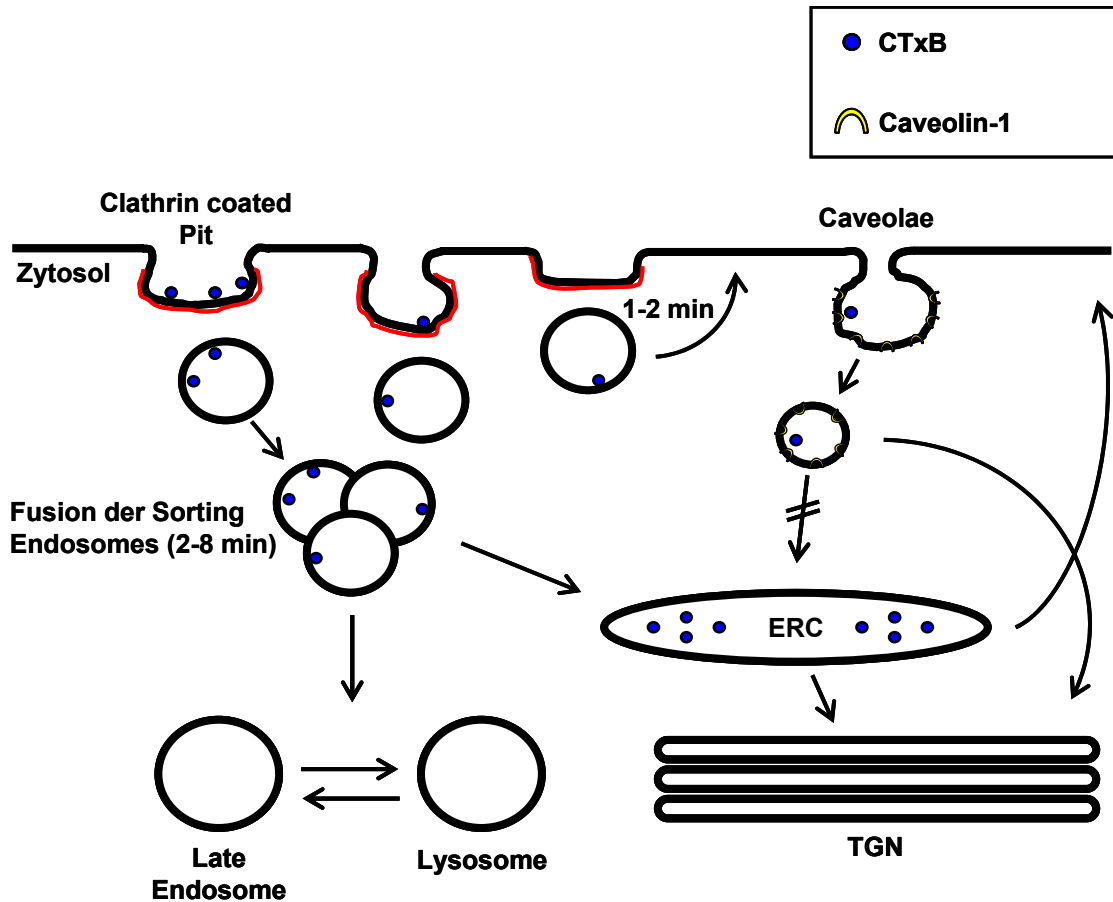


Abb. 1.6: CTxB kann auf verschiedenen Wegen endozytiert werden und wieder zur PM rezyklieren. Der größte Teil wird über Clathrin coated Pits aufgenommen und sammelt sich im Endocytic Recycling Compartment (ERC). Aufgrund ihrer schwierigen Differenzierbarkeit werden Sorting Endosomes (SE) und ERC oft als ein Zellkompartiment behandelt und als frühe endosomale Strukturen (Early Endosomes) bezeichnet. Modifiziert nach Mukherjee und Maxfield, 2000.

1.4.2 Endozytose und SR-BI

Da SR-BI spezifisch die Aufnahme von Lipiden, wie zum Beispiel Cholesterol und Cholesterol-Estern aus HDL und anderen Lipoproteinen vermittelt, ging man davon aus, dass das Protein dabei selbst nicht endozytiert wird (Rodrigueza et al., 1999; Azhar et al., 1998). Inzwischen konnte aber gezeigt werden, dass HDL in SR-BI transfizierten Zellen als Gesamtpartikel endozytiert und zum ERC transportiert wird (Silver et al., 2001). Dabei fungiert SR-BI als endozytotischer Rezeptor und wird als Komplex mit HDL aufgenommen. Weiterhin scheint der Endozytoseweg des SR-BI / HDL teilweise demjenigen des Transferrin-Rezeptors vergleichbar zu sein. Durch Transfektionen mit dominant negativen Mutanten (DynK44A, CavKSF) konnte jedoch die Clathrin-

vermittelte, wie auch eine Caveolae-assoziierte Endozytose ausgeschlossen werden (Silver et al., 2001).

Zusammengenommen zeigen diese Befunde, dass das Wissen über die Endozytose von Lipiddomänen und von Lipid-importierenden Proteinen noch sehr unzureichend ist.

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung folgender Fragestellungen:

1. Hat neben SR-BI auch CD36 eine Funktion beim Import von Phospholipiden in Zellen? Inwieweit ergänzen sich diese Proteine bei der Aufnahme von Phospholipiden in humane Monozyten?
2. Welche Rolle spielt dabei die Lokalisation und Verteilung von CD36 und SR-BI in Lipiddomänen der Plasmamembran?
3. Auf welche Weise werden die verschiedenen Phospholipide und Cholesterol durch SR-BI und CD36 in DRM- und DSM-Domänen verteilt?
4. Wie könnte der Mechanismus dieser Verteilung aussehen?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

2-Mercapto-ethanol	Roth (Karlsruhe)
Albumin bovine Fraction V	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Ammoniumperoxidsulphat (APS)	Roth (Karlsruhe)
BCA Protein Assay Reagens	Biorad (München)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Butylated Hydroxytoluene (BHT)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Chlorpromazine Hydrochloride	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Cholesterol Grade I	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Cu-Acetat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
D-Glucose	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ficoll Paque Plus	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Filipin Complex	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Glybenclamide	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Glycin	Roth (Karlsruhe)

HEPES	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
L-A-Phosphatidylcholin, 16:0/18:2	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
L-A-Phosphatidyl-Choline (Ei)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
L-A-Phosphatidyl-L-Serine	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Uelzena eG (Uelzen)
Morpholinoethansulphonsäure (MES)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Natriumazid	Merck-Schuchardt (München)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Nystatin	Calbiochem (Schwalbach)
Rotiphorese 30	Roth (Karlsruhe)
Sulfo-N-Succinimidyleate (SSO)	Dr. Claus Kerkhoff Inst. f. Experimentelle Dermatologie (Münster)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Trichloressigsäure (TCA)	Roth (Karlsruhe)
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
Tris Ultra Pure	Roth (Karlsruhe)

Triton X-100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Ultima Gold™	Packard BioScience B.V. (Groningen, Niederlande)
Verapamil Hydrochloride	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Hydroxypropyl β -Cyclodextrin	INC Biochemicals Inc.(Eschwege)

2.1.2 Materialien und Geräte

Materialien

Centricon (Porengröße 1×10^5)	Amicon, Millipore (MA, USA)
Gel Blotting Papier	Schleicher und Schuell (Dassel)
Hybond ECL (Nitrozellulosemembran)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Microbeads Säulen MS 25	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)

Apparaturen

Coulter Counter	Becton Dickinson (Heidelberg)
ELISA Reader Dynatech MR 7000	Dynatech Laboratories (Alexandria, USA)
JEOL 1200CX Elektronenmikroskop	JEOL Ltd. (Japan)
Konfokales Mikroskop TCS4D	Leica Microsystems GmbH (Heidelberg)
Mini Macs Zellseparator	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
Multiphor II (Blotting Anlage)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

Power Supply P25	Biometra (Göttingen)
Rackbeta 1219 Counter	LKB Wallac (USA)
Ultracut S	Leica Microsystems GmbH (Heidelberg)

Zentrifugen

Optima LE-80K	Beckmann (München)
Rotina 35R	Hettich (Tuttlingen)
SW 60 Rotor	Beckmann (München)
Micro 22R	Hettich (Tuttlingen)
Universal 32	Hettich (Tuttlingen)

2.1.3 Antikörper, Proteasen und Inhibitoren

Antikörper

Anti-Biotin Antikörper	Sanver Tech. (Heerhugowaard, Niederlande)
Anti-CD36 (FA6-152, IMO765)	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
Anti-Clathrin Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, USA)
Anti-CST-P-Tyr100	New England BioLabs GmbH (Frankfurt)
Maus Anti-EEA1	BD Bioscience (Becton, Dickinson and Company, USA)
Ziege Anti-Maus IgG-1 Antikörper Alexa 488	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Anti-Maus IgG Peroxidasekonjugat (401253)	Calbiochem (Schwalbach)
Anti-SR-BI (400-104, ab115)	Abcam, Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
Anti-SR-BI/BII (400-103, ab115)	Abcam, Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
Maus-Anti-Human Tissue Factor VD8	PD Dr. Thomas Luther (Institut für Pathologie, TU Dresden)
Microbeads CD14 Antikörper (502-01)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

Proteasen und Inhibitoren

Apo A-I	Dr. Moritz Werder (Lipideon Biotechnology AG, Schlieren, Schweiz)
Apyrase Grad III	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Iloprost	Schering AG (Berlin)
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Protease Inhibitor Cockail	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Marker und Standards

Farbmarker (Wide range C3437)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Gamma Globulin	Biorad (München)

2.1.4 Radioaktive Substanzen

Cholesterol ([1 α ,2 α (n)- ³ H] Cholesterol)	Amersham Pharmacia Biotech UK Limited (Buckinghamshire, UK)
Phosphatidylethanolamin (1-palmitoyl-2-[1- ¹⁴ C] linoleoyl-3- Phosphatidylethanolamine)	Amersham Pharmacia Biotech UK Limited (Buckinghamshire, UK)
Sphingomyelin ([N-methyl- ¹⁴ C] Sphingomyelin)	Amersham Pharmacia Biotech UK Limited (Buckinghamshire, UK)

2.1.5 Zellkultur, Zellen und Substanzen

CHO Zellen (Chinese Hamster Ovary, SR-BI transfiziert und Wild-Typ)	Dr. Elisa Scarselli IRBM P. Angeletti (Pomezia, Roma)
HeLa Zellen Tumorzellen aus Cervixgewebe von Henrietta Lachs (CD36 transfiziert und Mock transfiziert)	Dr. Miguel A. Vega Servicio de Bioquímica-Investigación Hospital Ramon y Cajal (Madrid)

Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH (Linz, Austria)
Geneticin G 418	Gibco Industries, Inc. (Langley, USA)
L-Glutamin 100-fach	PAA Laboratories GmbH (Linz, Austria)
MEM alpha Medium	Gibco Industries, Inc. (Langley, USA)
Penicillin/Streptomycin 100-fach	PAA Laboratories GmbH (Linz, Austria)
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Trypsin/EDTA 1-fach	PAA Laboratories GmbH (Linz, Austria)

2.1.6 Substanzen mit Fluorophoren

Cholera toxin subunit B, Alexa Fluor 594 conjugate	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
C 12-NBD-Sphingomyelin (6((N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)hexanoyl) sphingosylphosphocholine)	Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabama, USA)
Pyren-Phosphatidylcholin (1-palmitoyl-2-pyrendecanoyl-sn-3-glycerophosphorylcholin)	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Pyren-Phosphatidylethanolamin (1-palmitoyl-2-pyrendecanoyl-sn-3-glycerophosphoryl-ethanolamin)	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Pyren-Sphingomyelin (N-pyrendecanoyl-sphingomyelin)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Transferrin aus Humanserum, Alexa Fluor 633 conjugate	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
16:0/12:0-N-NBD Phosphatidylethanolamine (1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl] sn-glycero-3-phosphoethanolamine)	Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabama, USA)

2.1.7 Puffer

Resuspendierungspuffer A

pH 7,35	
NaCl	138 mM
KCl	2,7 mM
NaHCO ₃	12 mM
NaH ₂ PO ₄	0,4 mM
MgCl ₂	1 mM
D-Glucose	5 mM
Hepes	5 mM

Resuspendierungspuffer B

pH 7,35	
NaCl	138 mM
KCl	2,7 mM
NaHCO ₃	12 mM
NaH ₂ PO ₄	0,4 mM
MgCl ₂	1 mM
D-Glucose	5 mM
Hepes	5 mM
CaCl ₂	2 mM

Monozytenwaschpuffer

pH 7,4	
BSA	0,15%
Na ₂ EDTA	0,13%
In PBS(-)	

Antikörperpuffer

pH 7,4	
BSA	0,5%
EDTA	5 mM
In PBS(-)	

Thrombozyten-Waschpuffer

pH 6,2	
NaCl	138 mM
KCl	2,7 mM
NaHCO ₃	12 mM
NaH ₂ PO ₄	0,4 mM
MgCl ₂	2 mM
Glucose	5 mM

Aufbewahrungspuffer für Lipoproteine

pH 7,4	
Tris Base	10 mM
NaCl	150 mM
NaEDTA	0,3 mM

MNE Puffer

pH 6,5	
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM
MES	25 mM

CaHepes Puffer

pH 7,4	
NaCl	125 mM
KCl	5 mM
NaH ₂ PO ₄	1,3 mM
CaCl ₂	2,5 mM
MgCl ₂	1,5 mM
D-Glucose	10 mM
HEPES	10 mM

Probenpuffer (5x)

Tris (pH 6,8)	0,31 mM
SDS	2,5%
Glycerol	50%
Bromphenol Blau	0,125%
2-Mercapto-ethanol	6,0%

Transfer Puffer

Tris	25 mM
Glycin	0,2 M
Methanol	20%

TBS 10-fach (Tris-buffered saline)

pH 7,6	
Tris	24,20 g
NaCl	80 g
In 1l Aqua dest. Gelöst	

Blocking Puffer

TBS 1-fach	
Tween-20	0,1%
Milchpulver	5%

Waschpuffer (TBS/T)

TBS 1-fach	
Tween-20	0,1%

Primär Antikörper Verdünnungspuffer

TBS 1-fach	
Tween-20	0,1%
BSA	5%

Phosphate Buffered Saline PBS(-)

In 1 Liter Aqua dest.	pH 7,4	
	NaCl	8g
	KH ₂ PO ₄	0,2g
	Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	1,42g
	KCl	0,2g

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung der Monozyten

Die Monozytenisolierung erfolgte unter Verwendung magnetisch markierter Anti-CD14 Antikörper aus frischem Vollblut gesunder freiwilliger Spender. Zur Hemmung der Gerinnung wurde das Blut im Verhältnis 1:10 mit Natrium-Citrat (3,68 g / 100 ml; pH 7,4) verdünnt und danach für 15 Minuten bei 230 x g zentrifugiert. Schließlich wurde das Plasma vorsichtig bis zum Buffy coat, der Leukozytenmanschette, die der Erythrozytenschicht aufliegt, abgesaugt. Das Buffy coat wurde großzügig abpipettiert und im Verhältnis 1:4 mit PBS(-) verdünnt. Je 15 ml dieser Zellsuspension wurden in einem 50 ml Röhrchen auf 13 ml Ficoll (d=1,007) aufgegeben und für 25 Minuten bei 500 x g und 22°C ohne Bremse zentrifugiert. Hierbei kam es zu einer Trennung der Leukozyten von den Erythrozyten. Damit konnte die Leukozyten-Interphase entnommen werden. Diese wurde in einem 50 ml Röhrchen mit Monozytenwaschpuffer auf 40 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und bei 200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes wurde das resultierende Zellpellet in Antikörperpuffer (250µl) resuspendiert. Pro 1 ml verwendetem Vollblut wurde je 1 µl der Anti-CD14 Antikörperlösung (Microbeads) hinzugefügt und die Proben für 15 Minuten bei 6-8°C inkubiert. In der Zwischenzeit konnte die Vorbereitung der Magnetsäulen erfolgen, die hierfür mit Antikörperpuffer gespült und in die Magneten gehängt wurden. Die Zellsuspension wurde mit Antikörperpuffer auf 1 ml verdünnt und anschließend auf die Säulen gegeben. Nach ihrer Passage wurde jede Säule dreimal mit je 500 µl Antikörperpuffer gespült.

Durch die spezifische Bindung der Monozyten an die magnetisch markierten Anti-CD14 Antikörper wurden diese von den anderen Leukozyten getrennt. Durch Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld konnten die Zellen schließlich mit 2 ml Antikörperpuffer und einem Kolben in ein 13 ml Röhrchen gespült werden. Nach Zugabe von 2 ml Resuspendierungspuffer A erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 200 x g und 22°C. Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt und das Pellet in 500 µl Resuspendierungspuffer A gelöst.

Die Zahl der Monozyten ließ sich schließlich in einer Neubauer Zählkammer bestimmen, indem ein definiertes Volumen der Monozytensuspension mit Trypanblau angefärbt, ausgezählt und danach auf das Gesamtvolumen der Zellsuspension umgerechnet wurde.

2.2.2 Kultivierung der HeLa Zellen

Die HeLa Zellen waren stabil mit cDNA von humanem CD36 bzw. Mock (Negativkontrolle) transfiziert (Armesilla, Vega 1996). Zur positiven Selektion wurden sie immer unter Geneticin G-418 (0,5 mg/ml) kultiviert. Die erfolgreiche Transfektion und Expression des CD36 konnte sowohl durch flowzytometrische Messungen als auch durch Western Blots demonstriert werden.

HeLa und CHO Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in T-75 Zellkulturflaschen unter einer Atmosphäre mit 5% CO₂ gezüchtet. Als Kulturmedium verwendeten wir für die HeLa Zellen RPMI 1640 Medium mit 2 mM Glutamin, 10% fötalem Kälberserum und 0,1 mg/ml Penicillin / Streptomycin zum Schutz vor Verunreinigung durch andere Mikroorganismen. Zum Passagieren wurden die Zellen jeweils mit 5 ml PBS(-) gespült und danach mit 1 ml Trypsin für 2-3 Minuten angedaut. Die von der Kulturschale gelösten Zellen konnten dann passagiert (1:10) und schließlich nach Zugabe von 10 ml Kulturmedium durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig am Boden der Schale verteilt werden. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage; die Zellteilung beim Verhältnis 1:10 alle 4 Tage.

Am Versuchstag wurden die Zellen durch Trypsinierung von der Zellkulturflasche gelöst und anschließend mit 5 ml Resuspendierungspuffer B bei 120 x g für 10 Minuten zweimal gewaschen. Das Lösen der Zellen erfolgte dann in 1 ml Resuspendierungspuffer und die Zellzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer nach Trypanblau-Färbung unter dem Mikroskop bestimmt.

2.2.3 Kultivierung der CHO Zellen

Die CHO Zellen wurden stabil mit humanem SR-BI transfiziert und die positive Zellselektion durch 0,5 mg/ml Geneticin G-418 gewährleistet (Scarselli et al., 2002). So konnte in Western Blots bei den SR-BI positiven Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen eine spezifische Bande bei 84 kDa detektiert werden. Die Zellen wurden

in MEM-alpha Medium mit 10% Fötalem Kälberserum kultiviert und unter 0,1 mg/ml Penicillin / Streptomycin vor Mikroorganismen geschützt. Aufgrund ihres schnellen Wachstums konnten die Zellen alle 3 Tage geteilt werden. 12 Stunden vor einem Versuch wurden die Zellen in definierter Zahl so auf die Zellkulturschalen verteilt, dass sie zum Versuchszeitpunkt subkonfluent am Boden der Schalen hafteten. Jeweils vor den radioaktiven Versuchen und auch den Laserscan-Experimenten wurden die Zellen dreimal mit CaHEPES Puffer gewaschen.

2.2.4 Herstellung der Phospholipidvesikel

Phospholipide, die mit dem Fluorophor Pyrendecansäure (Pyren) markiert waren, wurden mit unmarkierten Phospholipiden als Matrix zu unilamellären Vesikeln geformt. Zur Verwendung kamen dabei die Substanzen Pyren-Sphingomyelin (N-pyrendecanoyl-sphingomyelin), Pyren-Phosphatidylcholin (1-palmitoyl-2-pyrendecanoyl-sn-3-glycerophosphorylcholin) und Pyren-Phosphatidylethanolamin (1-palmitoyl-2-pyrendecanoyl-sn-3-glycerophosphorylethanolamin), sowie Ei-Phosphatidylcholin als Matrix. Die Pyren-markierten Phospholipide (je 12,5 µg) und das Ei-PC (je 35 µg), die in einer Chloroform / Methanol Lösung (2:1) bei -20°C unter Stickstoff gelagert waren, wurden im Wasserbad bei 37°C unter Begasung mit Stickstoff in einem spitz zulaufenden Glasreagenzglaschen gemischt und eingedampft. Darauf wurden sie in 20 µl Ethanol gelöst, wobei die an der Glaswand klebenden Lipide sorgfältig ab gespült wurden. 10 µl der Lösung wurden dann mit einer 20 µl Hamilton Spritze entnommen und in 500 µl Resuspendierungspuffer A eingeleitet. Entscheidend für die Bildung der unilamellären Vesikel war hierbei das extrem langsame Einleiten der Lipidlösung in den Puffer, in welchem mittels Rührfisch ein heftiger Wirbel erzeugt wurde. Zum Schutz vor Oxidation wurde die Emulsion unter Argon und Lichtschutz aufbewahrt und maximal einen Tag lang verwendet. Je 40 µl der Vesikellösung wurden in einem Gesamtvolumen von 400 µl mit 5×10^5 Monozyten eingesetzt.

2.2.5 Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Spectrofluorophotometer RF 5001 PC der Firma Shimadzu durchgeführt. Die Proben wurden hierbei in einer 400 µl Küvette bei 37°C über einen Zeitraum von 10 Minuten unter „online“ Bedingungen gemessen, wobei alle 30 Sekunden eine Messung stattfand. Die Bleichung und Eigendynamik der

fluoreszierenden Vesikellösung wurde an jedem Versuchstag von neuem bestimmt und berücksichtigt. Die Pyrendecansäure, mit der die Phospholipide markiert waren, wurde bei einer Wellenlänge von 343 nm angeregt, die Emissionen hingegen erfolgte bei 378 nm (Monomer 1), 395 nm (Monomer 2) und 470 nm (Excimer). Das Messprinzip beruht auf der unterschiedlichen Fluoreszenz der Pyrenmoleküle. Liegen diese eng zusammen, so fluoreszieren sie bei 470 nm, alleine hingegen strahlen sie bei 378 nm und 395 nm. Diese Eigenschaft macht man sich zunutze, indem man die Vesikel dicht mit Pyren-markierten Phospholipiden belädt und daraus eine hohe Excimer-Fluoreszenz resultiert. Nach Aufnahme der markierten Phospholipide in die Zellen werden sie verteilt, so dass die Monomer-Fluoreszenz steigt. Andererseits nimmt die Zahl der Pyrenmoleküle in den Vesikeln und damit die Excimer-Fluoreszenz ab. Als Grundlage für die Quantifizierung des Phospholipideinbaus wurde daher die Verminderung des Quotienten aus Excimer- und Monomer-Fluoreszenz herangezogen. Weiterhin kann mit dieser Methode die selektive Aufnahme der Phospholipide von einem endozytotischen Prozess eines ganzen Vesikels differenziert werden, da bei letzterem der Quotient Excimer / Monomer zunächst unverändert bleibt.

2.2.6 Radioaktivität

Internalisierung der Lipide in DRM und DSM

Die Herstellung der radioaktiv markierten Phospholipidvesikel erfolgte prinzipiell auf gleiche Weise wie die der Pyren markierten Lipide. Als Matrix wurde jedoch 16:0/18:2 Phosphatidylcholin (3 µg / Versuchsansatz) verwendet und mit Spuren von radioaktivem ^3H -Cholesterol ([1 α ,2 α (n)- ^3H] Cholesterol), ^{14}C -Phosphatidylethanolamin (1-palmitoyl-2-[1- ^{14}C]linoleoyl-3-Phosphatidylethanolamine) und ^{14}C -Sphingomyelin ([N-methyl- ^{14}C] Sphingomyelin) versetzt.

Pro Ansatz wurden 1×10^6 Monozyten für verschiedene Zeitintervalle bei 37°C in 400 µl Resuspendierungspuffer A mit der radioaktiven Vesikellösung inkubiert. Danach wurde für 30 Minuten bei 4°C ein 50-facher Überschuss an reinen 16:0/18:2 Phosphatidylcholin-Vesikeln (150 µg / Versuchsansatz) dazugegeben, um die gebundenen radioaktiven Lipide von der Zellmembran zu verdrängen. Es folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit eiskaltem PBS(-). Anschließend wurden die Detergens-resistenten Domänen über Sucrosegradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert. Die

8 Fraktionen (je 500 μ l) wurden mit Szintillationsflüssigkeit auf 6 ml aufgefüllt und die Radioaktivität im β -Counter bestimmt.

Messung des zeitabhängigen Lipidtransfers zwischen Membrandomänen

Um den Austausch der Phospholipide und Cholesterol zwischen DRM- und DSM Domänen darzustellen und zu quantifizieren, wurden die Zellen für ein kurzes Zeitintervall mit radioaktiven Lipiden beladen und anschließend die Umverteilung der internalisierten Lipide zwischen den Membrandomänen zeitabhängig beobachtet.

Pro Ansatz wurden wieder 1×10^6 Monozyten in 500 μ l Resuspendierungspuffer mit ^{14}C - und ^3H -markierten Lipidvesikeln für 90 Sekunden inkubiert (Pulse). Nach Entfernung der zellgebundenen radioaktiven Vesikel durch 50-fachen Überschuss unmarkierter Vesikel wurden die Proben dreimal gewaschen (4°C) und dann nochmals für verschiedene Zeitintervalle von 0 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Chase). Der bei 37°C wieder einsetzende Umverteilungsprozess wurde nach den verschiedenen Inkubationsintervallen durch eiskaltes PBS(-) gestoppt und es folgte die Isolation der Detergens-resistenten Domänen. Mittels dieser Versuchsanordnung konnte die zeitabhängige Umverteilung der bereits internalisierten Lipide zwischen DRM und DSM Domänen beobachtet werden.

2.2.7 Isolierung der Detergens-resistenten Membranen (DRM)

Ausgangspunkt zur Isolierung der Detergens-resistenten Membranen war bei den radioaktiven Versuchen jeweils ein Zellpellet aus 1×10^6 Monozyten, HeLa oder CHO Zellen nach 1,5-minütiger Zentrifugation bei 4°C in einer Eppendorf Zentrifuge. Bei Präparationen für Western Blots wurden bis zu 25×10^6 Zellen verwendet, um die Proteine CD36 und SR-BI detektieren zu können, wobei Pellets aus ungefähr 5×10^6 Zellen pro Ultrazentrifugenröhrchen eingesetzt wurden. Zur Vorbeugung des Proteinabbaus durch zelleigene Enzyme und einer damit verbundenen erschwerten Detektion, wurden Phosphatase- und Protease-Inhibitoren eingesetzt.

Die im Folgenden beschriebene Isolation der DRM erfolgte akribisch bei 3°C . Zunächst wurden die Pellets in jeweils 250 μ l MNE Puffer mit 1% Triton X-100 für 30 Minuten solubilisiert und anschließend durch 10-maliges Aufziehen mittels Kanüle und 1 ml Spritze homogenisiert. Die 250 μ l des Homogenisates wurden nun mit gleichem

Volumen einer 80%igen Sucroslösung gemischt und die resultierende 40%ige Suspension in ein 4 ml Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert. Nacheinander ließen sich dann Sucroslösungen (Sucrose gelöst in MNE Puffer) mit abnehmender Sucrosekonzentration vorsichtig aufleiten und hierdurch ein Gradient aufbauen, der aufgrund seiner unterschiedlichen Dichte eine Trennung von DRM und Detergens-löslichen Membranen (DSM) ermöglichte: 1000 µl 31%ige Sucrose / MNE (0,9 M), 500 µl 27%ige Sucrose / MNE (0,8 M), 1000 µl 24%ige Sucrose / MNE (0,7 M), 1000 µl 3,4%ige Sucrose / MNE (0,1 M). Die Proben wurden schließlich bei 200 000 x g für 16 h in einer Beckmann Ultrazentrifuge (Rotor SW 60) zentrifugiert, die ohne Bremse auslief. Bei der Isolation größerer Zellmengen für Western Blot Präparationen sah man nach der Zentrifugation im Bereich der Fraktionen 3 und 4 eine leichte Trübung, die ein erfolgreiches Aufschwimmen der DRM-Fraktionen anzeigte. Es wurden 8 Fraktionen zu je 500 µl abpipettiert, wobei die DRM in den Fraktionen 3-5, die DSM jedoch in den Fraktionen 6-8 zu finden waren. Der Nachweis der korrekten Trennung erfolgte durch Western Blot Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen Phospho-Tyrosin-haltige Peptide und Proteine (CST-p-Tyr-100 Antibody), die in DRM wesentlich höher exprimiert sind als in DSM.

2.2.8 Elektronenmikroskopie

Die Fixierung der CHO Zellen erfolgte durch 2% Paraformaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd gelöst in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2). Anschließend wurden sie mit 2,3 M Sucroslösung infiltriert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Anfertigen der 50-60 nm dicken Schnitte bei -120°C wurde eine Ultracut S Schneidemaschine, bestückt mit einem Diamantmesser (Drukker) und antistatischer Vorrichtung (Diatome) verwendet und die Schnitte dann auf einem beschichteten Gitter (1,8% Methylzellulose, 2,3 M Sucrose) gesammelt. Zur Detektion bestimmter Strukturen wurden spezifische Antikörper eingesetzt und mit Protein A Gold markiert. Bei monoklonalen Antikörpern wurde ein Anti-Maus-Antikörper als Bindeglied eingesetzt. Bei Doppelfärbungen der Schnitte wurde mit Goldpartikeln unterschiedlicher Größe (10 nm, 15 nm) gearbeitet. Nach ihrer Markierung wurden die Schnitte in 1% Glutaraldehyd fixiert, für 5 Minuten mit Uranylloxalat (pH 7,0) gegengefärbt und schließlich in einer Mischung aus 1,8% Methylzellulose und 0,3% Uranylacetat bei 4°C eingebettet. Die Betrachtung der

verschiedenen Schnitte erfolgte mit einem JEOL 1200CX Elektronenmikroskop, wobei die Bildnegative eingescannt und mit Adobe Photoshop bearbeitet wurden.

Die Lokalisierung der Cholesterol-reichen Domänen auf submikroskopischer Ebene wurde durch die Substanz Perfringolysin O (Θ -Toxin, BC Θ) ermöglicht. Das Toxin wurde mit Subtilisin Carlsberg (Ohno-Iwashita et al., 1986) angedaut und biotinyliert (Iwamoto et al., 1997). Zur Detektion membranständiger Cholesterol-reicher Domänen wurden die CHO Zellen für 45 Minuten bei 4°C mit Perfringolysin O (15 μ g/ml) inkubiert. Um frühe endosomale Strukturen zu markieren, wurde ungebundenes BC Θ gewaschen und die Zellen bei 37°C für weitere 10 Minuten inkubiert. Zum Stoppen dieses Prozesses wurden die Zellen durch einen 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) mit 0,2% Glutaraldehyd und 2% Paraformaldehyd fixiert. BC Θ konnte dann auf Ultradünnschnitten mit Hilfe von Anti-Biotin Antikörpern und Protein A Gold (10 nm) sichtbar gemacht werden. Zur Detektion von SR-BI und Clathrin wurden ebenfalls spezifische Antikörper eingesetzt und bei Experimenten mit Doppelfärbungen Goldpartikel unterschiedlicher Größe (10 nm, 15 nm) verwendet (Slot et al., 1991).

2.2.9 Proteinchemische Methoden

Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde als Standard γ -Globulin (Biorad) eingesetzt und eine Verdünnungsreihe von 3,25 μ g bis 120 μ g hergestellt. Die Messung der Proteinmenge erfolgte nach dem Biorad BCA Assay. Hierfür wurden je 5 μ l der Standardverdünnungsreihe und der Proben in eine 96 Loch-Platte pipettiert und nacheinander 25 μ l der Lösung A und 200 μ l der Lösung B dazugegeben. Die Absorption konnte nach 15-minütiger Inkubation photometrisch bestimmt werden. Der Proteingehalt wurde anhand der Verdünnungsreihe des Proteinstandards und dem Verdünnungsgrad der Proben ermittelt.

Aufarbeitung der Fraktionen für die SDS-PAGE

Nach der Dichtezentrifugation in Sucrosegradienten, die zur Trennung von DRM und DSM Domänen geführt hatte, wurden die 8 Fraktionen zunächst in einer 10% TCA Lösung für 20 Minuten bei 3°C gefällt und anschließend für 30 Minuten bei 13000 rpm

und 3°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proteinpellets luftgetrocknet. Darauf wurden sie in 30-100 µl NaOH (0,2 M) bei 3°C homogen gelöst.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE konnten die verschiedenen Proteine der 8 Fraktionen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Je nach Versuchsreihe wurden hierfür Proteinmengen von 5-15 µg pro Probe verwendet, die mit 4 µl des Probenpuffers (5-fach) und H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl eingestellt und für 3 Minuten bei 95°C denaturiert wurden. Da sowohl CD36 als auch SR-BI ein Molekulargewicht von 82-88 kDa besitzen, verwendeten wir 7%ige Acrylamid Gele, die die beste Auflösung in diesem Bereich gewährleisteten. Die Proben wurden schließlich in die Taschen des Sammelgels eingeleitet und die Proteine bei 140 V aufgetrennt. Ein Farbmarker ermöglichte die Bestimmung des Molekulargewichts der Proteinbanden.

Western Blot

Western Blots wurden zum Nachweis sowohl der gelungenen Isolation von DRM und DSM Fraktionen, als auch der Expression der Proteine CD36 und SR-BI und ihrer Verteilung verwendet. Nachdem die Proteine in der SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese getrennt worden waren, wurde das Gel im halbtrockenen Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und nach Blocken der Membran mit dem ersten Antikörper (Anti-CD36, Anti-SR-BI oder Anti-p-Tyr-100) für eine Stunde inkubiert. Nach Waschen der Membran mit TBS/T Puffer erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Horse-Radish-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper (1:2000). Mit Chemilumineszenz Lösungen konnten die Proteine dann auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

2.2.10 Konfokale Mikroskopie

Monozyten

Die frisch isolierten Monozyten wurden in 500 µl Resuspendierungspuffer A zu je 5×10^5 pro Ansatz aufgeteilt und die nachfolgenden Inkubationen grundsätzlich bei 3°C durchgeführt. Um die Aufnahme der beiden Phospholipide Sphingomyelin (6((N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)hexanoyl) Sphingosylphosphocholine) (NBD-

SM) und Phosphatidylethanolamin (1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl] sn-glycero-3-phosphoethanolamine) (NBD-PE) in die Plasmamembran auch morphologisch zu demonstrieren, wurden die Zellen für 15 Minuten mit den fluoreszierenden Phospholipiden (4 μM) angefärbt. Zur Entfernung der an der Außenseite der Membran haftenden Phospholipide, wurden die Zellen für 30 Sekunden in saurem Resuspendierungspuffer A (pH 3,5) inkubiert und danach dreimal mit Resuspendierungspuffer A (pH 7,35) gewaschen. Das mit dem Fluorophor Alexa 594 markierte Cholera Toxin subunit B (CTxB), welches an GM1 Ganglioside der Zelloberfläche bindet, die vor allem in DRM lokalisiert sind, wurde eingesetzt, um Kollokalisierungen der Phospholipide mit den DRM aufzuzeigen. Hierfür wurden die Zellen für 30 Minuten mit CTxB (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert, wobei die Phospholipide in den letzten 15 Minuten hinzugefügt wurden. Zum Mikroskopieren bei 37°C wurden die Monozyten schließlich in Resuspendierungspuffer A (+ 10mM CaCl_2) gelöst und auf den Objektträger pipettiert.

CHO Zellen

Die Präparation der CHO Zellen fand in Zellkulturschalen (\varnothing 6 cm) mit CaHepes Puffer statt. 24 h zuvor wurden sie so geteilt, dass sie am Tag der Präparation subkonfluent am Mikroskopiergläschen angewachsen waren.

Das Zellkulturmedium wurde sorgfältig durch dreimaliges Spülen der Zellen mit CaHepes Puffer entfernt. Hiermit wurden einerseits tote Zellen gewaschen, andererseits Interaktionen zwischen Serumproteinen des Mediums und den Fluoreszenz-markierten Phospholipiden CTxB und Transferrin verhindert. Die Inkubation der CHO Zellen mit Transferrin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) erfolgte bei 37°C für 30 Minuten, wobei in den letzten 10 Minuten CTxB (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) addiert wurde. Nach Herunterkühlen der Proben auf 4-6°C wurden schließlich 4 μM NBD-SM für 3-5 Minuten hinzugefügt. Zur Entfernung von nicht internalisierten Fluorophoren wurden die Zellen abschließend dreimal gründlich mit kaltem CaHepes Puffer gespült und konnten dann bei 37°C unter dem konfokalen Mikroskop beobachtet werden.

Zur Darstellung von frühen Endosomen wurden die Zellen nach Inkubation mit CTxB und intensivem Waschen mit 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert, mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert und schließlich mit 0,2% BSA in PBS für 10 Minuten geblockt. Die

fixierten CHO Zellen wurden nun für 45 Minuten mit dem primären Anti-EEA1 Antikörper (4 µg/ml) inkubiert und der gebundene Anteil durch einen Fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (5 µg/ml) sichtbar gemacht.

2.2.11 Isolierung und Präparation der Lipoproteine

Die Lipoproteine wurden aus frisch entnommenem Vollblut gesunder Spender durch Ultrazentrifugation isoliert. Nach zwei 15-minütigen Zentrifugationen bei 593 x g und 24°C wurden die Thrombozyten aus dem Plasma entfernt, das anschließend für 20 h bei 142.960 x g (4°C) ultrazentrifugiert wurde. Zunächst wurden bei einer Dichte von 1006 g/l die LDL/HDL Fraktionen von denjenigen der VLDLs und Chylomikronen getrennt. Die LDL/HDL Fraktion konnte oberhalb des entstandenen Blutkuchens mit einer Kanüle abgesaugt werden. Mit KBr (Kalium-Bromid) wurde die Lösung auf eine Dichte von 1063 g/l eingestellt und danach für 22 h bei 142.960 x g und 4°C zentrifugiert. Hierdurch bildete sich eine im UZ-Röhrchen oben schwimmende, LDL-haltige Schicht, die von der mit weiteren Plasmabestandteilen vermischten HDL-Fraktion getrennt war. Die LDL Phase wurde vorsichtig abgenommen und zur Vermeidung von Oxidationsprozessen mit Argon begast und bei 4°C gelagert. Durch Einstechen mit einer Kanüle gewann man die HDL Phase. Diese wurde mit KBr auf eine Dichte von 1220 g/l eingestellt und schließlich wieder für 22 h bei 142.960 x g und 4°C zentrifugiert. Dadurch reicherte sich nun das HDL in der oberen Schicht an und konnte dann abpipettiert werden. Die LDL- und HDL-Fraktionen wurden je zweimal in Centricons (Porengröße 100 000) mit Aufbewahrungspuffer unter Argon-Begasung gewaschen und zum Schluss aliquotiert. Nach der Proteinbestimmung wurden gleiche Lösungen gleicher Proteinmengen auf verschiedene Reagenzgläschen verteilt. Den Suspensionen von HDL und LDL wurden 20 µM BHT (Butylated Hydroxy Toluene) zugegeben und diese dann mit Argon versetzt. Ein weiteres Aliquot der LDL-Lösung wurde mit 10 µM CuAcetat (Cupric Acetate Monohydrate) in Resuspendierungspuffer A für 6 h oxidiert und schließlich auch in BHT/Resuspendierungspuffer aufbewahrt.

3 Ergebnisse

3.1 Proteine der CD36 Familie als selektive Phospholipid-Transporter

3.1.1 CD36 vermittelt selektiv die Aufnahme von SM und PC

Um die Rolle des Transmembranproteins CD36 für den selektiven Einbau von Phospholipiden zu untersuchen, wurden humane Monozyten zunächst mit unilamellären Phospholipidvesikeln inkubiert. Diese bestanden aus einer Matrix aus Ei-Phosphatidylcholin und jeweils den Pyren-markierten Lipiden SM, PC oder PE. Die selektive Aufnahme der Phospholipide konnte hierbei anhand der Abnahme des Quotienten aus Monomer- und Excimer-Fluoreszenz unter Online-Bedingungen direkt gemessen werden. Bei allen drei Lipiden beobachteten wir eine deutliche Sättigung des selektiven Importes nach 10 Minuten.

Zum Nachweis einer Beteiligung von CD36 wurden monoklonale Antikörper eingesetzt, die spezifisch an den extrazellulären Anteil von humanem CD36 binden und das Protein damit funktionell hemmen. Der Anti-CD36 Antikörper (10 µg/ml) hemmte die Inkorporierung von SM und PC in die Monozyten deutlich. Im Gegensatz dazu wurde die Aufnahme von PE in die Zellen durch den Antikörper nicht beeinflusst (Abb. 3.1). Verschiedene Kontrollantikörper (Anti-P-Selectin, Anti-TF) zeigten keinen Einfluss auf die Aufnahme der markierten Phospholipide in die Monozyten.

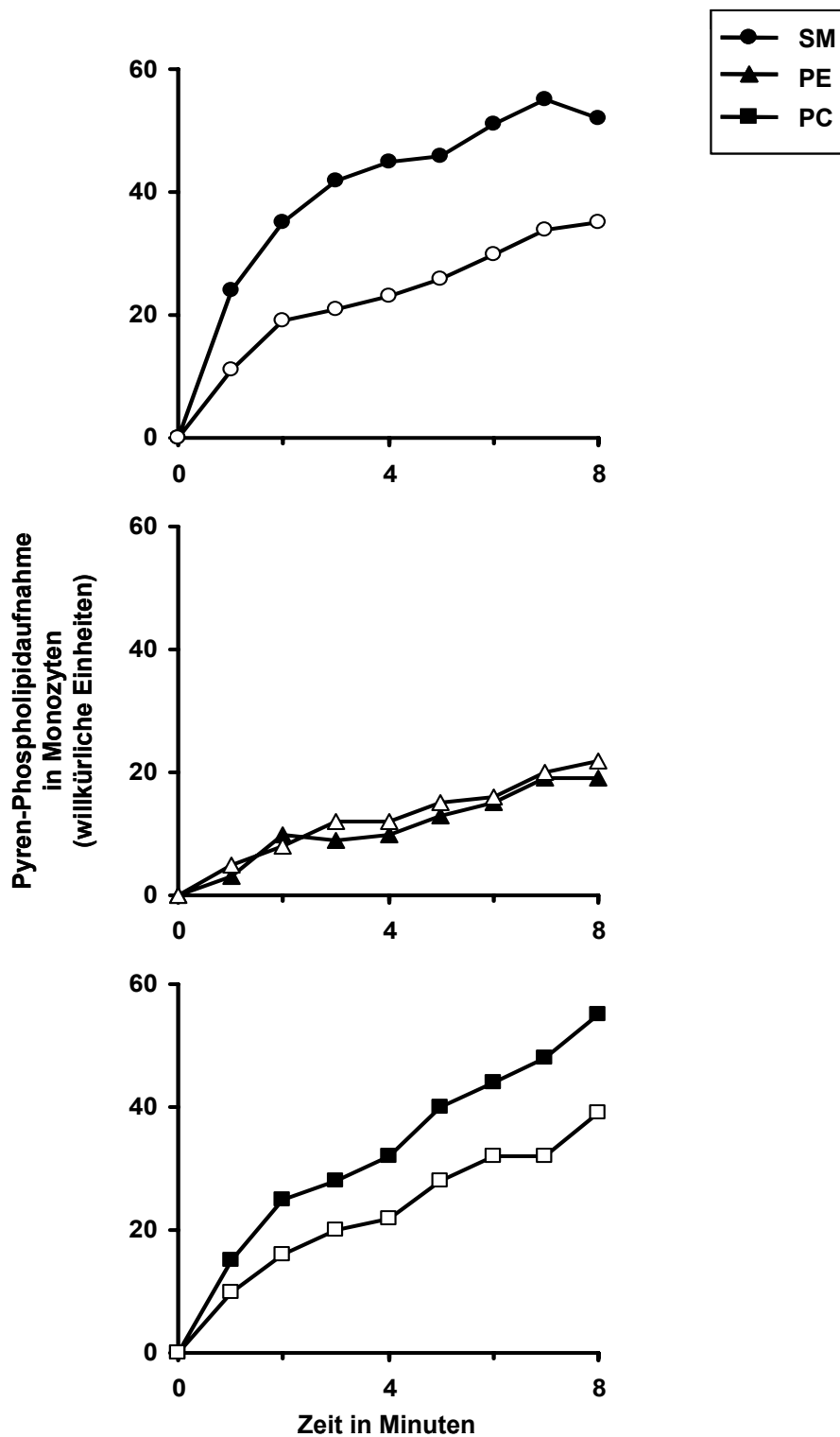


Abb. 3.1: CD36 vermittelt selektiv die Aufnahme der Phospholipide SM und PC
 Die Aufnahme von Pyren-SM und Pyren-PC in Monozyten wird durch den Anti-CD36 Antikörper spezifisch gehemmt, während Pyren-PE davon unbeeinflusst bleibt. Schwarze Symbole, Kontrolle; weiße Symbole, Anti-CD36 Antikörper (10 µg/ml). Mittelwerte (n=4-6)

Auch Sulfo-N-Succinimidyl Oleat (SSO; 0,5 mM), ein spezifischer Inhibitor von CD36 (Harmon und Abumrad, 1993; Coort et al., 2002), hemmte den Import von SM und PC in die Monozyten (Abb. 3.2).

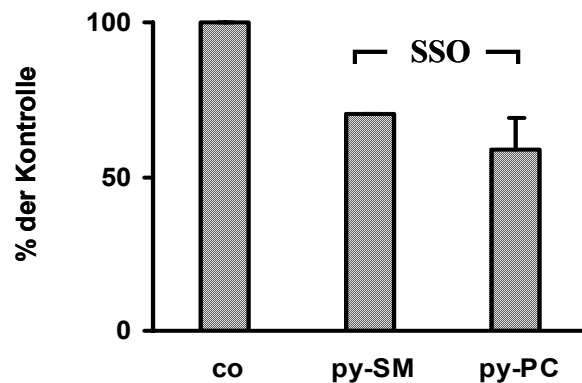


Abb. 3.2: CD36 vermittelt selektiv die Aufnahme der Phospholipide SM und PC. Der spezifische CD36 Inhibitor SSO (0,5 mM) hemmt den Import der Phospholipide SM und PC in Monozyten teilweise. Kontrolle (co). Mittelwerte +/- SA (n=4-6), ohne SA. Balken mind. 4 repräsentative Experimente.

Da Monozyten neben CD36 auch das verwandte Protein SR-BI exprimieren, das als erster und bisher einziger selektiver Phospholipidtransporter identifiziert werden konnte (Urban et al., 2000), wählten wir ein Zellmodell aus, an dem der Einfluss von CD36 selektiv analysiert werden konnte.

Hierfür wurden HeLa Zellen mit der cDNA von humanem CD36 transfiziert (Armesilla et al., 1996). In der Flowcytometrie konnte die erfolgreiche Expression von CD36 auf der Zelloberfläche der transfizierten Zellen dokumentiert werden. In Western Blots wurde CD36 nur in den CD36 transfizierten Zellen detektiert, nicht aber in den Kontrollzellen. Die HeLa Zellen wurden ebenso wie die Monozyten für 8 Minuten mit Pyren-markierten Lipidvesikeln inkubiert und die Lipidaufnahme der CD36 transfizierten Zellen mit derjenigen der Kontrollzellen verglichen. Hierbei nahmen die CD36(+)Zellen deutlich mehr Sphingomyelin und Phosphatidylcholin auf als die Kontrollzellen (Abb. 3.3).

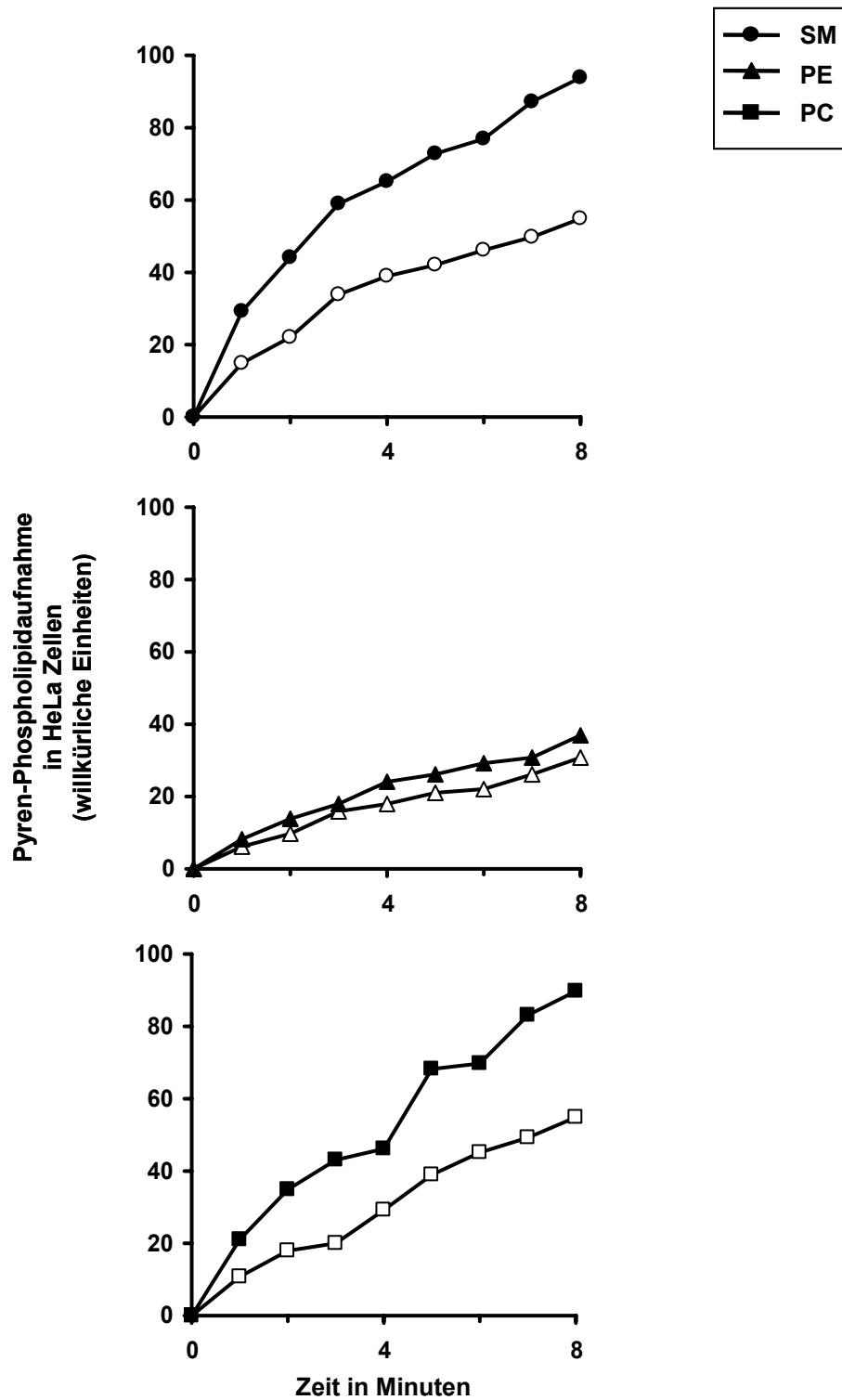


Abb. 3.3: CD36 vermittelt selektiv die Aufnahme der Phospholipide SM und PC
 Der selektive Import von Pyren-SM und Pyren-PC, nicht aber von Pyren-PE, wird durch Transfektion von HeLa Zellen mit der cDNA von humanem CD36 gesteigert. Schwarze Symbole, CD36 transfiziert; weiße Symbole, Kontrollzellen. Mittelwerte (n=4-6)

Bei der Internalisierung des Phosphatidylethanolamins konnte zwischen den beiden Zelltypen jedoch kein Unterschied festgestellt werden.

Nach Zugabe von Lipidvesikeln, die mit Phosphatidylserin (PS) angereichert waren, das eine sehr starke Affinität zu CD36 hat, konnte der zelluläre Import des markierten PC vollständig gehemmt werden (Abb. 3.4). Die Anreicherung der Vesikel mit Cholesterol, das im Vergleich zu PS ein schwächerer CD36 Ligand ist, bewirkte eine teilweise Hemmung der PC Internalisierung.

Weitere Inhibitionsversuche mit bekannten CD36 Liganden zeigten ähnliche Ergebnisse. So konnte die Aufnahme von PC durch die Zugabe von nativem HDL und LDL ebenfalls teilweise reduziert, durch oxidiertes LDL, das wiederum eine starke Affinität zu CD36 hat, sogar komplett inhibiert werden (Abb. 3.4). Unsere Ergebnisse zeigen, dass etablierte CD36 Liganden mit den Cholin-Phospholipiden PC und SM um die Aufnahme in die Zellen kompetieren.

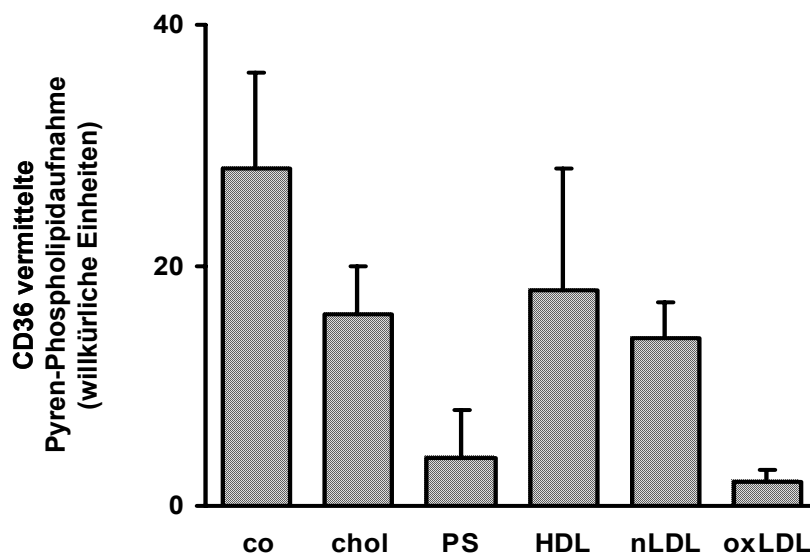


Abb. 3.4: CD36 vermittelt selektiv die Aufnahme der Phospholipide SM und PC. Bekannte CD36 Liganden konkurrieren mit Pyren-PC um den Zell-Import. Der von CD36 abhängige Import wurde als Differenz des Imports von CD36(+)Zellen und Kontrollzellen bestimmt. Chol, unverestertes Cholesterol; PS, Phosphatidylserin; nLDL, oxLDL, natives und oxidiertes LDL; co, Kontrolle. Mittelwerte \pm SA (n=4-6)

3.1.2 CD36 und SR-BI vermitteln den gesamten Phospholipidimport in Monozyten

Nachdem für CD36 gezeigt werden konnte, dass es selektiv die Phospholipide SM und PC aufnehmen kann, untersuchten wir, inwieweit sich die Funktionen von CD36 und SR-BI ergänzen. Zu diesem Zweck wurden wieder humane Monozyten untersucht, die

beide Proteine exprimieren. Bei selektiver Inhibierung von SR-BI durch einen spezifischen Antikörper wurde die Aufnahme von SM, PC und PE um 62%, 70% beziehungsweise 77% reduziert (Abb. 3.5). Die Aufnahme von SM und PC über CD36 wurde durch den selektiven Antikörper um 31% und 32% vermindert. Durch den gleichzeitigen Einsatz der beiden gegen CD36 und SR-BI gerichteten Antikörper wurde die Phospholipidaufnahme nahezu vollständig gehemmt. Am menschlichen Monozyten konnten wir damit erstmals die beteiligten Proteine für den selektiven Import von Phospholipiden in Zellen vollständig charakterisieren.

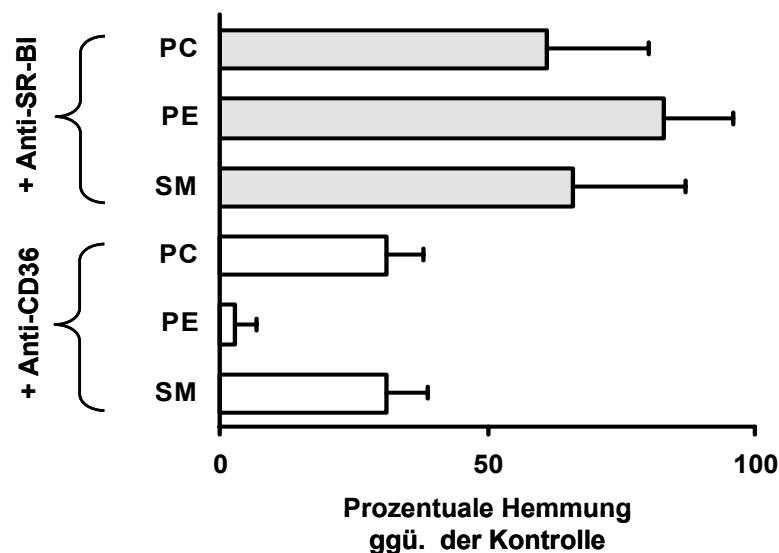


Abb. 3.5: Die selektive PL Aufnahme von SM, PE und PC in Monozyten wird exklusiv über CD36 plus SR-BI vermittelt. Je 10 µg/ml Anti-CD36 und Anti-SR-BI Antikörper wurden Monozytensuspensionen zugefügt und mit den Pyren-markierten Phospholipiden inkubiert. Mittelwerte +/- SA (n=4-6)

3.2 SR-BI vermittelt die Bildung neuer Cholesterol-reicher Domänen

3.2.1 Die DRM-Bausteine SM und Chol werden hauptsächlich über DSM in die Zellen inkorporiert

Um die Verteilung der Phospholipide nach ihrem Transfer in die Zellmembran detaillierter zu studieren, wurden DSM- und DRM-Domänen der Zellen voneinander isoliert.

Nach der Solubilisierung der Zellen mit Hilfe des Detergens Triton X-100 konnten die Detergens-löslichen Bestandteile (DSM) von den Detergens-unlöslichen (DRM) getrennt werden. Dazu wurden auf das Zellsolubilisat Dichtegradienten aus Sucroselösungen aufgeleitet und die Proben anschließend ultrazentrifugiert. Nach dieser Auftrennung wurden 8 Fraktionen abgenommen, wobei in Fraktion 3-5 die Triton X-100 unlöslichen DRM, in Fraktion 6-8 die löslichen DSM zu finden waren. In Western Blots konnte gezeigt werden, dass CD36 in den Monozyten fast ausschließlich in DRM lokalisiert ist (Abb. 3.6). Anders verhielt es sich mit SR-BI, das in Übereinstimmung mit anderen Daten nur zum Teil mit den Mikrodomänen assoziiert ist. Densitometrische Messungen der Western Blot Banden ergaben, dass ungefähr 65% des SR-BI in DSM Fraktionen lokalisiert sind (Abb. 3.6).

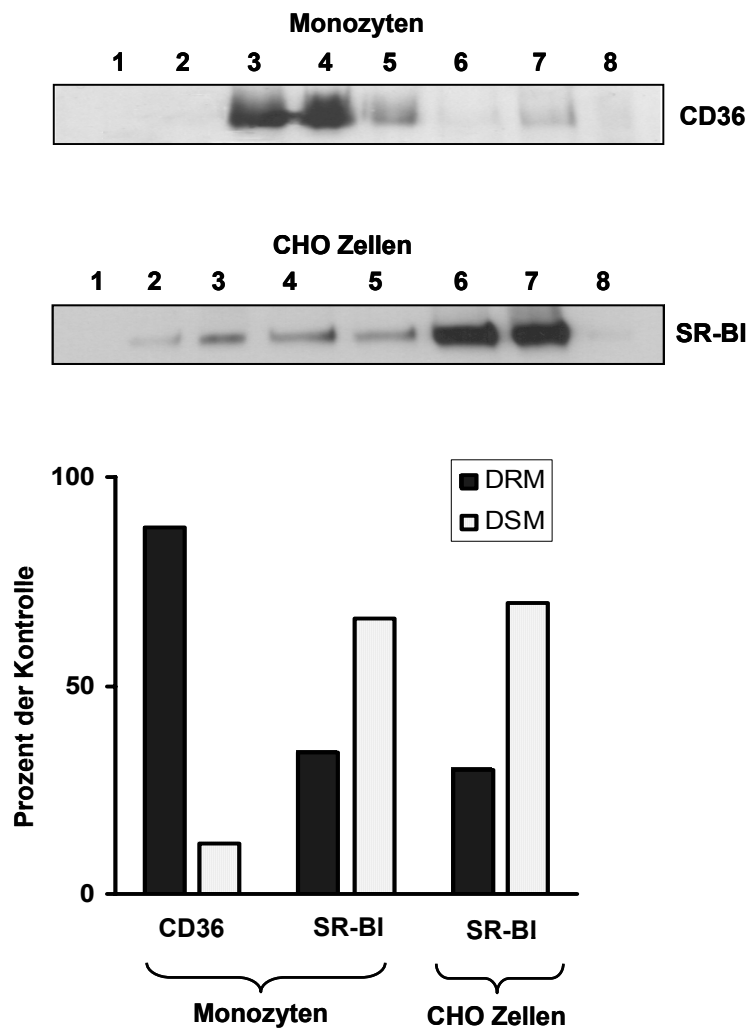


Abb. 3.6: Western Blot Analyse der Verteilung von SR-BI und CD36 zwischen DRM und DSM in Monozyten und CHO Zellen
 Während CD36 fast ausschließlich in DRM lokalisiert ist (Fraktionen 3-5), findet sich der größere Teil des SR-BI in DSM (Fraktionen 6-8). Die untere Abbildung entspricht der densitometrischen Auswertung der Western Blots. Auswertung von je zwei repräsentativen Western Blots

Bei Bindungsexperimenten zeigte sich, dass der Großteil der Lipidvesikel an die DSM-Fraktionen gebunden war. Hierzu wurden die Monozyten für verschiedene Zeitintervalle bis zu 30 Minuten mit den radioaktiv markierten Lipidvesikeln bei 3°C inkubiert und nach Entfernung ungebundener Vesikel und Isolation der DRM die Radioaktivität in den Fraktionen bestimmt. In den ersten 5 Minuten zeigte sich ein steiler Anstieg der zellassoziierten Vesikelbindung, die dann in den folgenden 25 Minuten nur noch minimal zunahm. Etwa sechsfach mehr Vesikel interagierten mit den DSM im Vergleich zur Bindung an die DRM (Abb. 3.7).

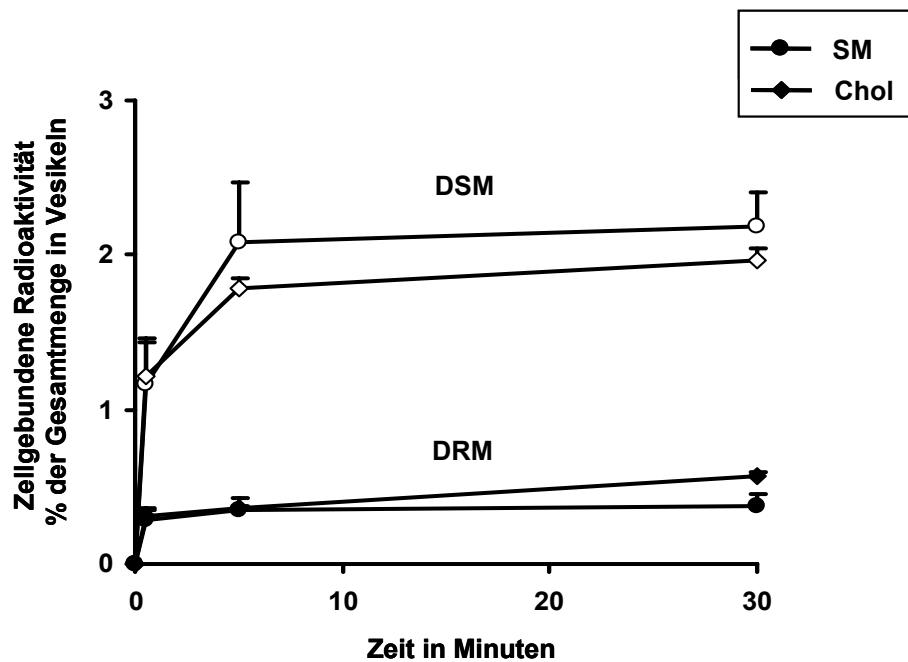


Abb. 3.7: Lipidvesikel binden vor allem an DSM-Domänen der PM. Monozyten wurden bei 4°C mit Lipidvesikeln inkubiert, die ^{14}C -SM bzw. ^3H -Cholesterol enthielten. Die Sättigung der Bindung ist bereits nach 5 Minuten erreicht. Mittelwerte \pm SA (n=3-5)

Wurde bei 37°C der aktive Lipidimport ermöglicht, beobachteten wir nach 5 Minuten und 30 Minuten ^{14}C -markiertes SM und PE in den DRM Fraktionen. Dabei wurde in den ersten 5 Minuten dreimal mehr SM als PE in den DRM detektiert. Der weitaus größere Teil beider Lipide wurde jedoch in die DSM transferiert. Während SM und PE in vergleichbarer Menge in DSM erschienen, wurde wesentlich mehr SM in DRM gefunden (Abb. 3.8).

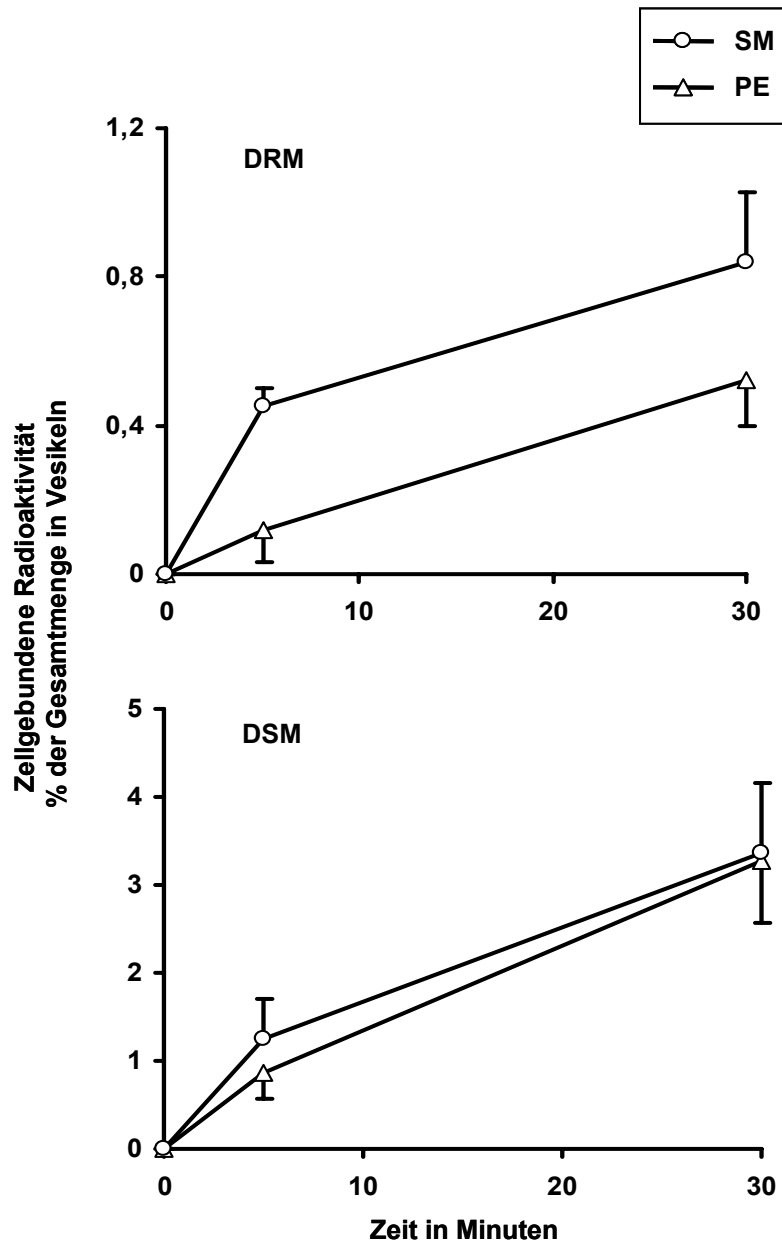


Abb. 3.8: Zeitabhängige Lipidaufnahme in Monozyten
 Monozyten wurden bei 37°C mit Lipidvesikeln inkubiert, die entweder ¹⁴C-SM oder ¹⁴C-PE enthielten. Im Gegensatz zu PE wird SM schneller zu den DRM Domänen geleitet. Anders als bei reiner Vesikelbindung bei 4°C, wird bei der 37°C Internalisierung keine Sättigung zwischen 5 und 30 Minuten erreicht.
 Mittelwerte +/- SA (n=3-5)

Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 37°C waren Cholesterol und SM anders zwischen den DSM und den DRM verteilt, als bei der Vesikelbindung bei 3°C. Der DRM-assoziierte Teil von SM und Chol war nach sekundärer Inkorporierung fast doppelt so hoch wie der durch die Vesikelbindung ermittelte (Abb. 3.9). Anders dagegen bei PE: Hier wichen die Quotienten von DSM / DRM bei Bindung und Internalisierung kaum voneinander ab (Abb. 3.9).

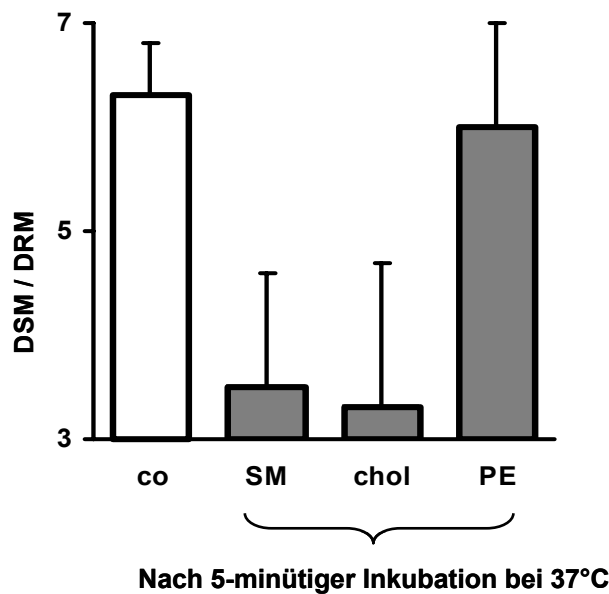


Abb. 3.9: DSM zu DRM Verteilung von neu aufgenommenen Lipiden. Monozyten wurden für 5 min mit den radioaktiv markierten Lipidvesikeln bei 37°C inkubiert und anschließend die zellassoziierte Radioaktivität in DRM und DSM bestimmt. Kontrolle (co). Mittelwerte +/- SA (n=3-5)

In die Zellen aufgenommenes SM und Chol wurde bereits nach kurzer Zeit in DRM-Domänen transloziert, während bei PE kein gesteigerter Einbau in die DRM festzustellen war. Durch die Zugabe von Antikörpern gegen SR-BI (10 µg/ml) konnte die Translokation von SM und Chol in die DRM um 85% vermindert werden (Abb. 3.10). Die Anti-CD36-Antikörper (10 µg/ml) waren weniger effektiv (20-25%), obwohl CD36 in Western Blots fast ausschließlich in den DRM-Domänen gefunden wurde. Darüber hinaus hemmte der Anti-SR-BI Antikörper auch die Aufnahme von SM und Chol in die DSM-Kompartimente.

Insgesamt konnte das DRM-Targeting durch Zugabe beider Antikörper vollständig gehemmt werden. Auch die Aufnahme von SM und PC in die Detergens-sensiblen Areale wurde um 95% und 75% vermindert (Abb. 3.10).

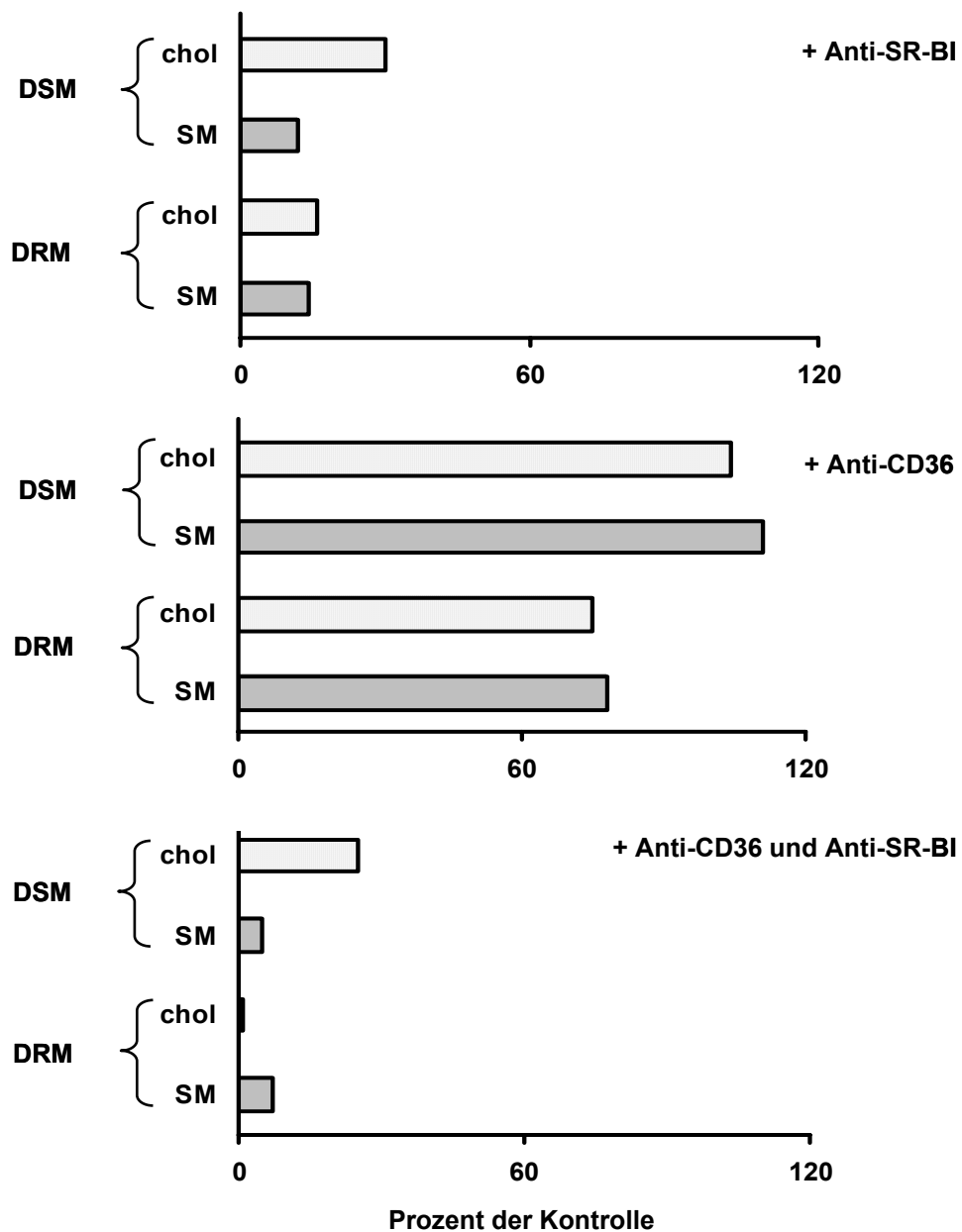


Abb. 3.10: Die Assoziation von ^{14}C -SM und ^3H -Chol zu DRM und DSM in Monozyten wird durch die Anti-CD36 und Anti-SR-BI Antikörper ($10 \mu\text{g/ml}$) gehemmt. Mindestens je 2 repräsentative Experimente

Der direkte Transfer von SM und Chol in die DSM Domänen wurde also ausschließlich über SR-BI vermittelt. Die direkte Aufnahme in die DRM dagegen erfolgte konzentriert über SR-BI und CD36.

Diese Fähigkeit des SR-BI die Hauptbausteine der DRM über DSM in die Zellen zu schleusen, bestätigt frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Urban et al., 2000). Zusammengenommen zeigen diese Befunde, dass der weitaus größte Teil von SM über

SR-BI Moleküle in die Zelle aufgenommen wird, die in den DSM Domänen lokalisiert sind.

3.2.2 Unterschiedliche Verteilung von neu inkorporiertem SM und PE in Membrandomänen

Unser nächstes Ziel war es, eine mögliche Umverteilung der neu in die Plasmamembran inkorporierten Lipide zu charakterisieren. Hierfür wurden Monozyten für 90 Sekunden mit radioaktiv markierten Phospholipiden und Cholesterol inkubiert und danach die extrazellulär gebundenen Anteile gewaschen (Pulse). Im Anschluss daran wurden die Zellen bei 37°C für verschiedene Zeitintervalle während einer Chase-Periode inkubiert. Dabei beobachteten wir für das ^{14}C -markierte SM und das ^3H -markierte Chol zeitabhängig eine Umverteilung von DSM in DRM. Genau entgegengesetzt verhielt sich ^{14}C -markiertes PE, das von DRM zu DSM transloziert wurde (Abb. 3.11). Unsere Daten zeigen also, dass die DRM-Bausteine SM und Chol zuerst in DSM Domänen transferiert, später jedoch zunehmend in DRM angereichert werden.

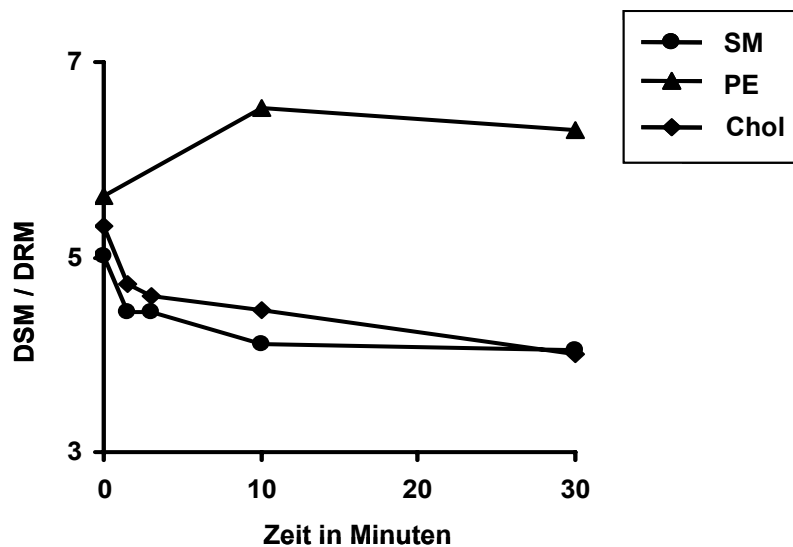


Abb. 3.11: Umverteilung der neu internalisierten Lipide zwischen DRM und DSM
 Monozyten wurden zuerst für 90 Sekunden bei 37°C mit ^{14}C -SM, ^3H -Chol und ^{14}C -PE beladen und die radioaktiven Vesikel danach gewaschen. Zeitabhängig wurde anschließend die Umverteilung der neu inkorporierten Lipide zwischen DRM und DSM verfolgt. Mindestens je 2 repräsentative Experimente

3.2.3 Internalisierung von SM

Zur morphologischen Darstellung der Lipidaufnahme und der dynamischen Verteilung in Membrandomänen von Monozyten, wurden mit Fluorophoren (NBD) markierte Phospholipide eingesetzt und mit einem konfokalen Mikroskop visualisiert. Nach Inkubation mit NBD-SM bei 4°C war die Fluoreszenz ausschließlich membranassoziiert. Eine sich dann anschließende kurze Inkubation (3 Minuten) bei 37°C führte zu einer Anreicherung der Phospholipide unterhalb der Plasmamembran. Nach 10-15 Minuten erreichte das NBD-SM perinukleäre Kompartimente. Im Vergleich zu NBD-SM war die Zellmembran nach Inkubation mit NBD-PE bei 4°C schwächer angefärbt und blieb auch nach längerer Inkubation bei 37°C vorwiegend auf die Plasmamembran beschränkt (Abb. 3.12).

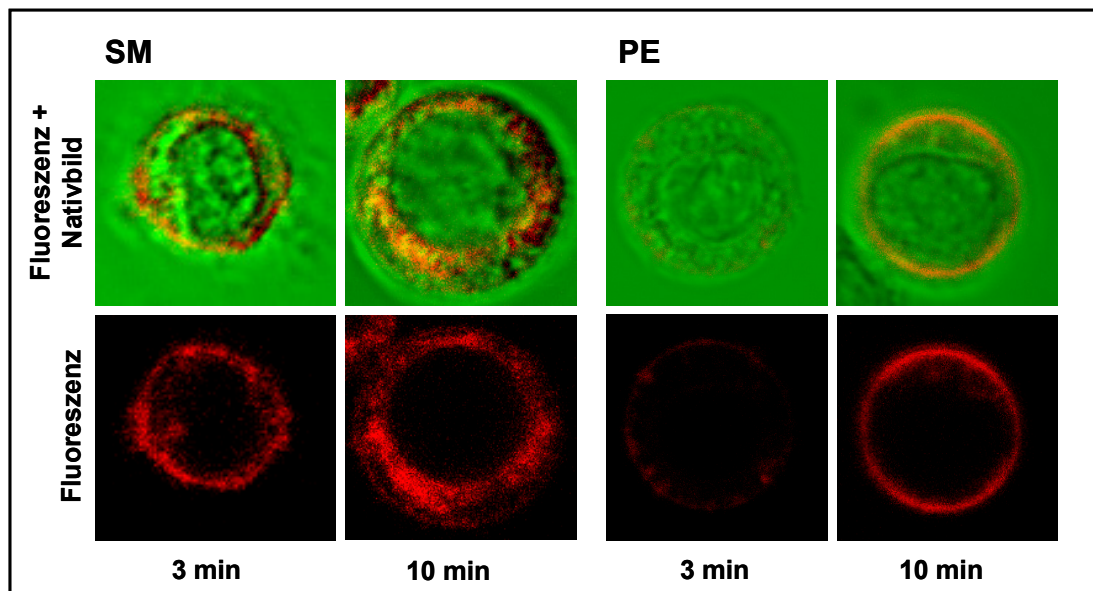


Abb. 3.12: Während die Aufnahme von NBD-PE vor allem auf die PM beschränkt bleibt, wird NBD-SM nach intrazellulär transportiert und verteilt sich im gesamten Zytoplasma. Monozyten nehmen bei gleicher Inkubation deutlich mehr NBD-SM als NBD-PE auf. SM wird dabei innerhalb von 10 Minuten in beträchtlichen Mengen nach intrazellulär transportiert, während PE weitgehend auf die Plasmamembran beschränkt bleibt. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubation bei 37°C.

Bei einer Inkubation der Monozyten mit den NBD-markierten Phospholipiden und Alexa 594-markiertem Cholera Toxin subunit B (CTxB), einem Marker für Sphingolipid- und Cholesterol-reiche Domänen, kam es mit SM sowohl in der Plasmamembran, als auch intrazellulär zu einer deutlichen Doppelfärbung (Abb. 3.13).

Das intrazelluläre Erscheinen des neu aufgenommenen NBD-SM legte erstmals die Vermutung nahe, dass die Translokation von DSM zu DRM Domänen an einen endozytotischen Prozess gekoppelt sein könnte.

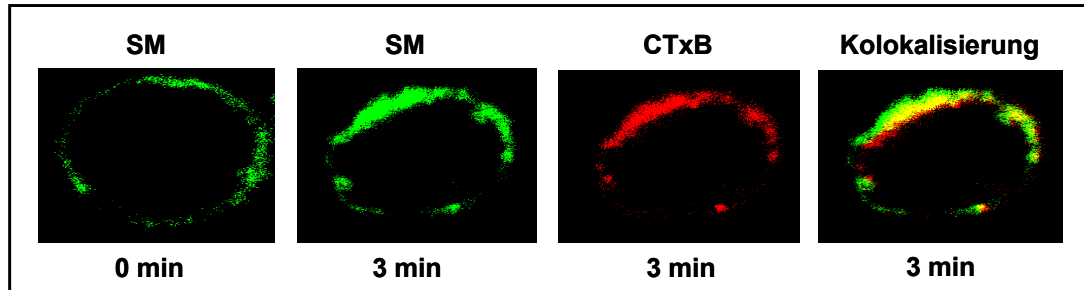


Abb. 3.13: Neu aufgenommenes NBD-SM in Monozyten erscheint in endosomalen Strukturen unterhalb der PM, wo es mit Alexa-594 markiertem CTxB kolokalisiert. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubation bei 37°C. SM (grün), CTxB (rot), Kolokalisierung (gelb)

3.2.4 SM und Chol werden ATP-abhängig internalisiert

Um die Endozytose zu unterbrechen, wurden die Monozyten als nächstes ATP-entleert. Tatsächlich wurde dadurch der Transfer von ^{14}C -SM und ^3H -Chol in die DRM gehemmt (Abb. 3.14). Es handelte sich also bei der Umverteilung von SM und Chol zwischen DSM und DRM um einen ATP-abhängigen und damit Energie verbrauchenden Vorgang.

Da die markierten Lipide offensichtlich auf endozytotischem Wege von DSM zu DRM gelangten und dabei zuerst in den DSM erschienen, konnten wir die Beteiligung einer DRM-abhängigen Endozytose weitgehend ausschließen. Eine Vermittlung der Endozytose über Clathrin-coated Pits, die klassischerweise von DSM ausgeht, schien daher wahrscheinlicher. Um dies zu untersuchen, wurden spezifische Inhibitoren der Clathrin-vermittelten Endozytose eingesetzt. Nach Hemmung dieser Eintrittspforte mittels Chlorpromazin (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) konnte SM nicht mehr von DSM zu DRM transferiert werden. Die Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose durch die Aufnahme der Zellen in Medien mit hohem Sucrose Anteil (0,3 M) verhinderte ebenfalls die Translokation von SM in die DRM (Abb. 3.14).

Ebenso wurde der Transfer des neu inkorporierten Cholesterol in die DRM durch Chlorpromazin und die Sucrose-Lösung unterbrochen.

Aufgrund der ATP-Abhängigkeit des Lipidaustausches zwischen den Membran-domänen war auch eine Vermittlung durch ABC-Transporter denkbar. Da jedoch die ABC-Transporter Inhibitoren Verapamil (50 μM) und Glybenclamid (200 μM) keinerlei hemmenden Einfluss auf den SM und Chol Transfer von DSM zu DRM hatten, konnte ihre Beteiligung ausgeschlossen werden (Abb. 3.14). Der ATP-abhängige Übergang der Lipide SM und Chol von DSM zu DRM wird demzufolge über endozytotische Prozesse über Clathrin coated Pits vermittelt, wohingegen ABC Transporter keine Rollen spielen.

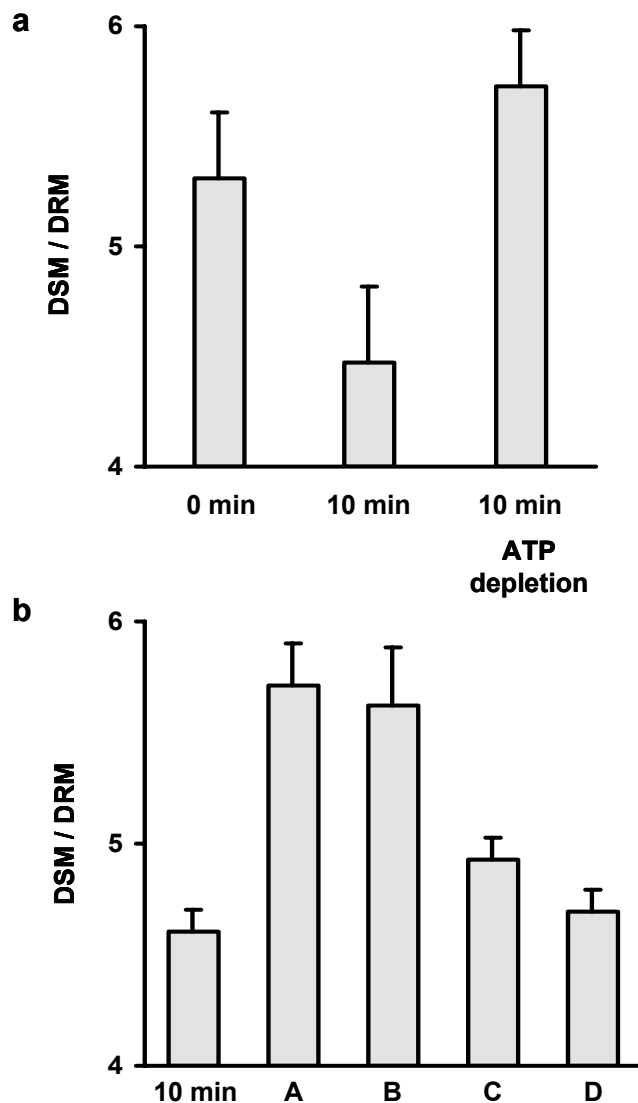


Abb. 3.14: a.) Primär in DSM inkorporiertes ^{14}C -SM und ^3H -Chol wird zeitabhängig in DRM transferiert. Diese Umverteilung (hier dargestellt für SM) wird durch ATP-Entleerung der Zellen gehemmt. b.) Die Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose durch Chlorpromazin (A) und konzentrierte Sucrose Lösung (B) reduziert das DRM-Targeting ebenfalls. Die funktionelle Hemmung von ABC Transportern durch Glybenclamid (C) und Verapamil (D) hat dagegen keinen hemmenden Einfluss. Mittelwerte \pm SA (n=4)

3.2.5 SR-BI als Mediator der Endozytose von SM und Chol

Um die Rolle des Transmembranproteins SR-BI beim endozytotischen Transfer der neu inkorporierten Lipide genauer zu untersuchen, verwendeten wir CHO Zellen, die mit humanem SR-BI stabil transfiziert waren (Scarselli et al., 2002). In Western Blot Analysen fanden wir, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei Monozyten, dass $\frac{2}{3}$ des SR-BI in den DSM und ungefähr $\frac{1}{3}$ in den DRM-Fractionen lokalisiert war (Abb. 3.6).

Bei Analysen der subzellulären Verteilung von SR-BI in der Immun-elektronenmikroskopie zeigte sich, dass das Protein vor allem mit der Plasmamembran (PM) assoziiert ist und dort besonders in Zellfortsätzen. Zusätzlich wurde SR-BI auch submembranös in tubulo-vesikulären Strukturen detektiert (Abb. 3.15).

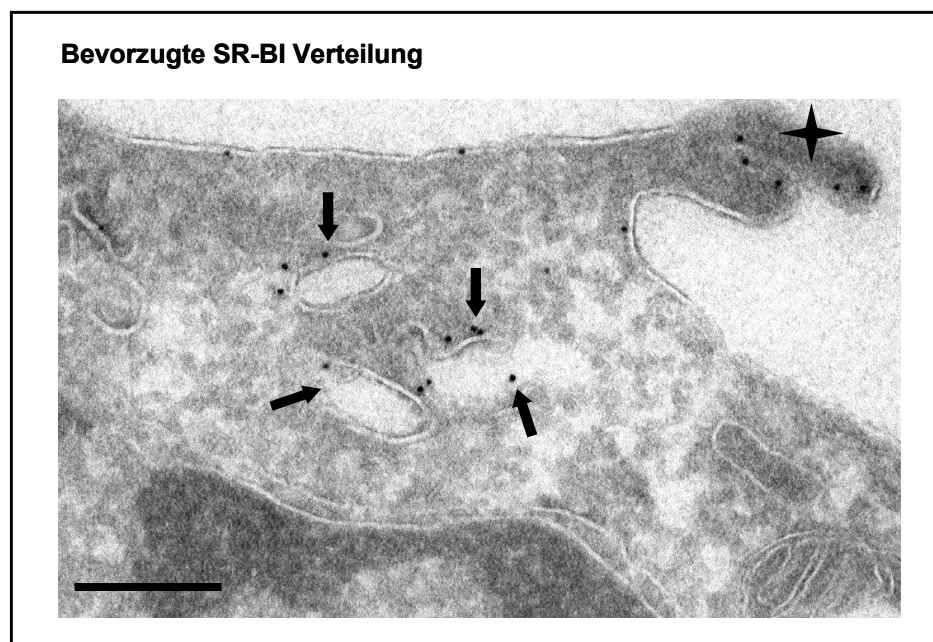


Abb. 3.15: Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass SR-BI vor allem in Protrusionen der PM (Stern) und in tubulo-vesikulären Kompartimenten (Pfeile) unterhalb der PM lokalisiert ist. (Balken 200 nm)

Die Schlüsselrolle des SR-BI als Motor für die Internalisierung von Lipiden konnte auch im konfokalen Mikroskop deutlich demonstriert werden. Die Aufnahme von NBD-SM in die SR-BI transfizierten Zellen wurde mit derjenigen der Kontrollzellen verglichen. Innerhalb von 10 Minuten zeigte sich bei den SR-BI(+)-Zellen eine deutliche Färbung submembranöser Areale bis hin zum Zellkern, wohingegen die Färbung der

Kontrollzellen wesentlich schwächer und mehr auf die Plasmamembran beschränkt ausfiel. Auffällig war außerdem die Anfärbung größerer punktförmiger Strukturen im submembranösen Bereich in den SR-BI(+)-Zellen (Abb. 3.16).

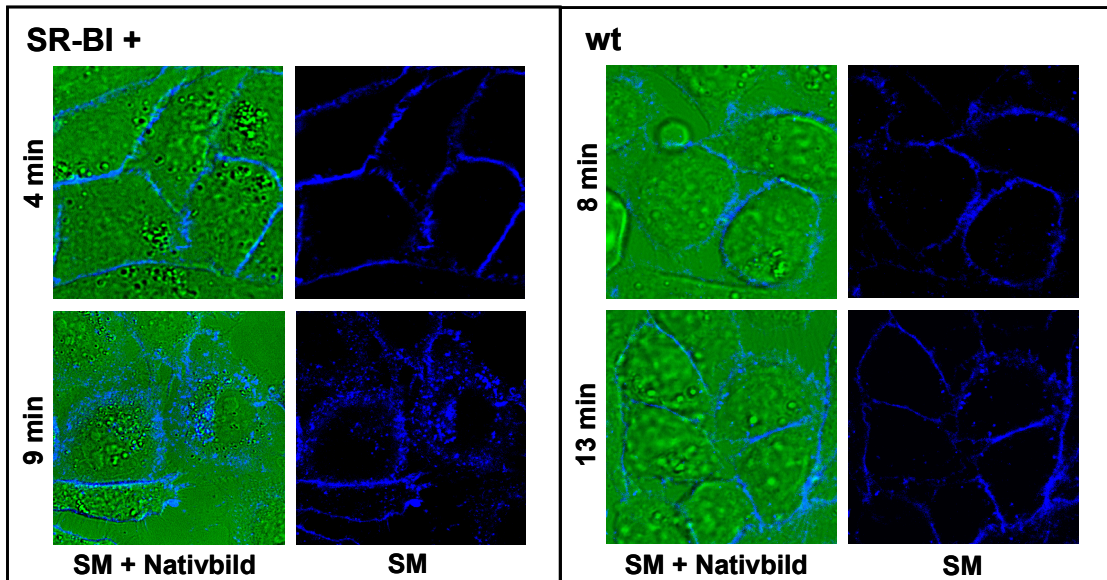


Abb. 3.16: SR-BI vermittelt die Aufnahme und den nachfolgenden Transport von SM in intrazelluläre DRM.
SR-BI(+) und Kontrollzellen (wt) wurden bei 8°C mit NBD-SM beladen und daraufhin für die angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert. Nur bei den SRBI(+)-Zellen wurde das SM internalisiert, während es bei den Kontrollzellen vorwiegend auf die PM beschränkt blieb.

In den SR-BI transfizierten Zellen kam es auch zur Anreicherung des DRM Markers CTxB in submembranösen Strukturen. Bei einer Doppelfärbung wurde in diesen Strukturen eine deutliche Kollokalisierung von CTxB und SM beobachtet (Abb. 3.17).

Die Transfektion der CHO Zellen mit SR-BI bewirkt folglich eine deutlich erhöhte Internalisierung des neu in die Zellmembran aufgenommenen SM. Dadurch könnten SR-BI vermittelt SM / Chol-reiche Domänen gebildet werden, die durch Färbung mit CTxB nachweisbar waren.

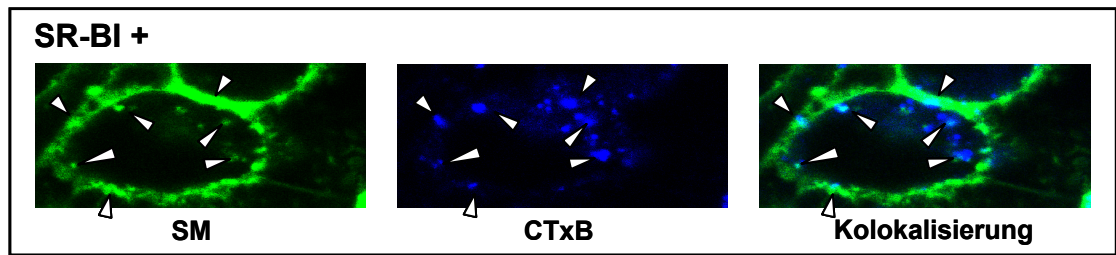


Abb. 3.17: SR-BI vermittelt die Aufnahme und den nachfolgenden Transport von SM in intrazelluläre DRM. NBD-SM und Alexa 594-CTxB kolokalisieren SR-BI vermittelt in endosomalen DRM. Überlappung von SM (grün) und CTxB (blau) in der Plasmamembran und in submembranösen Endosomen. 3-minütige Inkubation bei 37°C.

Weitere morphologische Untersuchungen wurden im Elektronenmikroskop durchgeführt. Zur genaueren Analyse der Lokalisation der Mikrodomänen auf submikroskopischer Ebene wurden die Zellen mit Perfringolysin O (BC θ , 15 μ g/ml) für 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Perfringolysin bindet selektiv an Cluster von freiem Cholesterin und ist als Marker für Cholesterin-reiche Domänen etabliert (Waheed et al., 2001; Heijnen et al., 2003). Sowohl bei den Kontroll-, als auch bei den SR-BI-transfizierten Zellen konnte eine vermehrte Bindung von Perfringolysin an Filopodien der Zelloberfläche beobachtet werden. Die Intensität der Markierung der Zellfortsätze war bei den SR-BI-transfizierten Zellen jedoch deutlich stärker als bei den Kontrollzellen (Abb. 3.18).

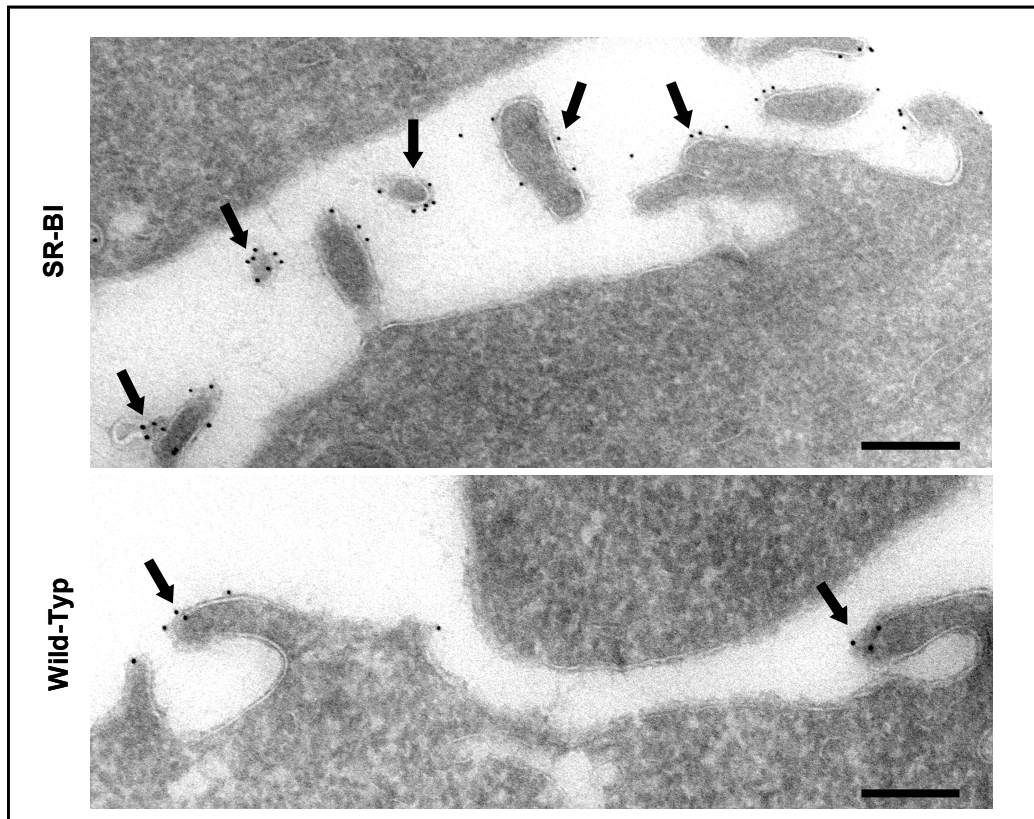


Abb. 3.18: Nachweis von Chol-reichen Domänen (DRM) in der PM
 Kontrollzellen (Wild-Typ) und SR-BI(+)Zellen wurden bei 4°C mit BC Θ inkubiert um DRM im Elektronenmikroskop detektieren zu können. Der Marker für Chol-reiche Domänen erschien vor allem in filopodienartigen Zellprotrusionen beider Zellen. Dabei färbten sich die SR-BI(+)Zellen wesentlich stärker an als die Kontrollzellen. Die Identifizierung der Filopodien erfolgte durch Inspektion zahlreicher Ultradünnschnitte. (Balken 200 nm)

Um selektiv Early Endosomes (ERC und SE) anzufärben, wurden die Zellen für 10 Minuten bei 37°C mit Perfringolysin inkubiert und anschließend der nicht internalisierte Anteil gewaschen. Bei den SR-BI(+)Zellen fand man deutlich gefärbte submembranöse Areale, während die intrazelluläre BC Θ -Färbung in den Kontrollzellen wesentlich schwächer ausfiel. Bei zusätzlicher Markierung mit Anti-Clathrin Antikörpern ergab sich außerdem für die SR-BI(+)Zellen eine Kolo-kalisierung mit BC Θ in frühen Endosomen (Abb. 3.19). Dies bestätigte unsere Beobachtungen im konfokalen Mikroskop, die ebenfalls eine Beteiligung der Clathrin-vermittelten Endozytose am selektiven Lipidimport zeigten.

Um zu untersuchen, inwieweit SR-BI bei diesem Internalisierungsprozess ebenfalls endozytiert wird, oder sich seine Funktion nur auf die Plasmamembran beschränkt, wurden die SR-BI(+)Zellen mit Perfringolysin und markierten Anti-SR-BI Antikörpern

inkubiert. Dabei kam es zu einer deutlichen Kolokalisierung der beiden Marker in Early Endosomes (Abb. 3.19). SR-BI wird demnach zusammen mit Cholesterol-reichen Domänen nach intrazellulär transportiert.

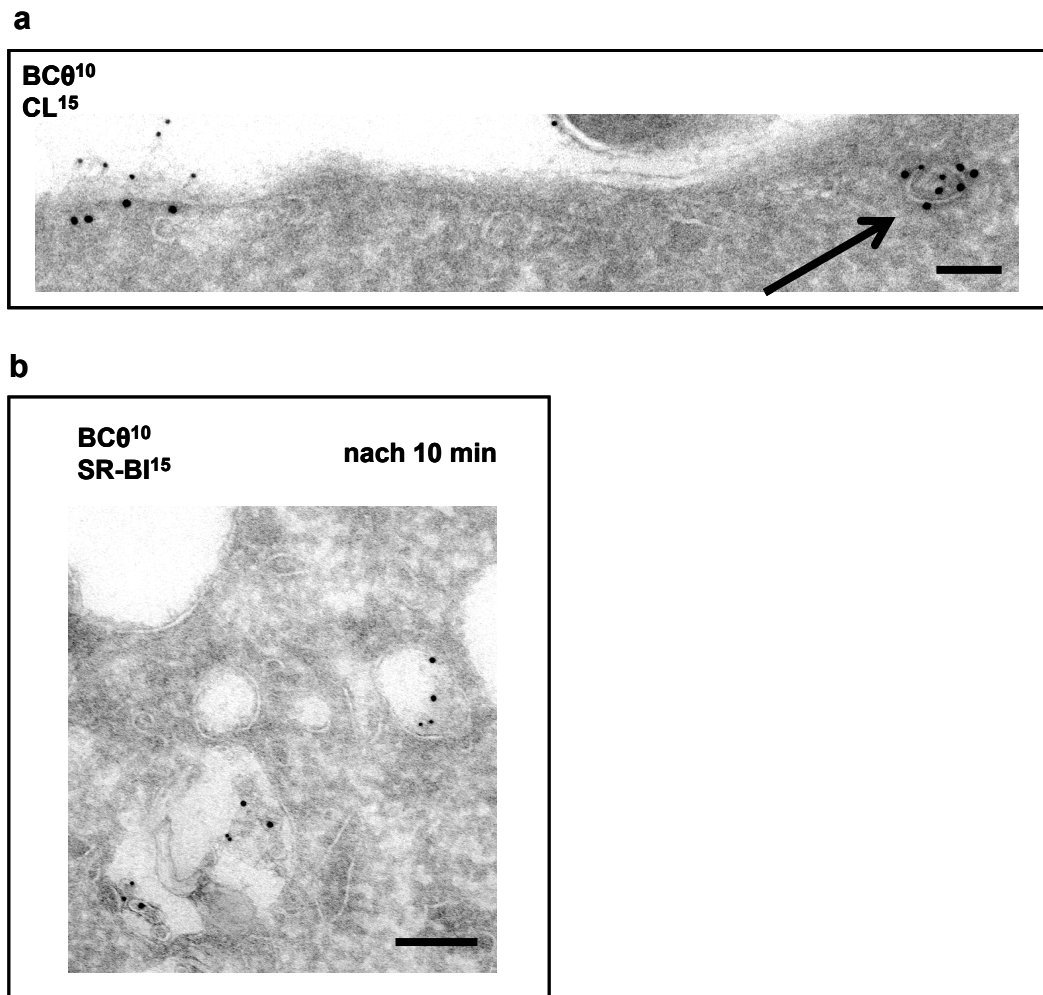


Abb. 3.19: a.) Kolokalisierung von Clathrin (CL; 15 nm Gold Partikel) und Chol-reichen Domänen (DRM) (BC θ ; 10 nm Gold Partikel) in submembranösen Vesikeln (Pfeil). (Balken 100 nm)
 b.) SR-BI wird gemeinsam mit Chol-reichen Domänen (DRM) endozytiert. SR-BI (15 nm Gold Partikel) und BC θ (10 nm Gold Partikel) kolokalisieren in frühen endosomalen Strukturen. SR-BI(+)-Zellen wurden für 10 Minuten bei 37°C mit BC θ inkubiert. (Balken 200 nm)

3.2.6 Die Endozytose von SR-BI / Lipid-Komplexen ist Clathrin-vermittelt

Zur genaueren Spezifizierung der submembranösen vesikulären Strukturen, in denen offensichtlich SR-BI abhängig DRM entstehen, wurden Doppelfärbungen mit CTxB und EEA-1 durchgeführt. EEA-1 ist ein spezifischer Marker für Early Endosomes

(Stenmark et al., 1996). Tatsächlich zeigte sich im konfokalen Mikroskop eine Kolokalisierung von CTxB und EEA-1 in den SR-BI transfizierten Zellen, wodurch die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie bestätigt wurden (Abb. 3.20).

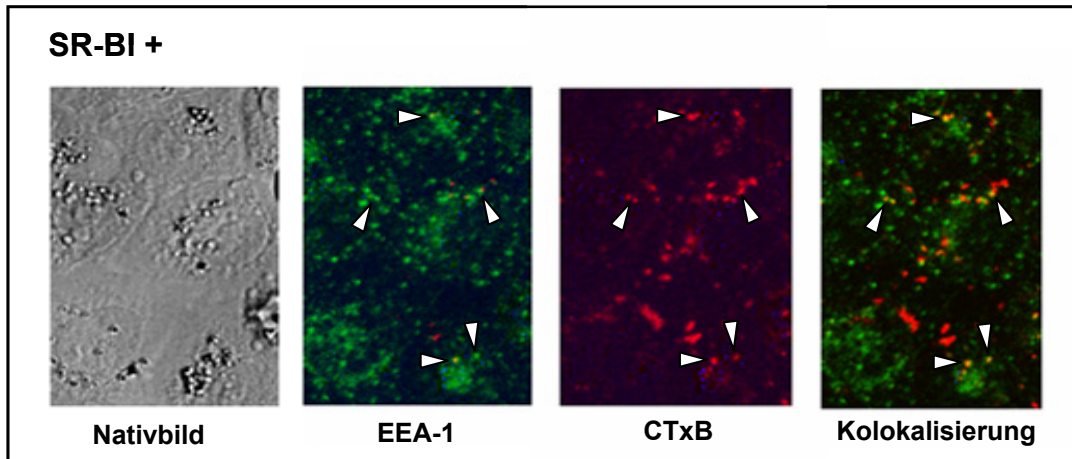


Abb. 3.20: SR-BI vermittelte Generierung von DRM in Early Endosomes. Alexa 594-CTxB (rot) findet sich in Alexa 488-markiertem EEA1 (grün) positiven Vesikeln. Kolokalisierung gelb (Pfeile).

Zur Markierung dieser frühen Endosomen, die typischerweise Clathrin-vermittelt zu einer Anreicherung von Transferrin-Rezeptor Komplexen führen, wurde fluoreszierendes Transferrin (Tf) eingesetzt. Die Zellen wurden hierbei zuerst für 15 Minuten bei 37°C mit Tf und dann zusätzlich für 10 Minuten bei 37°C mit CTxB und für 3 Minuten bei 8°C mit NBD-SM inkubiert. Dadurch erreichte man, dass das Transferrin in submembranösen Vesikeln gefunden wurde, bei denen es sich vor allem um Early Endosomes handelte, was ihre Anfärbung mit EEA-1 zeigte. In diesen frühen endosomalen Kompartimenten zeigte sich eine deutliche Dreifachfärbung mit NBD-SM, CTxB und Tf (Abb. 3.21).

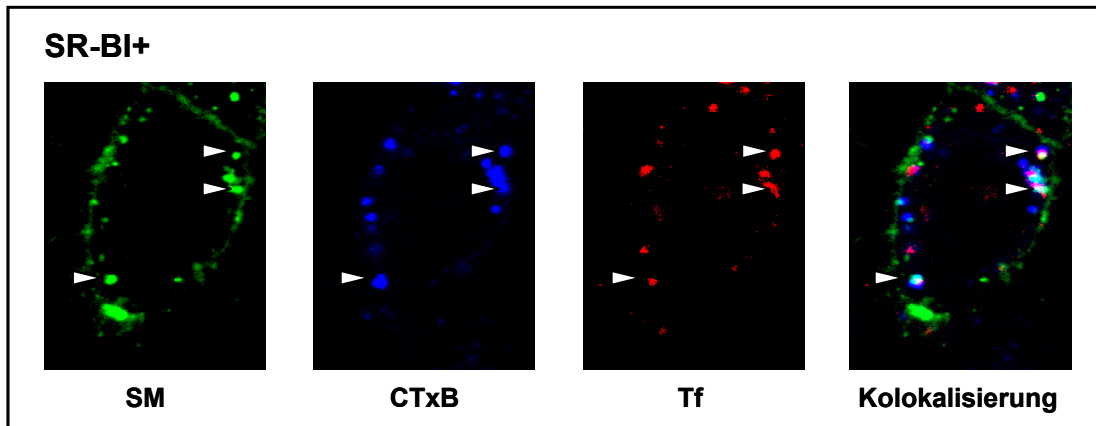


Abb. 3.21: SR-BI vermittelte Generierung von DRM in Early Endosomes. Kokolisierung von neu internalisiertem NBD-SM mit Alexa 594-CTxB, sowie Alexa 633-Tf markierten Early Endosomes. Dreifachfärbung weiß.

Um die Rolle der Clathrin-vermittelten Endozytose weiter zu dokumentieren, wurden die Zellen mit einer Variante des Clathrin-accessory Protein AP180 (AP180-C) transfiziert, welches diesen Endozytoseweg unterbricht (Ford et al., 2001). In den SR-BI(+)Zellen fanden wir, dass die submembranöse Färbung nach AP180-C Transfektion nahezu vollständig aufgehoben wurde. Bei den Kontrollzellen hatte die Transfektion dagegen keinen hemmenden Einfluss auf die ohnehin schwächere intrazelluläre CTxB Färbung. Weiterhin beobachteten wir, dass die nach AP180-C Transfektion verbleibende CTxB Färbung der SR-BI(+)Zellen in ihrem Muster derjenigen der Kontrollzellen mit und ohne AP180-C gleich (Abb. 3.22).

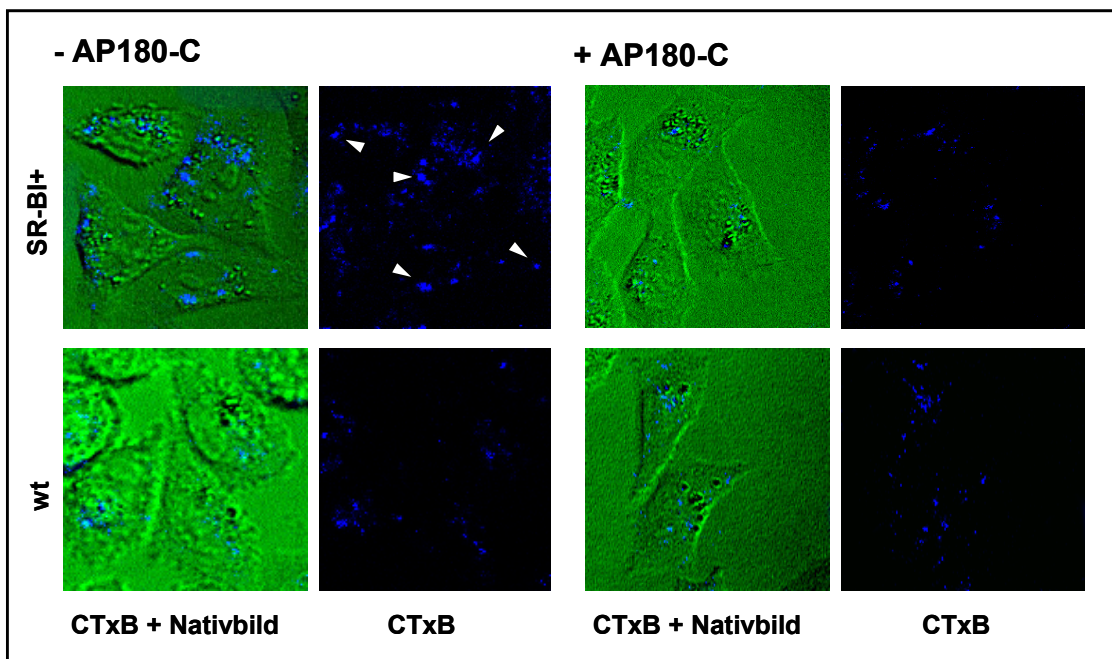


Abb. 3.22: Die SR-BI vermittelte Generierung von Chol-reichen Domänen in Early Endosomes ist Clathrin-vermittelt. Durch spezifische Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose nach Transfektion der Zellen mit AP180-C wird die CTxB-Färbung deutlich reduziert. In den Kontrollzellen bleibt das Färbungsmuster unverändert.

Diese morphologischen Beobachtungen konnten durch Versuche mit radioaktivem ^3H -Chol bestätigt werden. Hierbei wurden ebenfalls SR-BI(+) und Kontrollzellen mit und ohne AP180-C Transfektion verglichen. Nach einer 90 Sekunden Beladung der Zellen mit ^3H -Chol wurde die Umverteilung des internalisierten Chol zwischen DSM und DRM analysiert (10 Minuten). Bei den SR-BI(+)Zellen kam es hierbei zu einer Umverteilung des ^3H -Chol von DSM zu DRM in ähnlicher Weise, wie zuvor bei den Monozyten beobachtet. Im Gegensatz dazu kam es bei den Kontrollzellen zu einer geringen Zunahme des Chol in den DSM. Wurden die SR-BI(+)Zellen jedoch zusätzlich mit AP180-C transfiziert, konnte die Umverteilung des Chol von DSM zu DRM komplett inhibiert werden (Abb. 3.23).

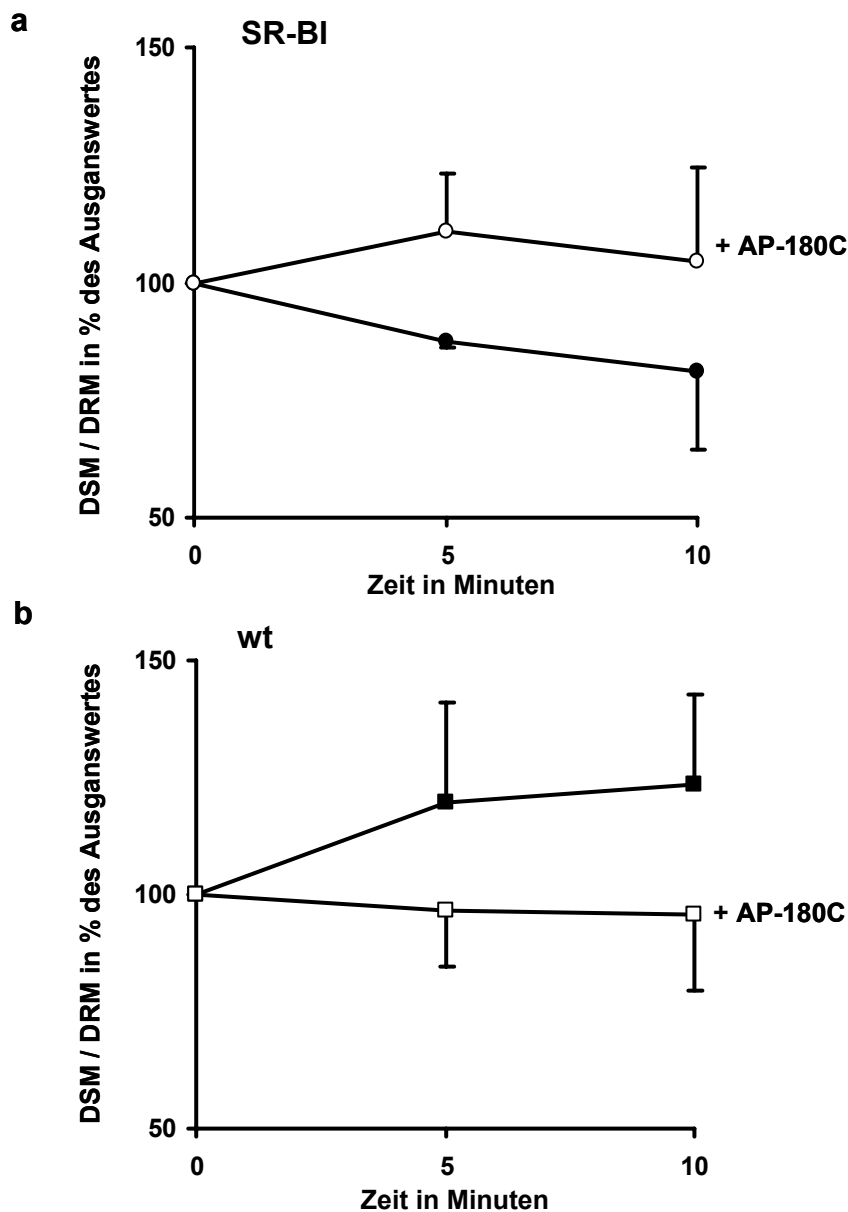


Abb. 3.23: a.) Nach einer Pulsephase (90s) mit radioaktivem Chol wird die Verteilung des Chol zwischen DRM und DSM bei Wild-Typ und SR-BI(+)Zellen mit und ohne AP-180-C Transfektion verglichen. Bei den SR-BI(+)Zellen kommt es zu einer Umverteilung des Chol von DSM zu DRM, die durch die AP180-C Transfektion komplett inhibiert wird. b.) Bei den wt Zellen dagegen ergibt sich initial eine geringe Chol Zunahme in den DSM und die AP-180C Transfektion zeigt keinen Einfluss auf die Umverteilung des internalisierten Chol von DSM zu DRM. Mittelwerte +/- SA (mindestens 3 repräsentative Experimente)

Dies deutet darauf hin, dass SR-BI die DRM-Genese aus neu internalisiertem SM und Chol fördert. Dazu muss SR-BI anscheinend gemeinsam mit den Lipiden SM und Chol Clathrin-vermittelt endozytiert werden.

4 Diskussion

Phospholipide werden physiologisch auf prinzipiell zwei verschiedenen Wegen von Zellen aufgenommen. Einerseits selektiv über Membranproteine (Engelmann et al., 1996), andererseits durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose. Unlängst konnte das erste Protein identifiziert werden, das den selektiven Phospholipidimport vermittelt (Urban et al., 2000). Es handelte sich um das Transmembranprotein SR-BI, ein Mitglied der Familie der Scavenger-Rezeptoren. An Untersuchungen mit Monozyten konnte nachgewiesen werden, dass die Phospholipide SM, PC und PE selektiv aus Lipoproteinen und synthetischen Vesikeln aufgenommen werden. Diese protein-vermittelte Lipidinternalisierung in Monozyten konnte jedoch nur zum Teil durch die Aktivität des SR-BI erklärt werden. Es war deshalb anzunehmen, dass noch andere Proteine am selektiven Phospholipidimport beteiligt sind.

4.1 Die selektive Aufnahme von SM und PC wird exklusiv über CD36 und SR-BI vermittelt

Humane Monozyten exprimieren neben SR-BI auch CD36 und die Sequenzen der beiden Proteine weisen eine 20-33% Homologie auf (Connelly et al., 1999; Temel et al., 1997). Daher analysierten wir in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von CD36 an der selektiven Phospholipidaufnahme in Monozyten. Der Import von SM, PC und PE wurde in Anwesenheit von Anti-CD36 Antikörpern beziehungsweise SSO untersucht, die beide CD36 spezifisch hemmen. Dabei wurde der Import von SM und PC in die Monozyten deutlich vermindert, während die Aufnahme von PE unbeeinflusst blieb. Durch Transfektion von HeLa Zellen mit humanem CD36 konnte die selektive Aufnahme von SM und PC deutlich gesteigert werden. Der Import von PE blieb jedoch unverändert. Durch den Einsatz verschiedener CD36 Liganden unterschiedlicher Affinität (PS, LDL, oxidiertes LDL und HDL) konnte die Aufnahme von SM und PC wiederum inhibiert werden. Damit wurde gezeigt, dass CD36 die Cholinphospholipide SM und PC, nicht aber PE selektiv in die Zellen importieren kann.

PE wird jedoch fast vollständig von SR-BI in Monozyten importiert (Urban et al., 2000). Dabei kann PE durch SR-BI direkt in DRM inkorporiert werden. Wir konnten

zeigen, dass es unmittelbar nach der PE Aufnahme in DRM zu einer Umverteilung in DSM kommt. Die Bedeutung des direkten Importes von PE in die DRM ist noch ungeklärt.

In weiteren Experimenten wurden Monozyten mit Antikörpern gegen CD36 und SR-BI inkubiert. Es zeigte sich, dass dadurch die selektive Aufnahme von SM und PC fast vollständig gehemmt wird. Damit gelang es zum ersten Mal, die Protein-vermittelte Aufnahme von Phospholipiden in Zellen an einem Zelltyp vollständig aufzuklären.

4.2 DRM-Isolierung durch Detergenzien

Bislang existiert noch kein allgemein anerkanntes Verfahren, mit dem die hypothetischen Rafts direkt sichtbar gemacht werden können. Daher wird eine Reihe indirekter Nachweismethoden angewandt (Anderson und Jacobson, 2002). Dazu gehört die biochemische Isolierung von DRM mit dem Detergens Triton X-100, die eines der am meisten verwendeten Verfahren darstellt (Brown und London, 2000; Simons und Ikonen, 1997). Dabei werden die Plasmamembranen durch das Detergens Triton X-100 bei 4°C extrahiert und die Detergens-resistenten Membranen (DRM) werden durch Zentrifugation von Detergens-löslichen Membranen (DSM) getrennt. Da die GPI-verankerten Proteine hauptsächlich in den DRM nachweisbar sind und die DRM vor allem aus SM und Chol bestehen, geht man davon aus, dass sie Rafts repräsentieren (Brown und Rose, 1992). Bei dieser Methode wird jedoch die in vivo Struktur der Membrandomänen offensichtlich zum Teil verändert (Chamberlain, 2004; Pike et al., 2002). So findet die Trennung der Membrandomänen nicht bei physiologischen Temperaturen, sondern bei 4°C statt. Dies kann unter Umständen schon zu Veränderungen der Lipidorganisation der Membran führen, da Lipidphasen sehr temperaturempfindlich sind. Außerdem ist die Empfindlichkeit der beiden Plasmamembranhälften für Triton X-100 aufgrund ihrer unterschiedlichen Lipidzusammensetzung eventuell verschieden. Der innere Plasmamembranteil besteht vorwiegend aus PS und PE, wohingegen SM nur im äußeren Blatt lokalisiert ist. Aber gerade die Eigenschaften des SM mit seinen gesättigten Kohlenwasserstoffketten ermöglichen die intermolekularen Bindungen, die zur Resistenz gegenüber Detergenzien führen. Die DRM repräsentieren damit vielleicht nur den äußeren Teil der Plasmamembran. Im Gegensatz dazu sprechen unter anderem die Lokalisierung der

GPI-verankerten Proteine und die Ansammlung von Tyrosinkinasen in den DRM für die Repräsentation der hypothetischen Rafts (Brown und Rose, 1992; Foster et al., 2003; Niv et al., 2002).

4.3 Zellmembranbindung und Inkorporierung der Phospholipide in DRM und DSM

Interaktionen der Lipidvesikel mit der Plasmamembran stellen vermutlich den ersten Schritt zur zellulären Aufnahme der Phospholipide dar. Daher untersuchten wir das Bindungsverhalten radioaktiv markierter Lipidvesikel und ihre bevorzugte Assoziierung mit Membrandomänen. Der größte Teil der Lipidvesikel wurde dabei an DSM-Domänen gebunden. Während die Vesikelbindung bei 4°C bereits nach 5 Minuten gesättigt war, wurde bei Aufnahme der Lipide SM und PE bei 37°C auch nach 30 Minuten noch keine Sättigung erreicht. Im Gegensatz zu dem direkten Lipidimport in DRM, der von CD36 und SR-BI vermittelt wird, wurde der Lipidimport in die DSM ausschließlich durch SR-BI aufrechterhalten. Nach Cholesterol-Entleerung der Zellen durch Methyl- β -Cyclodextrin war die Phospholipid-Aufnahme nur geringfügig reduziert.

Das in den DSM-Domänen lokalisierte SR-BI stellt also nicht nur für PE, sondern auch für SM und Chol die Haupteintrittspforte dar. Wieso aber werden SM und Chol, die Hauptbausteine der DRM, offensichtlich zum allergrößten Teil über DSM aufgenommen? Eine mögliche Erklärung dafür ist die Limitation der Aufnahmekapazität bereits bestehender DRM. Es handelt sich hierbei um sehr dicht gepackte Strukturen, die unter Umständen nur im Randbezirk noch Aufnahmereserven besitzen (Sprong et al., 2001).

Die Mikrodomänen-Verteilung der neu inkorporierten Phospholipide war hingegen deutlich anders als diejenigen der gebundenen Phospholipidvesikel. In der Tat waren die zuvor über DSM aufgenommenen DRM-Lipide SM und Chol nach wenigen Minuten in den Cholesterol-reichen Mikrodomänen lokalisiert. Ganz anders verhielt sich dagegen das Phospholipid PE. Im Vergleich zur reinen Vesikelbindung war die Verteilung dieses Phospholipids eindeutig zugunsten der DSM verschoben, in Einklang mit der geringen Affinität des Phospholipids zu den Mikrodomänen.

Zur detaillierteren Analyse der unterschiedlichen Verteilungsmuster wurden die Monozyten während einer Pulsephase für 90 Sekunden mit radioaktiven Phospholipiden beladen. Anschließend wurde zeitabhängig die Umverteilung der aufgenommenen Lipide in einer Chaseperiode verfolgt. Dabei ergab sich für SM und Chol eine Umverteilung von DSM- zu DRM-Domänen, während PE zu den DSM-Domänen strebte. Hierbei stellte sich die Frage, auf welche Weise diese Umverteilung vermittelt und reguliert wird. Es schien zunächst denkbar, dass es auf der Ebene der Plasmamembran zu einer Verschiebung der Lipide zwischen den verschiedenen Membrandomänen kommen könnte. Die relativ langsame Kinetik der Lipidumverteilung im Bereich von Minuten schloss dies jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit aus, da sich die Membranlipide an der lateralen Membranebene sehr schnell fortbewegen (mehrere $\mu\text{m s}^{-1}$) (Sprong et al., 2001).

4.4 SM und Chol werden Clathrin-abhängig endozytiert und bilden dabei mit SR-BI Detergens-resistente Domänen

Aufgrund morphologischer Studien im konfokalen Mikroskop, bei denen beobachtet wurde, dass das neu inkorporierte SM schnell in intrazellulär gelegene vesikelförmige Strukturen transferiert wurde, musste auch an eine Beteiligung endozytotischer Prozesse bei der Translokation der Lipide zwischen den Membrandomänen gedacht werden. Während zum Beispiel das markierte SM in submembranösen vesikulären Strukturen nachweisbar war, blieb die Lokalisation von PE weitgehend auf die Plasmamembran beschränkt. Weiterhin war SM in denselben intrazellulären Strukturen mit dem DRM-Marker CTxB kolokalisiert. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Umverteilung des SM von DSM zu DRM an einen endozytotischen Prozess gekoppelt ist. Da die Ergebnisse aus den radioaktiven Versuchen eindeutig gezeigt hatten, dass der Großteil des SM zuerst in die DSM-Domänen aufgenommen wurde und erst im Anschluss daran zu den DRM gelangte, war es unwahrscheinlich, von einer DRM vermittelten Endozytose auszugehen. Außerdem kam es bei dreifacher Färbung mit SM, CTxB und Transferrin, einem klassischen Marker für die Clathrin-vermittelte Endozytose, in Early Endosomes zur Kolokalisierung der drei Substanzen, was auf eine Beteiligung dieses Endozytoseweges hinweist.

Um dies experimentell zu verifizieren, wurden CHO Zellen mit einer Variante des Helferproteins AP180-C transfiziert, welches selektiv die Clathrin-abhängige Endozytose hemmt (Ford et al., 2001). Diese Transfektion führte bei den SR-BI(+)Zellen zur Verhinderung der Anfärbung der submembranösen Strukturen mit CTxB. Unter Kontrollbedingungen wurden in den SR-BI(+)Zellen zwei verschiedene Arten von CTxB gefärbten Vesikeln beobachtet. Einerseits gab es eine Anzahl größerer, stark CTxB markierter, submembranöser Vesikel, die auch SM und Tf enthielten. Andererseits waren kleinere, schwächer gefärbte Vesikel nachweisbar, die kaum mit SM und Tf kolokalisierten. Während letztere sich in vergleichbarem Maße auch bei den Kontrollzellen fanden, beobachteten wir die größeren und intensiver gefärbten Vesikel nur bei den SR-BI(+)Zellen. Wurde der Clathrin-abhängige Endozytoseweg nun gehemmt, war die Markierung intrazellulär deutlich abgeschwächt. Über den klassischen Endozytoseweg schienen also größere submembranöse Vesikel zu entstehen als über alternative Routen. Dies liegt vermutlich an der Fusion mehrerer Sorting Endosomes während der Clathrin-vermittelten Endozytose.

In Übereinstimmung mit den Daten anderer Autoren (Subtil et al., 1999; Rodal et al., 1999; Hao und Maxfield, 2000; Puri et al., 2001) konnten wir also zeigen, dass SM und Chol im Gegensatz zu PE in vesikulären Strukturen von der Plasmamembran nach intrazellulär transportiert werden und dieser Prozess über Clathrin vermittelt wird.

Allerdings wurde die endozytotische Phospholipidinternalisierung in ausgeprägter Weise nur bei den SR-BI(+)Zellen beobachtet. Daher vermuteten wir eine Schlüsselrolle dieses Proteins bei der Endozytose der neu inkorporierten Lipide. Weiterhin fanden wir bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen, dass SR-BI selbst zusammen mit den Lipiden über Clathrin-coated Pits endozytiert wurde, was andere Untersuchungen bestätigte (Silver et al., 2001). SR-BI vermittelt offensichtlich zuerst die selektive Aufnahme von SM und Chol aus extrazellulären Donoren in DSM und anschließend dann deren gemeinsame Endozytose. Aufgrund der gemeinsamen Internalisierung von SR-BI, SM und Chol ist davon auszugehen, dass es bereits während der Lipidinternalisierung zur Bildung von Lipidclustern aus den DRM-Lipiden um das Protein SR-BI kommt, die dann als Gesamtkomplex endozytiert werden (Anderson und Jacobson, 2002) (Abb. 4.1). Frühere Untersuchungen weisen bereits darauf hin, dass die transmembranalen Domänen bestimmter Proteine mit Clustern aus

SM und Chol interagieren (Reid-Taylor et al., 1999; Scheiffele et al., 1997; Scheiffele et al., 1998).

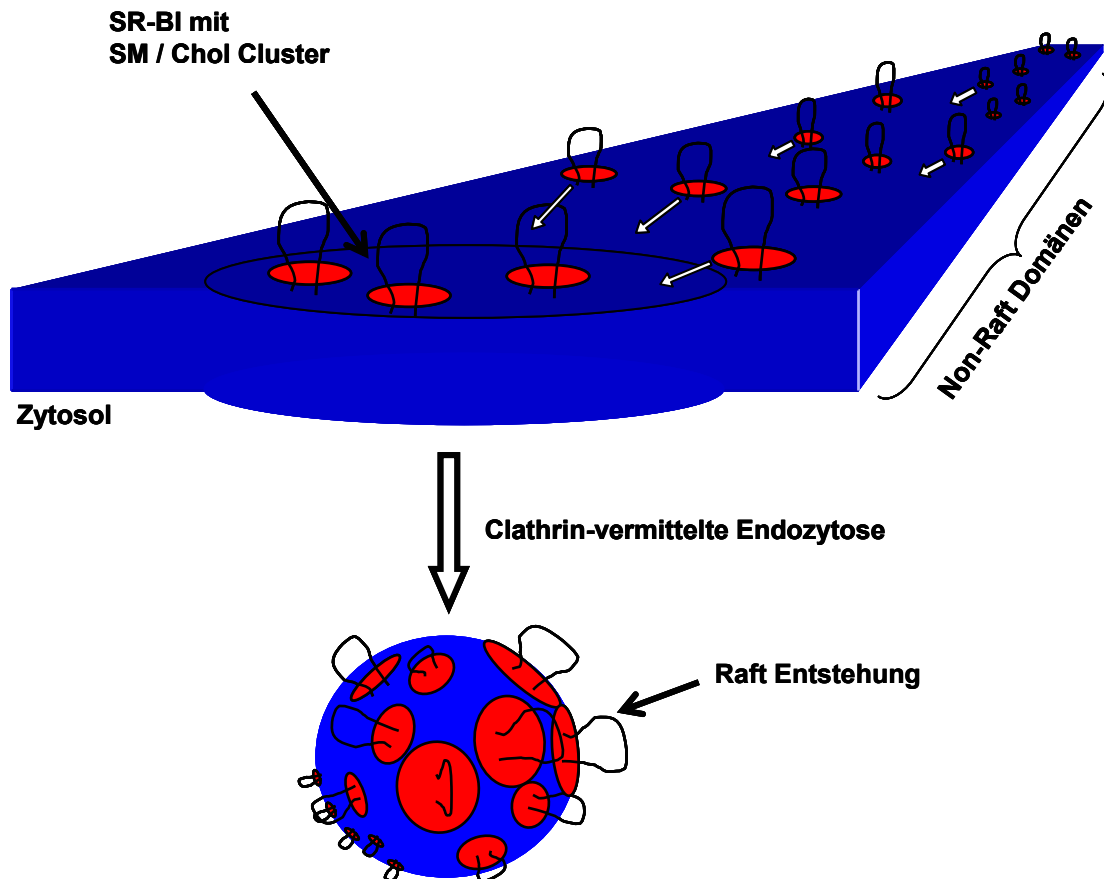


Abb. 4.1: Modell für die Generierung neuer hypothetischer Rafts vermittelt durch SR-BI. SR-BI hat die Fähigkeit die Lipide SM und Chol nach ihrer Internalisierung in Non-Rafts um sich zu sammeln. Dabei kommt es zur Clathrin-vermittelten Endozytose der SR-BI / Lipid Cluster und durch ihre Fusion zur Entstehung von Rafts.

Die Formation solcher Lipidcluster ist ein dynamischer Prozess, der einerseits auf der Eigenschaft von SM und Chol beruht, über Wasserstoffbrückenbindungen intermolekulare Wechselwirkungen einzugehen (Brown, 1998; Rietveld und Simons, 1998). Andererseits existieren Proteine, die die Entstehung der Lipidcluster begünstigen, wie zum Beispiel für Caveolin-1 gezeigt (Murata et al., 1995; Hailstones et al., 1998; Smart et al., 1999). Inwieweit es sich bei SR-BI um ein solches Protein

handelt, ist noch nicht ausreichend untersucht. Unsere Ergebnisse legen diese Vermutung jedoch nahe.

4.5 Die Schwierigkeit der Darstellung endozytischer Prozesse aufgrund ihrer Dynamik und Komplexität

Endozytosewege sind intrazellulär auf komplexe Weise über bestimmte Kompartimente und Transportwege miteinander verbunden, und man beginnt erst langsam die Verzahnung und Regulation dieses Geflechts zu verstehen. Kürzlich wurde zum Beispiel gezeigt, dass glykosylierte Sphingolipide, die über Caveolae internalisiert werden, intrazellulär mit dem Clathrin-abhängigen Endozytoseweg fusionieren können (Sharma et al., 2003). Dies verdeutlicht die Schwierigkeit bei der Differenzierung der verschiedenen Endozytosewege. Weiterhin wird kein Molekül exklusiv nur über einen Transportmechanismus inkorporiert, und sie sind somit zu einem gewissen Teil auch immer in alternativen Transportwegen und Kompartimenten zu finden. Desweiteren unterliegen die intrazellulären Organellen einem hohen Turnover, so dass die endozytierten Moleküle manchmal innerhalb kurzer Zeiträume ihre Lokalisation wechseln. Die Definition und Identifizierung von bestimmten Organellen ist deshalb oft schwierig und die Nomenklatur in der Literatur teils uneinheitlich. Es gibt also keine Markerproteine, die ausschließlich einen Endozytoseweg definieren, sondern man beobachtet die Unterschiede in der Anreicherung des Markers und in der Morphologie der markierten Strukturen im Vergleich zur Kontrolle. Teilweise gelingt es auch, Organellen nach funktionellen Gesichtspunkten zu klassifizieren. So spricht man zum Beispiel von Sorting Endosomes bei der intrazellulären Färbung von Organellen mit LDL und Transferrin nach 1-2 minütiger Inkubation (Maxfield und McGraw, 2004). Bei der Beschreibung Clathrin-vermittelter Endozytosewege wird in der Literatur meistens der Begriff „Early Endosomes“ verwendet. Damit werden die Sorting Endosomes und das Endocytic Recycling Compartment (ERC) zu einem Begriff zusammengefasst (Maxfield und McGraw, 2004).

4.6 SR-BI führt zur Endozytose neuer DRM

In der Elektronenmikroskopie wurde beobachtet, dass die DRM-Bildung durch SR-BI besonders in Filopodien-artigen Zellfortsätzen stattfindet. Sowohl in der Elektronen-

mikroskopie, als auch im konfokalen Mikroskop waren die offensichtlich neu gebildeten DRM in Early Endosomes zu finden. Dies zeigt unter anderem, dass Umbauvorgänge innerhalb der Plasmamembran an biologisch besonders aktiven Abschnitten, wie zum Beispiel den Filopodien, stattfinden. Die Konzentration der DRM in Early Endosomes könnte darauf hindeuten, dass dieses Kompartiment eine Art Reservepool für die DRM-bildenden Lipide SM und Chol darstellt. Es ist dabei vorstellbar, dass die endosomalen Mikrodomänen zur Zellmembran zurückkehren und damit neue DRM für die Plasmamembran bereitstellen, oder aber andere Zellorganellen mit SM und Chol versorgen (Fivaz et al., 2002). SR-BI vermittelt dabei die DRM-Genese vermutlich über zwei Wege. Zum einen direkt über den Einbau von Phospholipiden in bestehende DRM. Daran ist neben SR-BI auch CD36 beteiligt. Zum anderen indirekt durch das Rezirkulieren von Endosomen an die Zellmembran. Die Tatsache, dass SR-BI gemeinsam mit den DRM-bildenden Lipiden SM und Chol über die Clathrin-abhängige Endozytose aufgenommen wird, könnte erklären, warum SR-BI in beiden Kompartimenten zu finden ist. SR-BI besitzt anscheinend eine Schlüsselfunktion bei der Neubildung von DRM und damit hypothetischer Rafts. Als membranständige Proteine können die SR-BI-Moleküle, die in DSM lokalisiert sind, den Clathrin-abhängigen Endozytoseweg als Eintrittspforte für die DRM-bildenden Lipide SM und Cholesterol verwenden. SR-BI ist hierbei nicht nur Vermittler, sondern begleitet vermutlich die neu internalisierten Lipide auch in endosomale Strukturen. Somit spielt dieser Scavenger Rezeptor nicht nur in der Plasmamembran eine wichtige Rolle zur Aufnahme von Lipiden und zur Generierung neuer Mikrodomänen, sondern greift auch in die intrazelluläre Verteilung der DRM koordinierend ein.

4.7 Modell für die SR-BI-abhängige DRM-Entstehung und den membranösen Lipidverkehr

Der größte Teil der neu inkorporierten Phospholipide SM und Chol wird über SR-BI in die DSM-Kompartimente vermittelt. Der Rest wird über SR-BI und CD36 direkt in DRM-Domänen transferiert. PE, das typischerweise in DSM lokalisiert ist, wird ausschließlich über SR-BI importiert. Dabei wird der Hauptteil direkt in die DSM transferiert, während jedoch ein kleiner Teil über SR-BI auch direkt in die DRM gelangt. Das primär in die DRM-Domänen aufgenommene PE wird innerhalb weniger

Minuten in die DSM-Kompartimente verschoben. SM und Chol, die zuerst in DSM aufgenommen wurden, werden SR-BI vermittelt endozytiert. Dabei kommt es zur Bildung von SM- und Chol-reichen Domänen, beziehungsweise zur Entstehung von neuen Mikrodomänen / Rafts. Entscheidend daran beteiligt ist die Clathrin-vermittelte Endozytose der Mikrodomänen, die aus SR-BI und SM / Chol Komplexen bestehen. Es wird vermutet, dass diese endosomalen Mikrodomänen zurück zur Plasmamembran rezyklieren können und damit vielleicht einen Reserverpool für DRM-Domänen darstellen (Abb. 4.2).

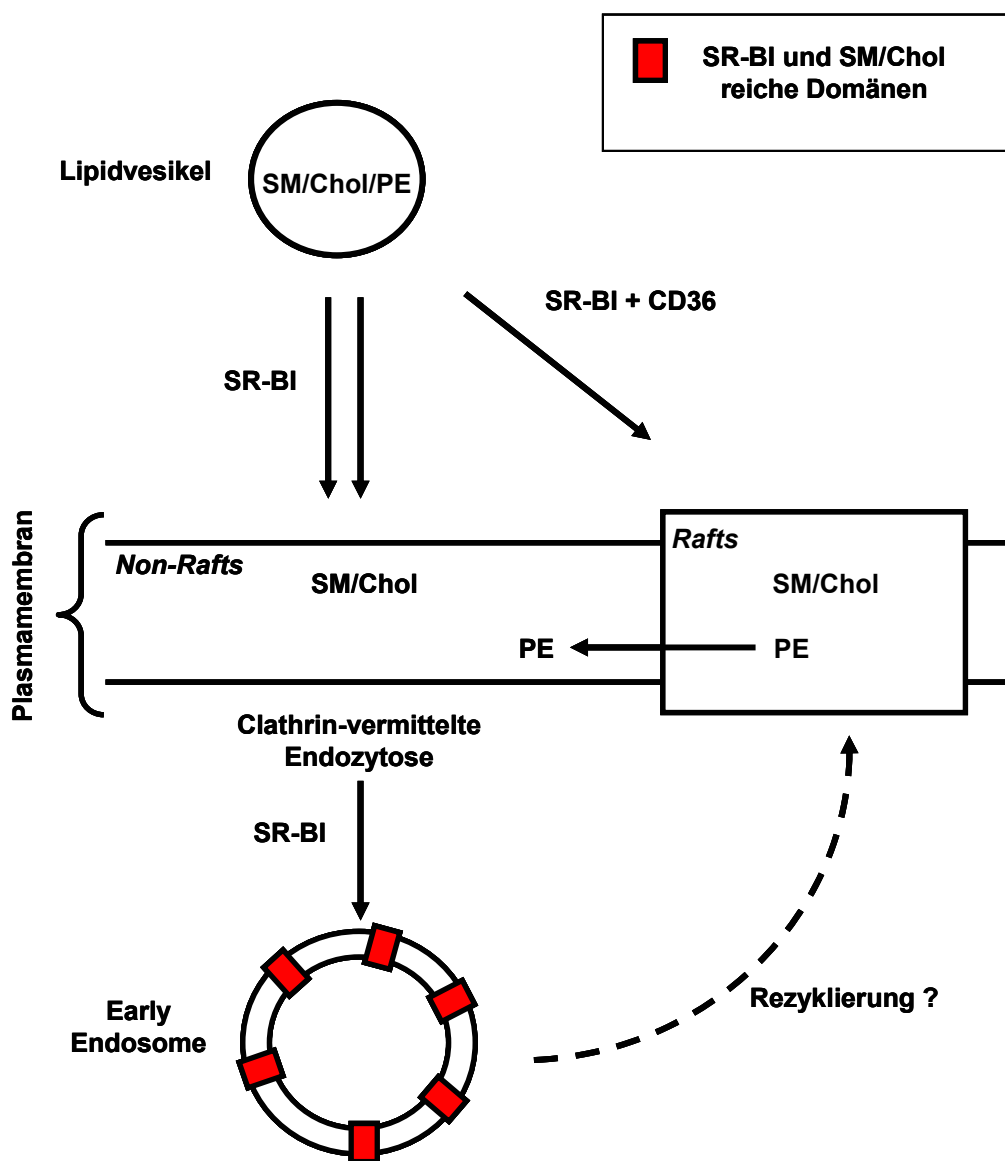


Abb. 4.2: Modell für die SR-BI abhängige Generierung von Mikrodomänen und den membranösen Lipidverkehr. Beschreibung im Kapitel 4.7.

5 Zusammenfassung

Die Plasmamembran eukaryotischer Zellen besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht charakteristischer Lipide. Die Asymmetrie zwischen der äußeren und inneren Membranhälfte entsteht durch die unterschiedliche Verteilung der Phospholipide. Seit einigen Jahren nimmt man an, dass auch eine laterale Asymmetrie der Plasmamembran durch hypothetische Rafts und Non-Rafts besteht. Diese Asymmetrie wird durch die hohen Konzentrationen an Sphingomyelin (SM) und Cholesterol (Chol) in der Plasmamembran ermöglicht, die durch die Wechselwirkungen der gesättigten Kohlenwasserstoffketten des SM zur Bildung stabiler Membrandomänen führen. Die Regulierung des Phospholipidverkehrs und der selektive Einbau der Lipide in Rafts und Non-Rafts sind noch weitgehend unklar.

Phospholipide können auf Endozytose unabhängigen Wege in Zellen internalisiert werden. Dieser Prozess ist Protein-vermittelt. Erst vor wenigen Jahren konnte SR-BI als erstes Protein für die selektive Phospholipidaufnahme in Zellen charakterisiert werden.

In dieser Arbeit wurde unter anderem die Rolle des Scavenger-Rezeptors CD36 bei der selektiven Phospholipidaufnahme untersucht. An humanen Monozyten wurde gezeigt, dass CD36 selektiv das Sphingolipid Sphingomyelin und das Glycerophospholipid Phosphatidylcholin (PC), nicht jedoch Phosphatidylethanolamin (PE) aufnimmt. Durch einen Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von CD36 konnte dieser selektive Import inhibiert werden. Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch den Einsatz von Sulfo-N-Succinimidyl Oleat (SSO), ebenfalls ein spezifischer Inhibitor von CD36. HeLa Zellen, die mit CD36 transfiziert waren nahmen deutlich mehr SM und PC auf als die Kontrollzellen, während die PE Internalisierung unbeeinflusst blieb. Weiterhin konnte die Phospholipidaufnahme durch bekannte CD36 Liganden hoher Affinität (Phosphatidylserin und oxidiertes LDL) kompetitiv gehemmt werden.

Im Gegensatz zu CD36 nimmt der Scavenger-Rezeptor SR-BI neben SM und PC auch PE auf. Humane Monozyten exprimieren sowohl CD36 als auch SR-BI. Wurden Antikörper gegen SR-BI und CD36 eingesetzt, konnte der Import der Phospholipide

SM, PC und PE vollständig gehemmt werden. Damit gelang es zum ersten mal, den Phospholipidimport an einem Zellsystem vollständig zu erklären.

Mit Hilfe von Western Blots und der Separierung der Zellmembranen in Detergens-resistente Membranen (DRM) und Detergens-lösliche Membrandomänen (DSM), die die hypothetischen Rafts und Non-Rafts repräsentieren, wurde die Verteilung der beiden Scavenger-Rezeptoren und die davon ausgehenden funktionellen Aspekte untersucht. Während CD36 fast ausschließlich in DRM lokalisiert war, fanden wir SR-BI zu $\frac{2}{3}$ in DSM. CD36 transportiert damit SM, ein Hauptbaustein von DRM, direkt in diese Membrandomänen. SR-BI transportiert neben den DRM-Bausteinen SM und Cholesterol auch PE in die DRM. PE, das normalerweise kaum in DRM nachzuweisen ist, wird dann innerhalb weniger Minuten in DSM verschoben.

Der größte Teil des SM und Chol wird jedoch über SR-BI in die DSM aufgenommen. Dabei stellte sich die Frage, auf welche Weise diese Lipide daraufhin in die DRM gelangen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf endozytotischem Wege über Clathrin-coated Pits intrazellulär Detergens-resistente Membrandomänen entstehen. SR-BI vermittelt dabei zuerst die selektive Aufnahme von SM und Chol in DSM und wird anschließend als Komplex aus SM/Chol und SR-BI über die Clathrin-vermittelte Endozytose nach intrazellulär transportiert. Dabei kommt es zur Bildung von DRM in Early Endosomes. Wir vermuten, dass dadurch ein Pool an DRM entsteht, der bei Bedarf zur Zellmembran rezyklieren kann und damit zur Aufrechterhaltung der lateralen Membranasymmetrie durch DRM und DSM beiträgt. SR-BI scheint eine Schlüsselrolle sowohl bei der Internalisierung, als auch beim intrazellulären Transport zu spielen.

6 Literaturverzeichnis

- Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T., Xu S., Hobbs H.H., Krieger M.
Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor
Science **271**, 518-520 (1996)
- Acton S., Scherer P.E., Lodish H.F., Krieger M.
Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor
J. Biol. Chem. **269**, 21003–21009 (1994)
- Ahmed S.N., Brown D.A., London E.
On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes:
physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a
detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes
Biochemistry **36**, 10944-10953 (1997)
- Anderson R.G.
The caveolae membrane system
Annu. Rev. Biochem. **67**, 199-225 (1998)
- Anderson R.G., Jacobson K.
A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains
Science **296**, 1821-1825 (2002)
- Armesilla A.L., Calvo D., Vega M.A.
Structural and functional characterization of the human CD36 gene promoter:
identification of a proximal PEBP2/CBF site
J. Biol. Chem. **271**, 7781-7787 (1996)
- Azeddine Ibrahim, Bonen A., Blinn W.D., Hajri T., Xin Li, Zhong K., Cameron R.,
Abumrad N.A.
Muscle-specific Overexpression of FAT/CD36 Enhances Fatty Acid Oxidation by
Contracting Muscle, Reduces Plasma Triglycerides and Fatty Acids, and Increases
Plasma Glucose and Insulin
J. Biol. Chem. **274**, 26761-26766 (1999)
- Azhar S., Nomoto A., Leers-Sucheta S., Reaven E.
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**, 1616-1628 (1998)
- Babitt J., Trigatti B., Rigotti A., Smart E.J., Anderson R.G.W., Xu S., Krieger M.
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**, 13242–13249 (1997)
- Beleznay Z., Zachowski A., Devaux P.F., Navazo M.P., Ott P.
ATP-dependent aminophospholipid translocation in erythrocyte vesicles: stoichiometry
of transport
Biochemistry **32**, 3146-3152 (1993)

- Bevers E.M., Comfurius P., Dekkers D.W., Zwaal R.F.
Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells
Biochim. Biophys. Acta **1439**, 317-330 (1999)
- Bodzioch M., Orso E., Klucken J., Langmann T., Bottcher A., Diederich W., Drobnik W., Barlage S., Buchler C., Porsch-Ozcurumez M., Kaminski W.E., Hahmann H.W., Oette K., Rothe G., Aslanidis C., Lackner K.J., Schmitz G.
The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease
Nat. Genet. **22**, 347-351 (1999)
- Brooks-Wilson A., Marcil M., Clee S.M., Zhang L.H., Roomp K., van Dam M., Yu L., Brewer C., Collins J.A., Molhuizen H.O., Loubser O., Ouelette B.F., Fichter K., Ashbourne-Excoffon K.J., Sensen C.W., Scherer S., Mott S., Denis M., Martindale D., Frohlich J., Morgan K., Koop B., Pimstone S., Kastelein J.J., Hayden M.R., et al.
Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency
Nat Genet. **22**, 336-345 (1999)
- Brown D.A.
Seeing is believing: visualization of rafts in model membranes
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **98**, 10517-10518 (2001)
- Brown D.A., London E.
Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts
J. Biol. Chem. **275**, 17221-17224 (2000)
- Brown D.A., London E.
Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes
J. Membr. Biol. **164**, 103-114 (1998)
- Brown D.A., Rose J.K.
Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface
Cell **68**, 533-544 (1992)
- Brown M.S., Goldstein J.L.
Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis
Annu. Rev. Biochem. **52**, 223-261 (1983)
- Brown R.E.
Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal
J. Cell Sci. **111**, 1-9 (1998)
- Buechler C., Ritter M., Quoc C.D., Agildere A., Schmitz G.
Lipopolysaccharide inhibits the expression of the scavenger receptor Cla-1 in human monocytes and macrophages
Biochemical and Biophysical Research Communications **262**, 251-254 (1999)
- Calvo D., Gomez-Coronado D., Lascuncion M.A., Vega M.A.
CLA-1 is an 85-kDa plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **17**, 2341-2349 (1997)

- Calvo D., Vega M.A.
Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMP-II gene family
J. Biol. Chem. **268**, 18929–18935 (1993)
- Chamberlain L.H.
Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts
FEBS Lett. **559**; 1-5 (2004)
- Connelly M.A., Klein S.M., Azhar S., Abumrad N.A., Williams D.L.
Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesterol ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesterol ester uptake
J. Biol. Chem. **274**, 41-47 (1999)
- Connor J., Pak C.H., Zwaal R.F., Schroit A.J.
Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process
J Biol Chem. **267**, 19412-19417 (1992)
- Coort S.L., Willems J., Coumans W.A., van der Vusse G.J., Bonen A., Glatz J.F., Luiken J.J.
Sulfo-N-succinimidyl esters of long chain fatty acids specifically inhibit fatty acid translocase (FAT/CD36)-mediated cellular fatty acid uptake
Mol. Cell Biochem. **239**, 213-219 (2002)
- Crombie R., Silverstein R.
Lysosomal integral membrane protein II binds thrombospondin-1. Structure-function homology with the cell adhesion molecule CD36 defines a conserved recognition motif
J. Biol. Chem. **273**, 4855-4863 (1998)
- Dean M., Hamon Y., Chimini G.
The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily
J. Lipid Res. **42**, 1007-1017 (2001)
- Devaux P.F.
Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes
Biochemistry **30**, 1163-1173 (1991)
- Dobner P., Koller E., Engelmann B.
Platelet high affinity low density lipoprotein binding and import of lipoprotein derived phospholipids.
FEBS Lett. **444**, 270-274 (1999)
- Dorahy D.J., Lincz L.F., Meldrum C.J., Burns G.F.
Biochemical isolation of a membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD36
Biochem. J. **319**, 67-72 (1996)
- Dunn K. W., McGraw T. E., Maxfield F. R.
Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome
J. Cell Biol. **109**, 3303–3314 (1989)

- Edidin M.
Lipid microdomains in cell surface membranes
Curr. Opin. Struct. Biol. **7**, 528-532 (1997)
- Endemann G., Stanton L.W., Madden K.S., Bryant C.M., White R.T., Protter A.A.
CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein
J. Biol. Chem. **268**, 11811-11816 (1993)
- Engelmann B., Kogl C., Kulschar R., Schaipp B.
Transfer of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin from low- and high-density lipoprotein to human platelets
Biochem J. **315**, 781-789 (1996)
- Engelmann B., Schaipp B., Dobner P., Stoeckelhuber M., Kogl C., Siess W., Hermetter A.
Platelet agonists enhance the import of phosphatidylethanolamine into human platelets
J Biol Chem. **273**, 27800-27808 (1998)
- Fadok V.A., Bratton D.L., Rose D.M., Pearson A., Ezekewitz R.A., Henson P.M.
A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells
Nature **405**, 85-90 (2000)
- Fivaz M., Vilbois F., Thurnheer S., Pasquali C., Abrami L., Bickel P.E., Parton R.G., van der Goot F.G.
Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins
EMBO J. **21**, 3989-4000 (2002)
- Ford M.G., Pearse B.M., Higgins M.K., Vallis Y., Owen D.J., Gibson A., Hopkins C.R., Evans P.R., McMahon H.T.
Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes
Science **291**, 1051-1055 (2001)
- Foster L.J., De Hoog C.L., Mann M.
Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **100**, 5813-5818 (2003)
- Francis G.A., Knopp R.H., Oram J.F.
Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease
J. Clin. Invest. **96**, 78-87 (1995)
- Freeman M.W.
Scavenger receptors in atherosclerosis
Curr. Opin. Hematol. **4**, 41-47 (1997)
- Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K., Brown M.S.
Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **76**, 333-337 (1979)

- Goti D., Hrzenjak A., Levak-Frank S., Frank S., van der Westhuyzen D.R., Malle E., Sattler W.
Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated Vitamin E
Journal of Neurochemistry **76**, 498–508 (2001)
- Graf G.A., Roswell K.L., Smart E.J.
17Beta-estradiol promotes the up-regulation of SR-BII in HepG2 cells and in rat livers
J. Lipid Res. **42**, 1444–1449 (2001)
- Gruarin P., Thorne R.F., Dorahy D.J., Burns G.F., Sitia R., Alessio M.
CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport
Biochem. Biophys. Res. Commun. **275**, 446-454 (2000)
- Gu X., Trigatti B.L., Xu S., Acton S.L., Babitt J., Krieger M.
The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain
J. Biol. Chem. **273**, 26338–26348 (1998)
- Hailstones D., Sleer L.S., Parton R.G., Stanley K.K.
Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells
J Lipid Res. **39**, 369-379 (1998)
- Hao M., Maxfield F.R.
Characterization of rapid membrane internalization and recycling
J. Biol. Chem. **275**, 15279-15286 (2000)
- Harmon C.M., Abumrad N.A.
Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids
J. Membr. Biol. **133**, 43-49 (1993)
- Heijnen H.F., Van Lier M., Waaijenborg S., Ohno-Iwashita Y., Waheed A.A., Inomata M., Gorter G., Mobius W., Akkerman J.W., Slot J.W.
Concentration of rafts in platelet filopodia correlates with recruitment of c-Src and CD63 to these domains
J Thromb Haemost. **1**, 1161-1173 (2003)
- Iwamoto M, Morita I, Fukuda M, Murota S, Ando S, Ohno-Iwashita Y
A biotinylated perfringolysin O derivative: a new probe for detection of cell surface cholesterol
Biochim. Biophys. Acta **1327**, 222-230 (1997)

- Johnson M.S., Svensson P.A., Helou K., Billig H., Levan G., Carlsson L., Carlsson B.
Characterization and chromosomal localization of rat scavenger receptor class B type I, a high density lipoprotein receptor with a putative leucine zipper domain and peroxisomal targeting sequence
Endocrinology **139**, 72–80 (1998)
- Keizer H.A., Schaart G., Tandon N.N., Glatz J.F., Luiken J.J.
Subcellular immunolocalisation of fatty acid translocase (FAT)/CD36 in human type-1 and type-2 skeletal muscle fibres
Histochem Cell Biol. **121**, 101-107 (2004)
- Klein I., Sarkadi B., Varadi A.
An inventory of the human ABC proteins
Biochim. Biophys. Acta **1461**, 237-262 (1999)
- Koning R. E.
Macromolecules. Plant Physiology Information Website
<http://plantphys.info/principles/macromolecules.html> (25.7.2005)
- Krieger M.
Charting the Fate of the “Good Cholesterol”: Identification and Characterization of the High-Density Lipoprotein Receptor SR-BI
Annu.Rev. Biochem. **68**, 523-558 (1999)
- Lamaze C., Dujeancourt A., Baba T., Lo C.G., Benmerah A., Dautry-Varsat A.
Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway
Mol. Cell **3**, 661-671 (2001)
- Lin S. X., Gundersen G. G., Maxfield F. R.
Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, detyrosinated (glu) microtubules and kinesin
Mol. Biol. Cell **13**, 96–109 (2002)
- Lisanti M.P., Scherer P.E., Vidugiriene J., Tang Z., Hermanowski-Vosatka A., Tu Y.H., Cook R.F., Sargiacomo M.
Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease
J. Cell Biol. **126**, 111-126 (1994)
- Lobo M.V., Huerta L., Ruiz-Velasco N., Teixeira E., de la Cueva P., Celdran A., Martin-Hidalgo A., Vega M.A., Bragado R.
Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: Toward the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids
J. Histochem. Cytochem. **49**, 1253–1260 (2001)
- Matthew L., Albert S., Pearce F.A., Francisco L.M., Sauter B., Roy P., Silverstein R.L., Bhardwaj N.
Immature Dendritic Cells Phagocytose Apoptotic Cells via $\alpha_v\beta_5$ and CD36, and Cross-present Antigens to Cytotoxic T Lymphocytes
J. Exp. Med. **188**, 1359-1368 (1998)

- Matveev S., Uittenbogaard A., van der Westhuyzen D.R., Smart E.J.
Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester
Eur. J. Biochem. **268**, 5609–5616 (2001)
- Maxfield F.R., McGraw T.E.
Endocytic Recycling
Nature Reviews Molecular Cell Biology **5**, 121–132 (2004)
- Mayor S., Presley J.F., Maxfield F.R.
Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process
J. Cell Biol. **121**, 1257–1269 (1993)
- Mayor S., Sabharanjak S., Maxfield F.R.
Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes
EMBO J. **17**, 4626–4638 (1998)
- McGraw T. E., Dunn K.W., Maxfield F.R.
Isolation of a temperature-sensitive variant Chinese hamster ovary cell line with a morphologically altered endocytic recycling compartment
J. Cell. Physiol. **155**, 579–594 (1993)
- Mukherjee S., Ghosh R.N., Maxfield F.R.
Endocytosis
Physiol. Rev. **77**, 759–803 (1997)
- Mukherjee S., Maxfield F.R.
Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking
Traffic **1**, 203–211 (2000)
- Murata M., Peranen J., Schreiner R., Wieland F., Kurzchalia T.V., Simons K.
VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein
Proc Natl Acad Sci U S A. **92**, 10339–10343 (1995)
- Nichols B.J.
A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex
Nat. Cell Biol. **4**, 374–378 (2002)
- Nichols B.J., Kenworthy A.K., Polishchuk R.S., Lodge R., Roberts T.H., Hirschberg K., Phair R.D., Lippincott-Schwartz J.
Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex
J. Cell Biol. **153**, 529–541 (2001)
- Niv H., Gutman O., Kloog Y., Henis Y.I.
Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells
J. Cell Biol. **157**, 865–872 (2002)
- Ohno-Iwashita Y., Iwamoto M., Mitsui K., Kawasaki H., Ando S.
Cold-labile hemolysin produced by limited proteolysis of theta-toxin from *Clostridium perfringens*
Biochemistry **25**, 6048–6053 (1986)

- Oquendo P., Hundt E., Lawler J., Seed B.
CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes
Cell **58**, 95-101 (1989)
- Oram J.F.
Tangier disease and ABCA1
Biochim. Biophys. Acta **1529**, 321-330 (2000)
- Pike L.J.
Lipid rafts: bringing order to chaos
J. Lipid Res. **44**, 655-667 (2003)
- Pike L.J., Han X., Chung K.N., Gross R.W.
Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis
Biochemistry **41**, 2075-2088 (2002)
- Puri V., Watanabe R., Singh R.D., Dominguez M., Brown J.C., Wheatley C.L., Marks D.L., Pagano R.E.
Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways
J. Cell. Biol. **154**, 535-547 (2001)
- Reid-Taylor K.L., Chu J.W., Sharom F.J.
Reconstitution of the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein Thy-1: interaction with membrane phospholipids and galactosylceramide
Biochem. Cell Biol. **77**, 189-200 (1999)
- Remaley A.T., Schumacher U.K., Stonik J.A., Farsi B.D., Nazih H., Brewer H.B. Jr
Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effect of brefeldin on lipid efflux
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **17**, 1813-1821 (1997)
- Rhoads D., Brissette L.
The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders
Int. J. Biochem. Cell Biol. **36**, 39-77 (2004)
- Rietveld A., Simons K.
The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts
Biochim. Biophys. Acta **1376**, 467-479 (1998)
- Rigotti A., Acton S.L., Krieger M.
The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids
J. Biol. Chem. **270**, 16221-16224 (1995)
- Rodal S.K., Skretting G., Garred O., Vilhardt F., van Deurs B., Sandvig K.
Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles
Mol. Biol. Cell **10**, 961-974 (1999)

- Rodrigueza W.V., Thuahnai S.T., Temel R.E., Lund-Katz S., Phillips M.C., Williams D.L.
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**, 20344-20350 (1999)
- Rothberg K.G., Heuser J.E., Donzell W.C., Ying Y.S., Glenney J.R., Anderson R.G.
Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats
Cell **68**, 673-682 (1992)
- Rothblat G.H., de la Llera-Moya M., Atger V., Kellner-Weibel G., Williams D.L., Phillips M.C.
Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights
J. Lipid Res. **40**, 781-796 (1999)
- Salah-Uddin H., Gordon M.J., Ford I., Tandon N.N., Greaves M., Duttaroy A.K.
Surface expression of fatty acid translocase (FAT/CD36) on platelets in myeloproliferative disorders and non-insulin dependent diabetes mellitus: effect on arachidonic acid uptake
Mol. Cell Biochem. **239**, 203-211 (2002)
- Sampson M.J., Davies I.R., Braschi S., Ivory K., Hughes D.A.
Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes
Atherosclerosis **167**, 129-134 (2003)
- Sandvig K., van Deurs B.
Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin
FEBS Lett. **529**, 49-53 (2002)
- Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R.M., Acali S., Filocamo G., Traboni C., Nicosia A., Cortese R., Vitelli A.
The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus
EMBO J. **21**, 5017-5025 (2002)
- Scheff D.R., Daro E.A., Hull M., Mellman I.
The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions
J. Cell Biol. **145**, 123-139 (1999)
- Scheiffele P., Roth M.G., Simons K.
Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain
EMBO J. **16**, 5501-5508 (1997)
- Scheiffele P., Verkade P., Fra A.M., Virta H., Simons K., Ikonen E.
Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells
J. Cell Biol. **140**, 795-806 (1998)

- Schroeder F., Frolov A.A., Murphy E.J., Atshaves B.P., Jefferson J.R., Pu L., Wood W.G., Foxworth W.B., Kier A.B.
Recent advances in membrane cholesterol domain dynamics and intracellular cholesterol trafficking
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **213**, 150-77 (1996)
- Schroeder R.J., Ahmed S.N., Zhu Y., London E., Brown D.A.
Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains
J. Biol. Chem. **273**, 1150-1157 (1998)
- Seigneuret M., Devaux P.F.
ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 3751-3755 (1984)
- Sfeir Z., Ibrahimi A., Amri E., Grimaldi P., Abumrad N.
Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport
Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids **57**, 17-21 (1997)
- Sharma D.K., Choudhury A., Singh R.D., Wheatley C.L., Marks D.L., Pagano R.E.
Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling
J. Biol. Chem. **278**, 7564-7572 (2003)
- Silver D.L., Wang N., Xiao X., Tall A.R.
High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion
J. Biol. Chem. **276**, 25287-25293 (2001)
- Simantov R., Silverstein R.L.
CD36: a critical anti-angiogenic receptor
Front Biosci. **8**, 874-882 (2003)
- Simons K., Ikonen E.
Functional rafts in cell membranes
Nature **387**, 569-572 (1997)
- Singer S. J., Nicolson G.L.
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes
Science **175**, 720-731 (1972)
- Slot J.W., Geuze H.J., Gigengack S., Lienhard G.E., James D.E.
Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat
J. Cell Biol. **113**, 123-135 (1991)
- Smart E.J., Graf G.A., McNiven M.A., Sessa W.C., Engelman J.A., Scherer P.E., Okamoto T., Lisanti M.P.
Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction
Mol Cell Biol. **19**, 7289-7304 (1999)

- Smeets E.F., Comfurius P., Bevers E.M., Zwaal R.F.
Calcium-induced transbilayer scrambling of fluorescent phospholipid analogs in platelets and erythrocytes
Biochim. Biophys. Acta **1195**, 281-286 (1994)
- Sprong H., van der Sluijs P., van Meer G.
How proteins move lipids and lipids move proteins
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2**, 504-513 (2001)
- Stahlhut M., Sandvig K., van Deurs B.
Caveolae: uniform structures with multiple functions in signaling, cell growth, and cancer
Exp Cell Res. **261**, 111-118 (2000)
- Stenmark H., Aasland R., Toh B.H., D'Arrigo A.
Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger
J. Biol. Chem. **271**, 24048-24054 (1996)
- Stryer, L.
Biochemistry, fourth edition, Stanford University
W.H. Freeman and Company, New York, (1995)
- Subtil A., Gaidarov I., Kobylarz K., Lampson M.A., Keen J.H., McGraw T.E.
Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **96**, 6775-6780 (1999)
- Tandon N.N., Kralisz U., Jamieson G.A.
Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion
J. Biol. Chem. **264**, 7576-7583 (1989)
- Tao S., Wagner J., Lublin D.M.
CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails
J. Biol. Chem. **271**, 22315-22320 (1996)
- Temel R.E., Trigatti B., DeMattos R.B., Azhar S., Krieger M., Williams D.L.
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**, 13600-13605 (1997)
- Thorne R.F., Marshall J.F., Shafren D.R., Gibson P.G., Hart I.R., Burns G.F.
The integrins alpha3beta1 and alpha6beta1 physically and functionally associate with CD36 in human melanoma cells. Requirement for the extracellular domain OF CD36
J. Biol. Chem. **275**, 35264-35275 (2000)
- Thuahnai S.T., Lund-Katz S., Williams D.L., Phillips M.C.
Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor
J. Biol. Chem. **276**, 43801-43808 (2001)

- Urban S., Zieseniss S., Werder M., Hauser H., Budzinski R., Engelmann B.
Scavenger receptor BI transfers major lipoprotein-associated phospholipids into the cells
J. Biol. Chem. **275**, 33409-33415 (2000)
- Waheed A.A., Shimada Y., Heijnen H.F., Nakamura M., Inomata M., Hayashi M., Iwashita S., Slot J.W., Ohno-Iwashita Y.
Selective binding of perfringolysin O derivative to cholesterol-rich membrane microdomains (rafts)
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **98**, 4926-4931 (2001)
- Werder M., Han C.H., Wehrli E., Bimmler D., Schulthess G., Hauser H.
Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine
Biochemistry **40**, 11643–11650 (2001)
- Williamson P., Bevers E.M., Smeets E.F., Comfurius P., Schlegel R.A., Zwaal R.F.
Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movement in platelets
Biochemistry **34**, 10448-10455 (1995)
- Yamada E.
The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse
J. Biophys. Biochem. Cytol. **1**, 445-458 (1955)
- Yamashiro D.J., Tycko B., Fluss S.R., Maxfield F.R.
Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway
Cell **37**, 789–800 (1984)
- Yeagle P.L.
Cholesterol and the cell membrane
Biochim. Biophys. Acta **822**, 267-287 (1985)
- Zachowski A.
Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement
Biochem. J. **294**, 1-14 (1993)
- Zeng Y., Tao N., Chung K.N., Heuser J.E., Lublin D.M.
Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1
J. Biol. Chem. **278**, 45931-45936 (2003)

7 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bernd Engelmann für seine intensive Betreuung und Förderung während der gesamten Doktorarbeit.

Außerdem herzlichen Dank an Dr. Silke Dlugai, PD. Dr. Stefan Zahler und Harry Heinen, PhD für die unermüdliche Hilfe bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei all denen, die durch ihre geistige und materielle Unterstützung diese Doktorarbeit ermöglicht haben.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Markus K.H. Wiedmann *10.12.1976 in Tübingen
Prebrunnstr. 15 markuswiedmann@web.de
93049 Regensburg

Schulbildung und Studium

1981-1982 Primary School Primrose Hill, London, England
1983-1990 Grundschule und Uhland-Gymnasium, Tübingen
1990-1996 Albertus-Magnus-Gymnasium, Regensburg; Abitur, Note 1.3
1997-1998 Universität in Regensburg, Musikwissenschaft und Violine
1998-2005 *Medizinstudium*: Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München

Wehrdienst

1996-1997 3./Sanitätsbataillon 4, Straubing

Berufserfahrung

2000-2003 *Famulaturen*: Neurochirurgie, Regensburg; Innere Medizin, Biberach, Deutschland; Pädiatrie, Mahé, Seychellen; Viszeralchirurgie, Kristiansand, Norwegen
2004-2005 *Praktisches Jahr*: Herz-Thorax- und Viszeralchirurgie; Infektiologie; Universitätsklinikum Nord-Norwegen, Tromsø
Kardiologie, Bristol Royal Infirmary, University of Bristol, England; Neurologie, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz
Seit Juni 2005 Assistenzarzt der Klinik für Neurologie, Akershus Universitetssykehus, Oslo, Norwegen

Promotion und Publikation

2001-2003 Grundlagenforschung am Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern, LMU München bei Prof. Dr. B. Engelmann
2003 Abstract und Poster bei der "International Conference on the Bioscience of Lipids", Oxford

Zusätzliches Engagement

2002-2003 Co-Assistent beim Kurs für Makroskopische Anatomie, Anatomische Anstalt der LMU München
1998-2003 Konzertmeister des AGV Studentenorchesters, München
1997-2003 Aushilfe bei professionellen Orchestern, u.a. Weidener Kammerorchester, German Chamber Orchestra, Münchner Symphoniker

Sprachen und Hobbies

Englisch, Norwegisch fließend;
Skifahren, Segeln, Marathon, Literatur

9 Veröffentlichungen

CD36 mediates selective phospholipid uptake into cells

Markus Wiedmann and Bernd Engelmann

Abstract and Poster

44th International Conference on the Bioscience of Lipids; Biochemical Society
Independent Meeting, Keble College, Oxford, 7-11 September 2003

