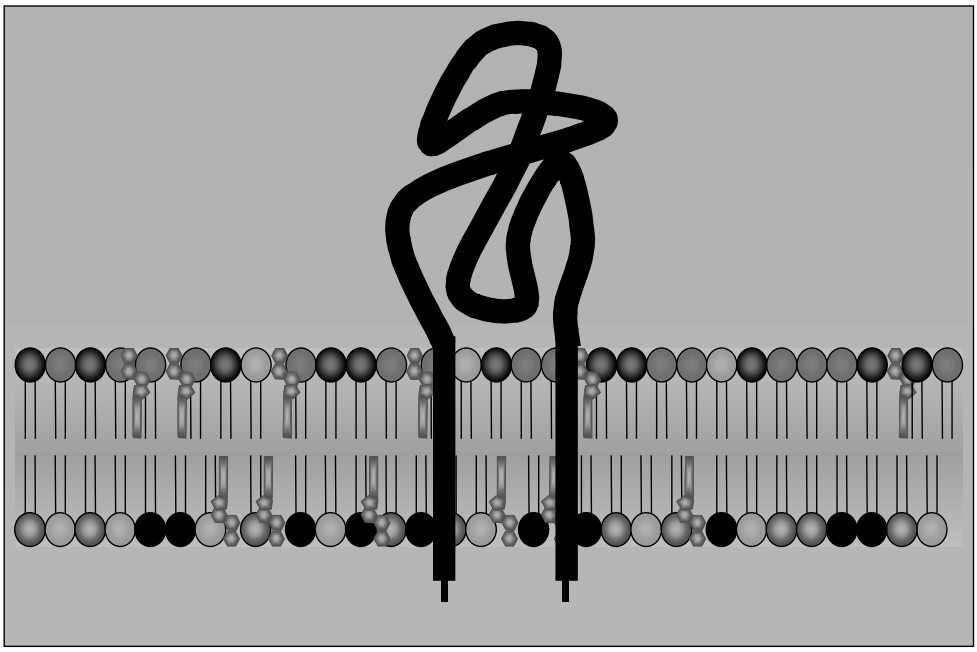
Stephanie Urban

Bedeutung des Scavenger Rezeptors Klasse B Typ I (SR-BI) für die zelluläre Phospholipidaufnahme



Aus dem Physiologischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

Bedeutung des Scavenger Rezeptors Klasse B Typ I (SR-BI) für die zelluläre Phospholipidaufnahme

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stephanie Urban

aus

München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. B. Engelmann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Lorenz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. D. Jungst
	Prof. Dr. K. Beyer
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr.h.c.K.Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	09.01.2003

Meinem Großvater Hans Urban gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 4

1.1 Biologische Bedeutung von Phospholipiden 4

1.2 Funktionen von Plasmalipoproteinen 6

1.3 Die selektive Phospholipidaufnahme in Zellen 11

1.4 Bisherige Erkenntnisse über SR-BI 12

1.5 Zielsetzung 15

2 Materialien und Methoden 16

2.1 Materialien 16

2.1.1 Chemikalien 16

2.1.2 Puffer und Medien 17

2.1.3 Geräte 19

2.2 Methoden 19

2.2.1 Isolierung der Monozyten 19

2.2.2 Isolierung der Thrombozyten 21

2.2.3 Herstellung der Erythrozyten-Ghosts 21

2.2.4 Cholesterinbeladung und -Entleerung der Erythrozyten 22

2.2.5 Transfektion von Baby Hamster Kidney (BHK) Zellen 23

2.2.6 Kultivierung der BHK Zellen 24

2.2.7 Cholesterinentleerung der BHK Zellen mittels Cyclodextrin 25

2.2.8 Herstellung der Phospholipid-Donatoren 25

2.2.9 Fluoreszenzmessungen 27

2.2.10 Analyse des Phospholipideinbaus mit ^{14}C-markierten Phospholipiden 29

2.2.11 Western Blot Analysen 29

2.2.12 Northern Blot Analysen 30

3 Ergebnisse 31

3.1 SR-BI vermittelter Phospholipidimport in Monozyten 31

3.1.1 SR-BI in Blutzellen 31

3.1.2 Phospholipidtransfer aus Lipoproteinen in Monozyten 32

3.1.3 Phospholipidimport aus Vesikeln 35

3.1.4 Hemmung des Phospholipidimportes durch unmarkierte Lipoproteine 36

3.2 Phospholipidimport in SR-BI transfizierte Baby Hamster Kidney (BHK) Zellen 37
3.2.1 Überexpression von SR-BI in BHK Zellen 37
3.2.2 Phospholipidimport in Zellen mit SR-BI Überexpression 38
3.2.3 Phospholipidtransfer aus Lipoproteinen 39
3.2.4 Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit der zellulären Sphingomyelinaufnahme aus LDL 41
3.2.5 Import von ^{14}C-Phospholipiden 43
3.3 Rolle von Caveolae beim Phospholipidimport 44
3.4 Phospholipidimport in Erythrozytenghosts 45

4 Diskussion 47
4.1 Verwendung Fluoreszenz markierter Phospholipide zur Analyse der Lipidaufnahme in Zellen 47
4.2 Phospholipidimport in Blutzellen 48
4.3 SR-BI vermittelter Phospholipidtransfer aus verschiedenen Phospholipiddonatoren 49
4.4 Abhängigkeit der Spezifität des Phospholipidtransfers vom Phospholipiddonator 51
4.5 Mechanismus des Phospholipidtransfers 53
4.6 Bedeutung der Caveolae 54

5 Zusammenfassung 57

6 Literatur 59

7 Danksagungen 72

8 Lebenslauf 73

9 Veröffentlichungen 75

Verwendete Abkürzungen

ACTH	Adenocorticotropes Hormon
Apo A-I	Apolipoprotein A-I
BBMV	Brush border membrane Vesikel
BHK	Baby hamster kidney
CD	Cluster of differentiation
CTAPIII	Connective tissue-activating peptide III
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HDL	High density lipoprotein
IDL	Intermediate density lipoprotein
LDL	Low density lipoprotein
PAP	Plättchenarmes Plasma
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phosphatidylethanolamin
PRP	Plättchenreiches Plasma
Py	Pyrendecanoat
SF-1	Steroidogenic factor 1
SM	Sphingomyelin
SR-BI	Scavenger receptor Klasse B Typ I
TG	Triglyceride
VLDL	Very low density lipoprotein

1 EINLEITUNG

1.1 Biologische Bedeutung von Phospholipiden

Zellmembranen bestehen aus einer von Phospholipiden gebildeten Lipiddoppelschicht. Die Phospholipide setzen sich aus einem Glyzeringerüst, einer polaren Kopfgruppe und einem hydrophoben Anteil von Fettsäuren zusammen (*Abb.1*).

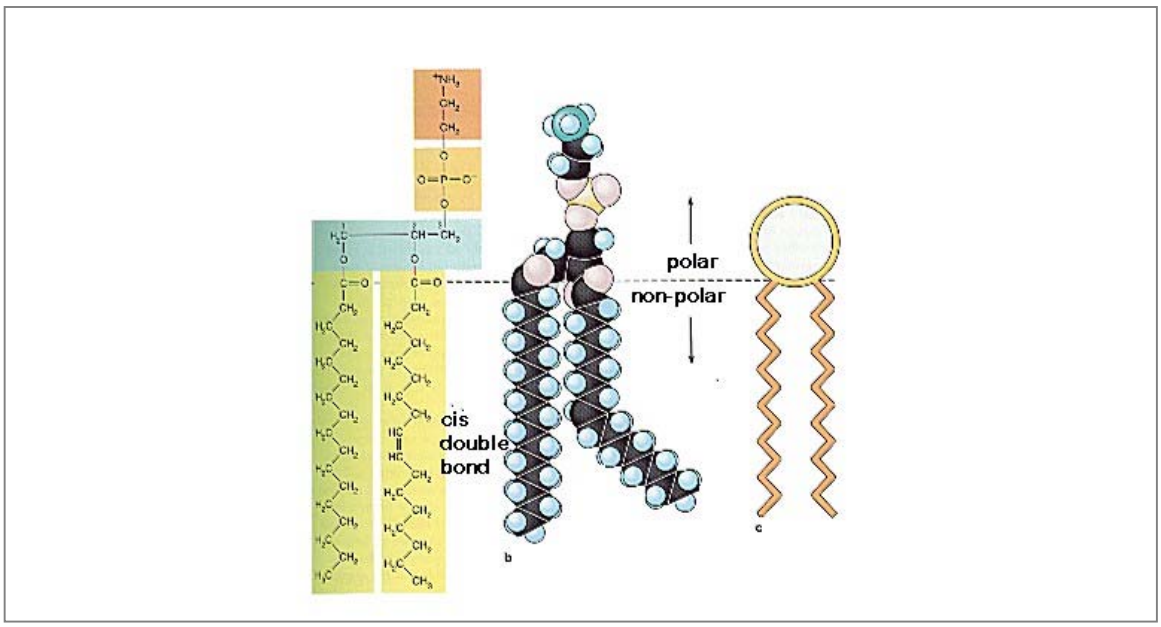


***Abb.1* Struktur von Phospholipiden** *(aus Wolfe S.L., Molecular and Cellular Biology, Wadsworth Publishing Company, 1993, Seite 155).*

Phospholipide spielen bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse eine entscheidende Rolle, so z.B. bei der intrazellulären Signalübertragung[51,22] und als Cofaktor für Enzymkomplexe, die die proteolytische Aktivierung von Gerinnungsfaktoren vermitteln[79,62]. Phospholipide sind asymmetrisch über die beiden Blätter der Plasmamembran von Zellen verteilt[4] (*Abb.2*). In der inneren Schicht finden sich hauptsächlich negativ geladene Phospholipide (Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol) sowie Phosphatidylethanolamin (PE). Das äußere Blatt besteht vorwiegend aus den neutralen Phospholipiden Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM).

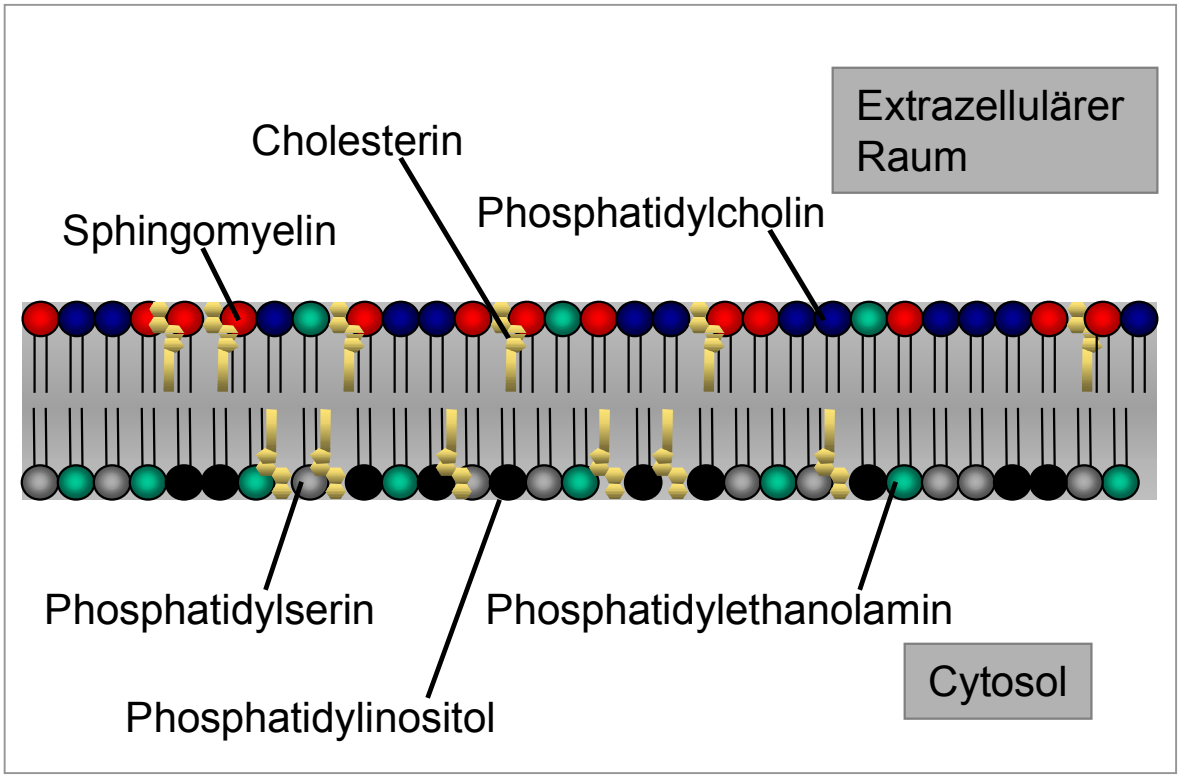


Abb.2 ***Strukturmodell der Plasmamembran.*** *Die Phospholipide sind asymmetrisch über die beiden Blätter verteilt (modifiziert nach 4).*

Diese Asymmetrie wird durch eine Reihe von Membranproteinen aufrecht erhalten, die in den letzten Jahren teilweise identifiziert wurden[8,9,18,63]. Eine sogenannte Aminophospholipid Translokase ist offensichtlich für den Transfer von Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin aus der äußeren in die innere Schicht der Plasmamembran verantwortlich. Ein als "Floppase" bezeichnetes Membranprotein scheint weniger spezifisch sowohl Amino- als auch Cholinphospholipide aus dem inneren Blatt in das äußere zu transportieren. Ein weiterer bekannter Lipidtransporter in der Plasmamembran ist die "Scramblase". Die Verteilung der Phospholipide zwischen den beiden Schichten kann sich unter verschiedenen Bedingungen ändern. So wird z.B. bei der Plättchenaktivierung, der Zellalterung und der Apoptose Phosphatidylserin in die äußere Zellmembran transferiert und dort angereichert[25,26,46,55].

Auch innerhalb einer Lipidschicht der Zellmembran sind die Phospholipide nicht homogen verteilt. So existieren nach neueren Erkenntnissen laterale Domänen, in denen bestimmte Lipide und Proteine angereichert sind. Laterale Domänen

aus Sphingomyelin bzw. Glykophospholipiden und Cholesterin werden als Rafts bezeichnet[5,11]. Eine spezielle Form der Rafts stellen die Caveolae dar, diese Membrandomänen weisen neben den Sphingolipiden und Cholesterin das Membranprotein Caveolin-1 auf. Um die spezifische Zusammensetzung der beiden Membranblätter der Zellmembran aufrechtzuerhalten, bedarf es eines minutiös regulierten Ein- und Ausbaus der Lipide. Als Quelle für die Phospholipide der Zellmembran kommen eine ganze Reihe von Systemen infrage. Die Zelle besitzt einen komplexen Synthesemechanismus für Phospholipide, der vorwiegend im endoplasmatischem Retikulum lokalisiert ist. Neu synthetisierte zelluläre Phospholipide gelangen über verschiedene Wege in die Zellmembran, u.a. über einen Zwischenstopp am Golgi Apparat. Phospholipide werden auch in der Leber synthetisiert und vor allem verpackt in Lipoproteine in das Blut sezerniert. In der Tat findet der Transport von Phospholipiden in extrazellulären Kompartimenten (Blut, Lymphe, Interstitium) hauptsächlich über Lipoproteine statt. Bei der Aufnahme von Phospholipiden und anderen Lipiden in die Zelle spielt die Endozytose von LDL über den klassischen LDL-Rezeptor eine bedeutende Rolle.

1.2 Funktionen von Plasmalipoproteinen

Im menschlichen Organismus können die Lipoproteine aufgrund ihrer Dichte in vier Hauptklassen unterteilt werden. Diese stellen die Low Density Lipoproteine (LDL), die High Density Lipoproteine (HDL), die Very Low Density Lipoproteine (VLDL) und die Chylomikronen dar. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die wasserunlöslichen Fette im Blut zu transportieren. Lipoproteine sind aus unterschiedlichen Proteinkomponenten und einem je nach Art des Partikels variablen Anteil an Triglyceriden, Cholesterin und Phospholipiden aufgebaut und können noch anhand weiterer Kriterien unterschieden werden (*Tab. 1*).

Strukturmodelle zeigen, dass die Phospholipide der Partikel zusammen mit freiem (unverestertem) Cholesterin in einer einfachen Schicht (Monolayer) um einen hydrophoben Kern angeordnet sind. Ein großer Teil der Oberfläche wird zudem von den Apolipoproteinen bedeckt, deren hydrophile Seitenketten zum wässrigen Plasma gerichtet sind und deren hydrophoben Anteile sich dem Kern der Partikel zuwenden. Der Kern enthält vor allem verestertes Cholesterin und

***Tab. 1** Eigenschaften der Serumlipoproteine*

	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL
Durchmesser	100-1000 nm	30-70 nm	15-25 nm	7,5 - 10 nm
Lipid/Protein Verhältnis	99/1	90/10	78/22	50/50
Apolipoproteine	AI, AIV, CI-III, E, B_{48}	CI, CII, CIII, E, B_{100}	B_{100}, C, E	AI, AII, AIV, CI-III, E
Elektrophoret. Eigenschaften	Keine Beweglichkeit	Prä β–Lipoprotein	β-Lipoprotein	α-Lipoprotein
Dichte (g/ml)	<0,95	<1,006	1,006-1,063	1,063-1,21

Triglyceride. Trotz der unterschiedlichen Zusammensetzung zeigen die verschiedenen Lipoproteine vermutlich einen prinzipiell ähnlichen Aufbau (*Abb. 3*).
Chylomikronen und die VLDL-Partikel sind besonders reich an Triglyceriden. Chylomikronen werden in den Mucosazellen der duodenalen Schleimhaut gebildet. Im Golgi-Apparat der Mucosazellen kommt es durch Resynthese der resorbierten Triglyceride und Assoziation mit Cholesterin, Phosphoglyceriden und diversen Apoproteinen (*Tab. 1*) zur Bildung von Chylomikronen. Durch Exozytose werden die Chylomikronen anschließend in den extrazellulären Raum abgegeben, sammeln sich in den intestinalen Lymphgängen und gelangen über den Ductus thoracicus in den Kreislauf. Die Triglyceride der Chylomikronen werden durch die Lipoproteinlipase, die sich an den Endothelzellen der Kapillaren sowie an der Plasmamembran extrahepatischer Gewebe befindet, in Glycerin und Fettsäuren gespalten. Die Fettsäuren werden von den extrahepatischen Geweben aufgenommen, das Glycerin gelangt zur Leber und wird dort metabolisiert. Die Chylomikronen sind damit für den Transport der aus der Nahrung aufgenommenen Triglyceride in das Blutsystem verantwortlich (*Abb.4*).
Die Synthese der VLDL Partikel verläuft prinzipiell ähnlich derjenigen der Chylomikronen, sie findet jedoch vorwiegend im Golgi-Apparat der Hepatozyten statt. VLDL wird von den Hepatozyten sezerniert und dient im Plasma dem Transport von Triglyceriden, die in den Leberzellen synthetisiert werden.

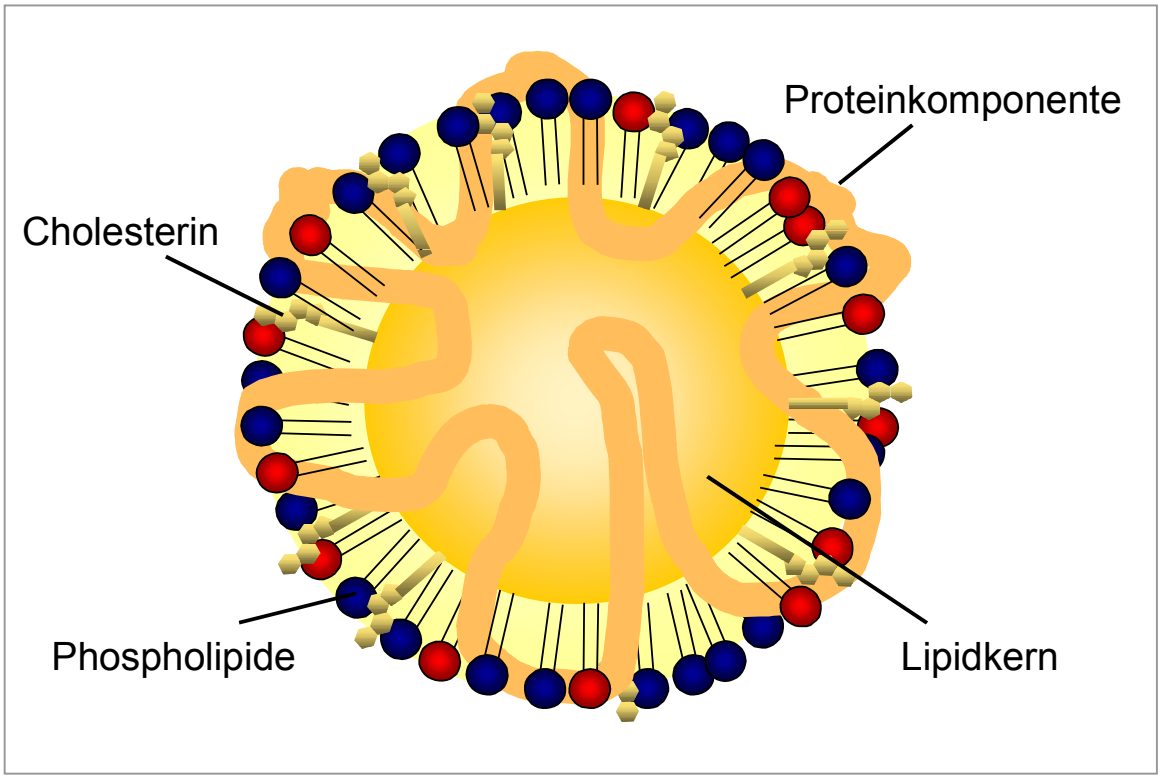


***Abb. 3* Strukturmodell der Lipoproteine** *(Beschreibung im Text).*

Am Kapillarendothel werden sie durch die Lipoproteinlipase gespalten, aus dem VLDL entsteht dadurch ein “intermediate density lipoprotein” (IDL), das wiederum als Präkursor für das LDL fungiert.

Von den Plasmalipoproteinen weisen die LDL-Partikel den höchsten Gehalt an Cholesterin und Cholesterinestern auf. Die Lipide werden über das LDL zu den extrahepatischen Geweben transportiert (*Abb.4*). Einem pathologisch erhöhten LDL-Cholesterin-Gehalt im Plasma wird eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Atherosklerose zugeschrieben. Dabei wird angenommen, dass das LDL im Laufe der Atherogenese in der Arterienwand angereichert und dort oxidativ modifiziert wird[42]. Oxidiertes LDL wird durch Scavenger Rezeptoren der Makrophagen erkannt[47]. Die ungeregelte, über die Scavenger Rezeptoren vermittelte Aufnahme des oxidierten LDL in die Makrophagen führt zur Bildung von Schaumzellen, einem charakteristischen Merkmal der frühen Atherogenese[28,29]. HDL wird ein protektiver Effekt gegenüber der Entwicklung der Atherosklerose zugeschrieben, u.a. indem es der Cholesterinablagerung in den

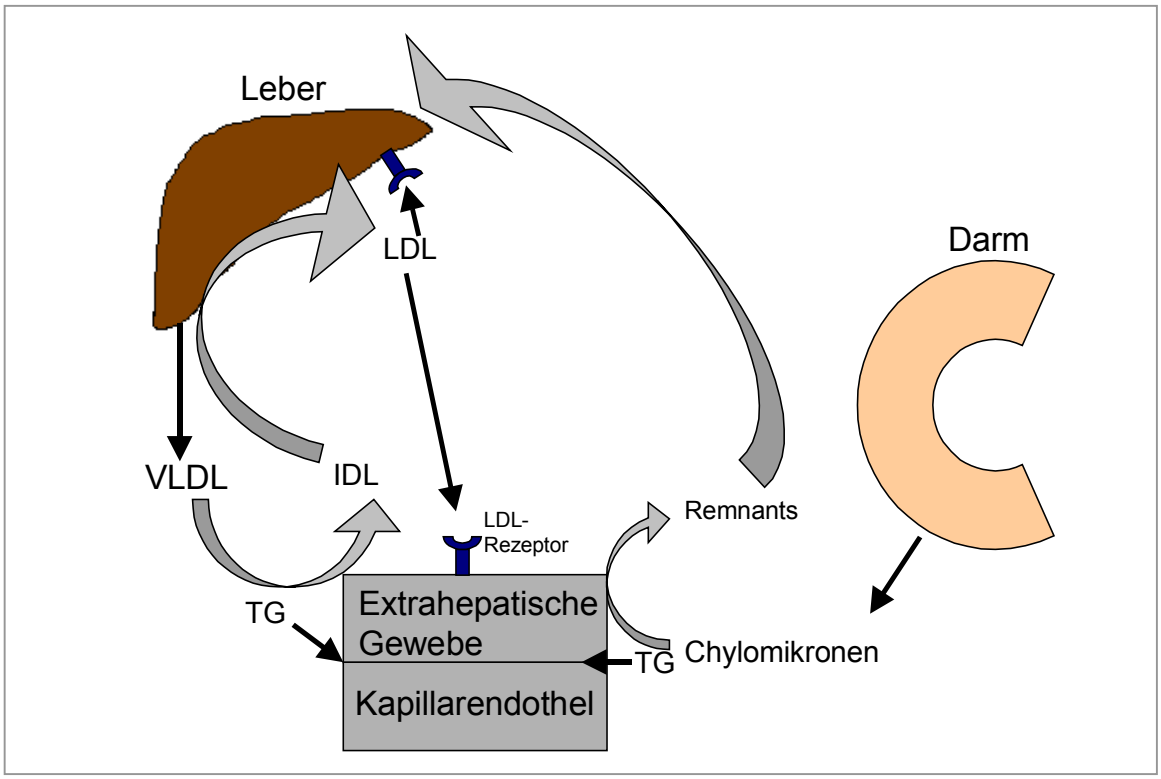


Abb.4 ***Stoffwechsel von Lipoproteinen*** *(Beschreibung im Text).*

Arterienwänden entgegenwirkt[66]. HDL transportiert Cholesterin von der Arterienwand und anderen Zellen der Peripherie zur Leber, ein Prozess, der als reverser Cholesterintransport bezeichnet wird[42,60] (*Abb. 5*). In der Leber werden aus Cholesterin Gallensäuren synthetisiert[10]. In der Nebennierenrinde, den Testes und den Ovarien werden aus Cholesterin Steroidhormone gebildet[35]. Jedoch transportieren die Lipoproteine abgesehen vom Cholesterin auch eine Vielzahl anderer Lipide. Dazu gehören insbesondere die Phospholipide. HDL besteht zu 30 Mol%, LDL zu 23 Mol% und VLDL zu 18 Mol% aus Phospholipiden. Aus den Arbeiten von Brown und Goldstein ist bekannt, dass LDL mittels Bindung an den klassischen LDL-Rezeptor von der Zelle endozytiert wird[12,32] (*Abb. 6*).

Durch die Bindung der Apoproteinkomponente B_{100} von LDL an den LDL-Rezeptor wird die Endozytose des Partikels und seines Rezeptors ausgelöst. Die Assoziation von Komplexen aus LDL und LDL-Rezeptor mit den Lysosomen

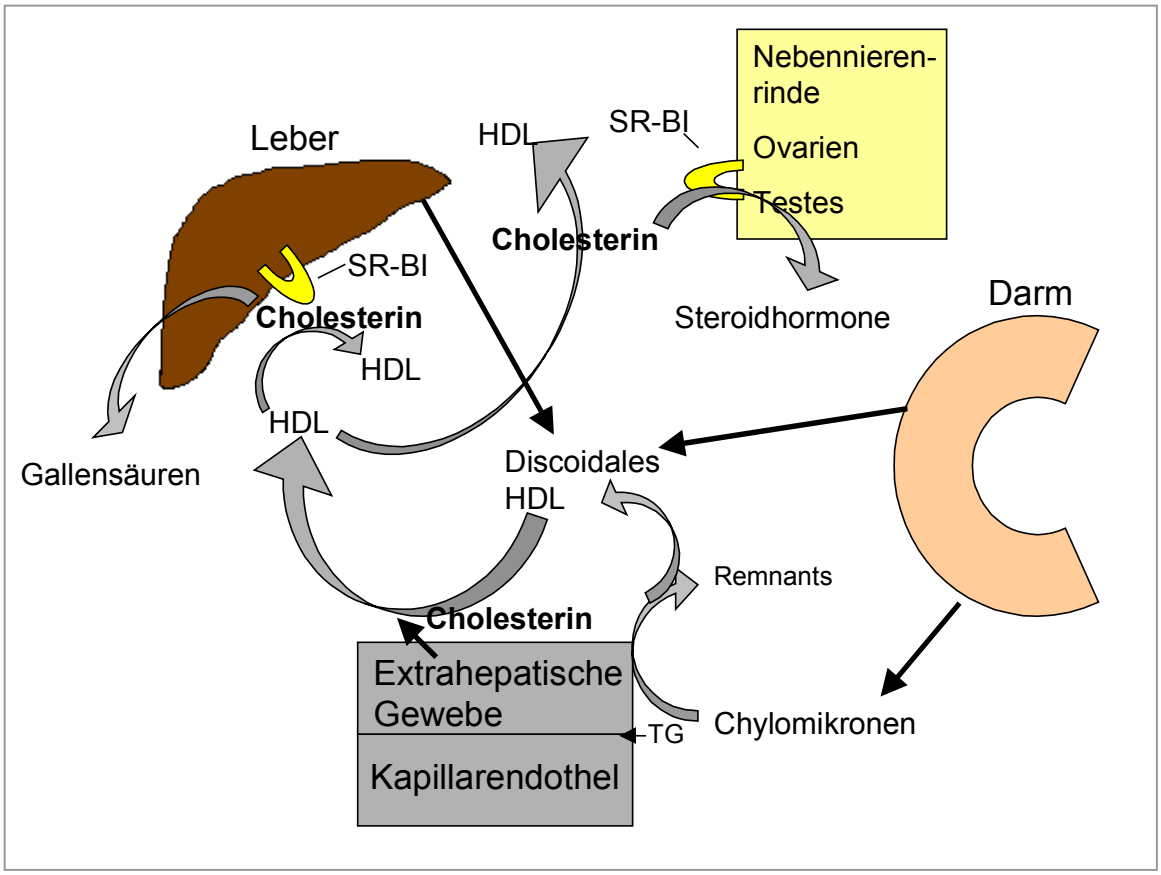


***Abb. 5* Reverser Cholesterintransport** *(Beschreibung im Text).*

führt zur Bildung sogenannter sekundärer Lysosomen, in denen die einzelnen Komponenten der Lipoproteine metabolisiert werden[42]. Unter anderem wird das Apoprotein B_{100} durch lysosomale Proteasen gespalten, wohingegen die Cholesterinester durch eine lysosomale saure Lipase hydrolysiert und als freies Cholesterin in das Zytoplasma abgegeben werden. Der LDL-Rezeptor gelangt wieder zurück an die Zellmembran. Über die Endozytose der Lipoproteine werden die Zellen auch mit Phospholipiden versorgt. Die Fähigkeit zur Endozytose des LDL variiert zwischen verschiedenen Zellen allerdings deutlich. So weisen z.B. Erythrozyten und Blutplättchen keine Endozytose der Lipoproteine auf, da ihnen der klassische LDL-Rezeptor fehlt. Interessanterweise wird HDL nur in geringem Umfang durch Endozytose in die Zellen aufgenommen.

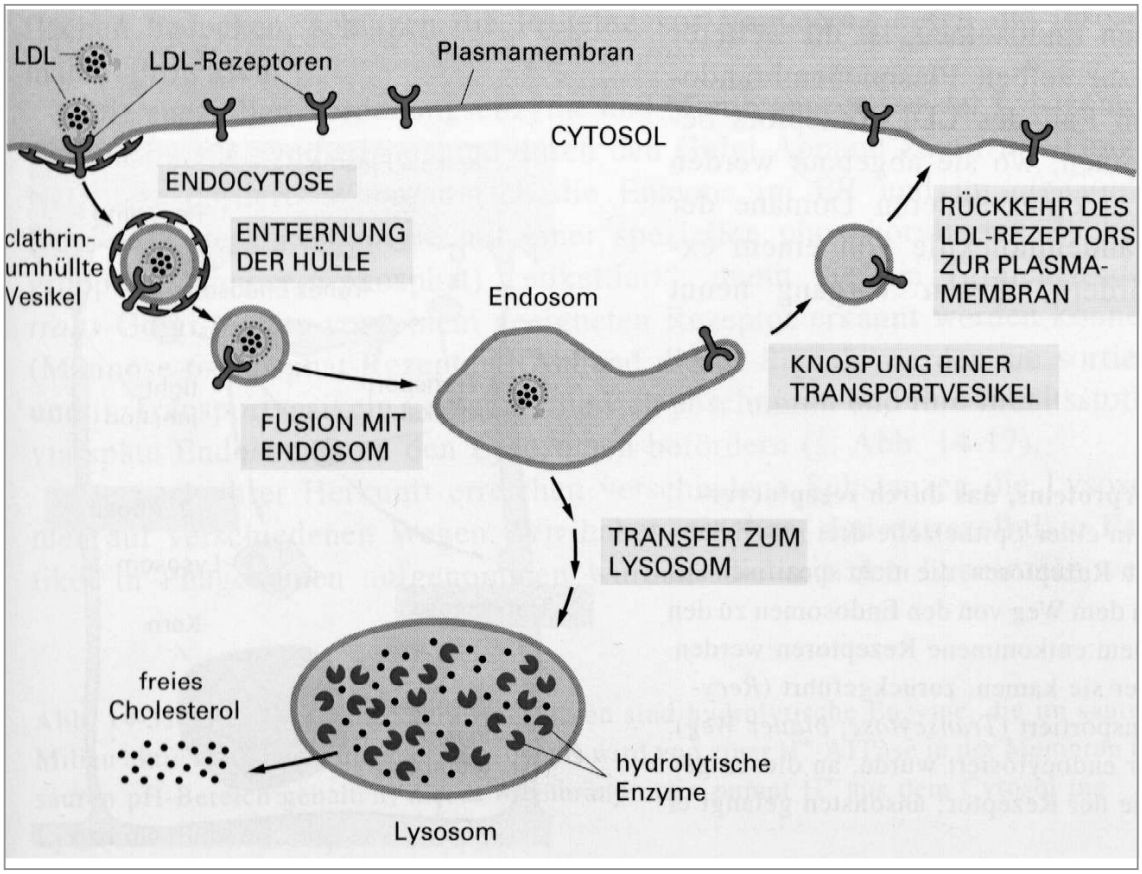


Abb. 6 ***Aufnahme von LDL durch LDL-Rezeptor vermittelte Endozytose*** *(Aus 4).*

1.3 Die selektive Phospholipidaufnahme in Zellen

Frühere Arbeiten an Blutzellen legten die Vermutung nahe, dass aus Lipoproteinen stammende Phospholipide in Zellen angereichert werden können[21,23]. Im Jahr 1996 wurde erstmals experimentell belegt, dass Plättchen Phospholipide über einen selektiven und proteinvermittelten Aufnahmeweg (endozytoseunabhängig) importieren[23]. Der Phospholipidimport dient offensichtlich u.a. der Versorgung von Blutzellen mit vielfach ungesättigten Fettsäuren, wie beispielsweise der Arachidonsäure, die für die Produktion von autokrinen und parakrinen Eicosanoiden unbedingt erforderlich ist (Thromboxan A_2)[20]. In der Tat liegen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Plasma nahezu ausschließlich in veresterter Form vor. Über den Phospholipidimport werden auch gerinnungsaktive Phospholipide in den Zellmembranen angereichert, wodurch die Aktivitäten von Komplexen der Gerinnungsproteine auf Zelloberflächen stimuliert werden[7,24]. Eine weitere Funktion der selektiven

Phospholipidaufnahme liegt in der Modulierung von interzellulären Signalübertragungsprozessen. So wird durch ein Sphingomyelin transferierendes Protein der Sphingolipid-Metabolismus von Leukozyten gesteigert[67]. Dieses Protein, das Chemokin Connective tissue-activating peptide III (CTAP III), das von aktivierten Plättchen sezerniert wird, vermittelt den Transfer von Sphingomyelin aus den SM-reichen LDL-Partikeln in periphere Blutlymphozyten. Der Mechanismus der selektiven Lipidaufnahme in Zellen ist bisher noch weitgehend unklar. Insbesondere ist unbekannt, welche Proteine den zellulären Phospholipidimport vermitteln. Seit Mitte der 80er Jahre legen Arbeiten verschiedener Autoren nahe, dass Zellen auch Cholesterin selektiv aufnehmen können, insbesondere aus den HDL-Partikeln[30,31,52].

1.4 Bisherige Erkenntnisse über SR-BI

Im Jahr 1996 identifizierten Acton und Mitarbeiter den sogenannten Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI) als erstes Protein, das die selektive Cholesterinaufnahme in Zellen katalysiert. SR-BI ist ein Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 82 kDa- 84 kDa, je nach zellspezifischem Glycosylierungsmuster[6,57]. Seine Struktur ist dem, zur gleichen Rezeptorfamilie gehörenden CD36 sehr ähnlich, die cDNA stimmt zu ca. 30% überein[47]. Strukturmodelle dieser beiden Rezeptoren zeigen zwei kurze N- und C-terminale intrazelluläre Anteile, zwei transmembranäre Regionen und eine große extrazelluläre Schleife[17] (*Abb. 7*).

Ursprünglich wurde SR-BI als Rezeptor für modifiziertes LDL (z.B. oxidiertes LDL) beschrieben[2]. SR-BI unterscheidet sich jedoch von den anderen Scavenger Rezeptoren darin, dass es auch natives LDL binden kann[47]. Dies legt eine besondere Bedeutung im Lipidmetabolismus nahe. In der bereits erwähnten Arbeit von Acton und Mitarbeitern wurde SR-BI als erster HDL-Rezeptor identifiziert[1]. Der genaue Mechanismus der Cholesterinaufnahme über SR-BI ist noch unklar[1,56]. Wichtig für die SR-BI vermittelte Internalisierung von Lipiden aus HDL ist, dass ein direkter Kontakt zwischen der Oberfläche des Lipoproteins und der Zellmembran zustande kommt[34]. Auch wenn zunächst hauptsächlich der selektive Lipidtransfer aus HDL untersucht wurde, legen neuere Studien nahe, dass auch aus LDL eine selektive Lipidaufnahme erfolgt[65].

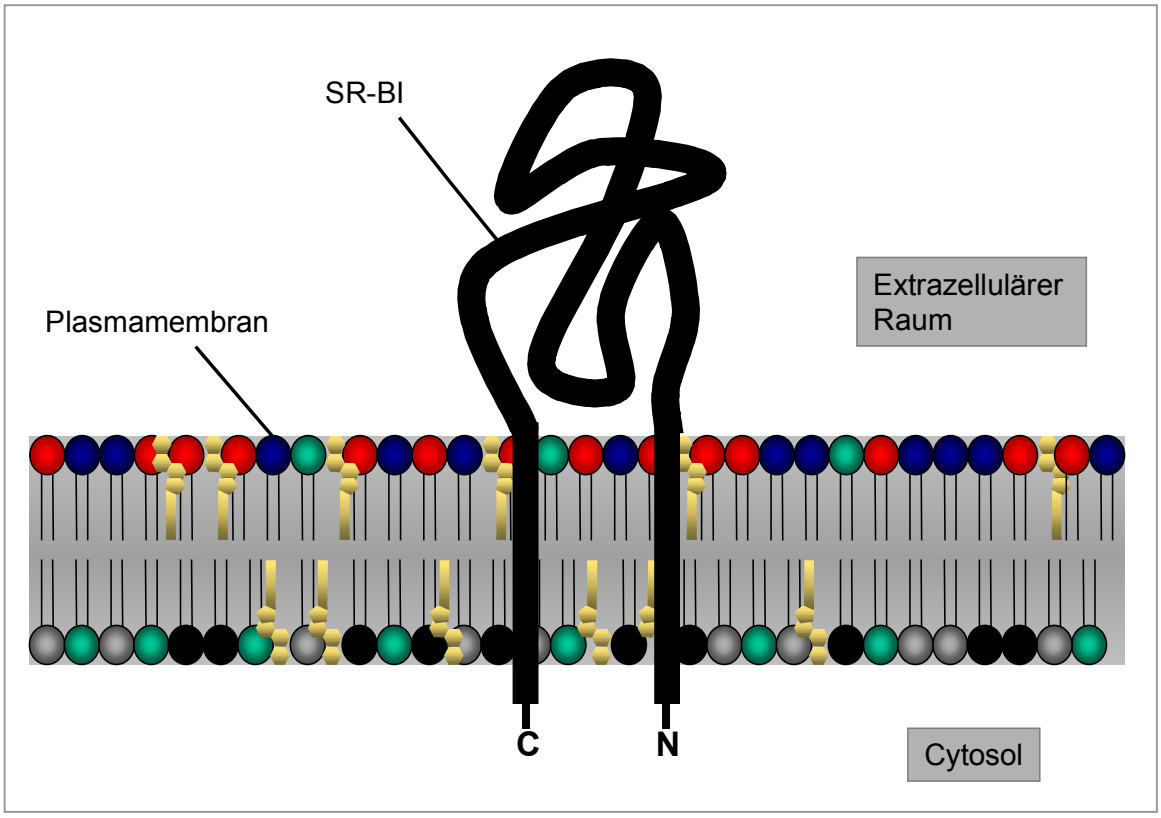


Abb. 7 ***Strukturmodell von SR-BI*** *(Beschreibung im Text).*

SR-BI ist vermehrt in Zellen exprimiert, die über HDL mit Cholesterin versorgt werden. Dazu gehören die Leber, die Nebennierenrinde, die Ovarien und die Testes. Die Leber kann das Cholesterin, das sie über SR-BI aufnimmt, speichern oder daraus Gallensäuren synthetisieren. Im Einklang mit dieser Überlegung bewirkt die Überexpression von SR-BI in der Leber eine Abnahme der Konzentration an HDL-Cholesterin im Plasma und eine Zunahme der Gallensäuresekretion[41]. Mehrere Studien, die anhand von Mutationen in vivo oder in SR-BI überexprimierenden Zellkulturen die Bedeutung von SR-BI untersuchten, bestätigen den Einfluss, den die Expression dieses Rezeptors für den HDL-Metabolismus hat[58,72,73]. SR-BI wird in der Zona fasciculata und Zona reticularis der Nebennierenrinde, dem Corpus luteum im Ovar und den interstitiellen Zellen der Testes stark exprimiert und vermittelt auch hier die selektive Cholesterinaufnahme[43,56]. Diese zunächst an Rattengeweben erhobenen Befunde konnten später auch an menschlichen Organen bestätigt werden[49]. Für die Zellen der Nebennierenrinde von Mäusen wurde gezeigt, dass sogar ein wesentlicher Teil des aus HDL über SR-BI aufgenommenen Cholesterin für die Synthese von Steroidhormonen verwendet wird[74]. Der

Nachweis von SR-BI während der Embryogenese weist auf eine Bedeutung dieses Membranproteins bei der Versorgung des Feten mit Cholesterin und damit auf sein Mitwirken an der Biogenese fetaler Zellmembranen und an der Synthese von Steroidhormonen hin[36,76].

Die Expression von SR-BI in den Zellen der Nebennierenrinde unterliegt ähnlichen Regulationsmechanismen wie die Synthese der Steroidhormone, da ACTH die Expression von SR-BI stimuliert, während Glucocorticoide die Synthese von SR-BI hemmen[56]. Der Transkriptionsfaktor “steroidogenic factor 1” (SF1) bindet an die Promotorregion des humanen SR-BI-Gens und stimuliert die Expression des Proteins. SF-1 reguliert auch die Expression von Enzymen der Steroidsynthese, wie z.B. die P450 17α-Hydroxylase, 21-Hydroxylase und die 11β-Hydroxylase[16]. Auch diese Ergebnisse belegen die Bedeutung von SR-BI für die Steroidhormonsynthese.

Als HDL-Rezeptor erfüllt SR-BI eine wichtige Funktion beim reversen Cholesterintransport. In diesem Zusammenhang vermittelt SR-BI offensichtlich auch den Efflux von Cholesterin aus den peripheren Geweben[38,39]. Die Beteiligung von SR-BI an dem Efflux von Cholesterin aus Zellen der Peripherie, und an der Aufnahme von Cholesterin in Cholesterin metabolisierende Zellen unterstreicht die Bedeutung dieses HDL-Rezeptors für den Metabolismus von Cholesterin im Organismus. Hauser und Mitarbeiter konnten darüber hinaus auch zeigen, dass SR-BI einen gewichtigen Anteil der Absorption von Cholesterin im Dünndarm katalysiert[37,75]. Es wurde die Expression von SR-BI sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Seite der Enterozyten nachgewiesen[14]. Im menschlichen Darm ist SR-BI im Bürstensaum von Enterozyten vom Duodenum bis zum Rektum exprimiert[45]. SR-BI bildet daher einen interessanten Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Reduktion des erhöhten Plasma-Cholesterin-Gehaltes bei Patienten mit Hyperlipidämie. Die wichtige Rolle, die SR-BI bei dem zellulären Austausch von Cholesterin spielt, veranlasste uns, die Funktion des Membranproteins beim zellulären Import von Phospholipiden zu untersuchen.

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit sollte zur Klärung der folgenden Fragestellungen beitragen:

1. Welche Rolle spielt SR-BI beim selektiven Phospholipidimport in Zellen?

2. Wie könnte der Mechanismus der Phospholipidaufnahme über SR-BI aussehen?

3. Welche Bedeutung haben sphingolipidreiche Domänen der Zellmembran (z.B. Caveolae) für den durch SR-BI vermittelten Phospholipideinbau?

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Amersham Pharmacia Biotech AB (Freiburg, D)

Ficoll-Paque Plus	Art.Nr. 17-1440-03

Gibco BRL (Life Technologies, Karlsruhe, D)

Optimem	Art.Nr. 31985-047
Geneticin	Art.Nr. 10131-027
Non-essential Aminoacids	Art.Nr. 11140-03

ICN Biochemicals Inc. (Eschwege, D)

Tris Ultra Pure	Art.Nr. 819623
Hydroxypropyl ß-Cyclodextrin	Art.Nr. 153540

Firma Linde (Linde AG, Höllriegelskreuth, D)

Argon

Stickstoff

Firma Merck (Merck, Darmstadt, D)

D-Glucose, wasserfrei	Art.Nr. 1107173
Kaliumchlorid	Art.Nr. 4936
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Art.Nr. 1.05833
Natriumhydrogenphosphat	Art.Nr. 6346

Firma Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, D)

CD14 MicroBeads	Art. Nr. 130050201
Magnetsäulen	Art. Nr. 130042201

Firma Molecular Probes (Leiden, Niederlande)

Cholesteryl-1pyrenhexanoat	Art.Nr. C-7795
N-(1-pyrendecanoyl)sphingosylphosphocholine	Art.Nr. P-3527
P1-hexadecanoyl 2(1-pyrendecanoyl)sn glycero-3phosphoethanolamin	Art.Nr. H-3784
Pyren Phosphatidylcholine	Art.Nr. H-361

Pan Biotech GmbH (Aidenbach, D)

MEM Eagle mit Earl´s Bss	Art.Nr. P04-08500
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Art.Nr. P0436500

Firma Roth (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D)

Hydroxyethyl-Piperazinyl-Ethan-Sulfonsäure (HEPES)	Art.Nr. 9105.4
Natriumchlorid	Art.Nr. 3957.1
Natriumhydrogencarbonat	Art.Nr. 8551.1
Tri Natriumcitrat Dihydrat	Art.Nr. 4088.1

Firma Sigma Aldrich (Steinheim, D)

Albumin vom Rind	Art.Nr. A-2153
Cholesterol	Art.Nr. C-3045
Calziumchlorid	Art.Nr. C-7952
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS)	Art.Nr. D-8537
Ethylendiaminetetraacetic Acid (EDTA), Dinatriumsalz	Art. Nr. ED2SS
Ethylendiaminetetraacid Acid, freie Säure	Art. Nr. E-9884
Ethylene Glycol bis (ß-Aminoethylether)N´, N´, N´, N´-Tetraacetic Acid (EGTA)	Art.Nr. E-4378
Hydrochlorid Acid, 1.0N	Art.Nr. H-9892
L-α-Phosphatidylcholine, dipalmitoyl (C16:0)	Art.Nr. P-0763
N-(10(1-pyren)decanoyl)Sphingomyelin	Art.Nr. P-4275
Phosphatidylcholin aus Ei	Art.Nr. P3556
Phosphatidylserin aus Rinderhirn	Art.Nr. P-7769
Trizma Hydrochlorid	Art.Nr. T-1535
Trizma Base	Art.Nr. T-1410

2.1.2 Puffer und Medien

A) Resuspendierungspuffer A (pH 7,35)

NaCl	138 mM	MG: 58,44	8,06 g/l
KCl	2,7 mM	MG: 74,56	0,20 g/l
NaHCO3	12 mM	MG: 84,01	1,00 g/l
NaH2PO4	0,4 mM	MG: 137,99	0,06 g/l
MgCl2	1 mM	MG: 203,30	0,20 g/l
D-Glucose	5 mM	MG: 180,16	0,90 g/l
Hepes	5 mM	MG: 238,31	1,20 g/l
CaCl2	2 mM	MG: 147,02	0,29 g/l

B) Resuspendierungspuffer B (pH 7,35)

NaCl	138 mM	MG:	58,44	8,06 g/l
KCl	2,7 mM	MG:	74,56	0,20 g/l
NaHCO3	12 mM	MG:	84,01	1,00 g/l
NaH2PO4	0,4 mM	MG:	137,99	0,06 g/l
MgCl2	1 mM	MG:	203,30	0,20 g/l
D-Glucose	5 mM	MG:	180,16	0,90 g/l
Hepes	5 mM	MG:	238,31	1,20 g/l

C) Monozytenwaschpuffer (pH 7,4)

BSA	0,15%ig
Na2EDTA	0,13%ig

In PBS (-)

D) Antikörperpuffer

BSA	0,5%
EDTA	5 mM

in PBS(-)

E) Plättchenwaschpuffer

NaCl	138 mM	MG:	58,44	8,06 g/l
KCl	2,7 mM	MG:	74,56	0,20 g/l
$NaHCO_3$	12 mM	MG:	84,01	1,00 g/l
NaH_2PO_4	0,4 mM	MG:	137,99	0,06 g/l
$MgCl_2$	2 mM	MG:	203,30	0,40 g/l
Glucose	5 mM	MG:	180,16	0,90 g/l

F) Lysierungsmedium (pH 7,2)

Tris	10 mM	MG:	121,00	1,2114 g/l
EGTA	1 mM	MG:	380,40	0,3804 g/l

F) Kaliummedium (pH 7,4)

KCl	150 mM	MG:	74,56	11,184 g/l
Tris HCl	10 mM	MG:	157,60	1,576 g/l
MgCl2	5 mM	MG:	203,30	1,0165 g/l
NaCl	5 mM	MG:	58,44	0,2922 g/l

G) ACD (pH 5)

Citrat	12 mM	MG: 210,14	3,15 g/l
TriNaCitrat	90 mM	MG: 294,10	26,47 g/l
NaH_2PO_4	16 mM	MG: 137,99	2,21 g/l
D-Glucose	160 mM	MG: 180,16	28,83 g/l

H) Kulturmedium für BHK Zellen

1x nonessentielle Aminosäuren

G418 0,8 mg/ml

FKS 10 %

In Eagle MEM (mit Glutamin)

I) Optimem

1x nonessentielle Aminosäuren

in Optimem

J) Aufbewahrungspuffer für Lipoproteine

Tris Base	10 mM	MG: 121,14	1,21 g/l
NaCl	150 mM	MG: 58,44	8,77 g/l
NaEDTA	0,3 mM	MG: 372,24	0,12 g/l

2.1.3 Geräte

Coulter Counter Z2, Coulter Europa, Krefeld

Spectrofluorophotometer RF 5001 PC, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg

Ultrazentrifuge Optima LE-80K, Beckman Instruments Inc. München

Ultraschallstab, Ultrasonics Inc.

Zentrifugen Heraeus Biofuge 13 und Function Line, Heraeus Instruments GmbH, München

Laminar Air Flow, Heraeus Instruments GmbH, München

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung der Monozyten

2.2.1.1 Herstellung der mononukleären Zellsuspension

Die Monozyten wurden aus frisch entnommenen Zitratblut gewonnen. Das Blut wurde zunächst bei 230 x g für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend das Plasma vorsichtig bis zu der, die weißen Blutzellen enthaltenden Schicht (buffy coat) abgezogen. Schließlich wurde das Buffy coat großzügig abgesaugt und in

ein 50 ml Röhrchen gegeben. Die Menge von 5 bis 10 ml des so gewonnenen Buffy coat wurden mit 13 ml isotonem Ficoll unterschichtet. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 500 x g und 22°C für 25 Minuten, wobei die Zentrifuge ohne Bremse auslief. Die entstandene Interphase wurde abgesaugt, in ein 50 ml Röhrchen gegeben und auf 50 ml mit Monozytenwaschpuffer aufgefüllt. Im Anschluss wurde die Lösung bei 200 x g und 22°C für 10 Minuten erneut zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde daraufhin gewaschen, indem der Überstand vorsichtig dekantiert und die Zellen in Waschpuffer resuspendiert wurden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 120 x g und 22°C für 10 Minuten. Zuletzt wurde der Überstand behutsam mit einer Pipette abgesogen, um eine möglichst geringe Anzahl an Zellen zu verlieren.

2.2.1.2 Präparation der Monozyten

Das Zellpellet wurde auf ca 200 µl mit Antikörperpuffer aufgefüllt. Zu 20 ml Vollblut bzw. 10^7 der mononukleären Zellen wurden 20 µl der anti-CD14 Antikörperlösung hinzugegeben und das Gemisch für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Magnetsäulen in der Magnethalterung wurden mit 500-1000 µl Antikörperpuffer gespült. Nach Aufsetzen des Flussbegrenzers wurde die Zellsuspension erneut mit Antikörperpuffer auf ein Volumen von einigen ml aufgefüllt und in einer Menge von je 1 ml auf die Säulen gegeben. Nachdem die Zellsuspension die Säulen passiert hatte, wurden diese mit je 3 x 500 µl des Antikörperpuffers ohne Flussbegrenzer gespült. Die in der magnetisierten Säule festgehaltenen, markierten Monozyten wurden dadurch eluiert, dass diese aus der Magnethalterung entnommen und mit je 2 ml Antikörperpuffer unter leichtem Druck mit dem Kolben in ein 50 ml Röhrchen ausgespült wurde.
Die erhaltene Zellsuspension wurde mit Monozytenwaschpuffer auf 35 ml aufgefüllt und bei 120 x g und 22°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette abgesaugt und das Pellet in ca. 500 µl Resuspendierungspuffer A gelöst.

2.2.1.3 Ermitteln der Monozytenkonzentration

Die Menge von 10 µl der in 2.2.1.2 gewonnenen Zellsuspension wurden mit 990 µl Resuspendierungspuffer A 1:100 verdünnt. Von dieser Lösung wurden ca. 20 µl 1:1 mit Trypanblau vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die intakten Monozyten stellen sich so angefärbt unter dem Mikroskop gelblich leuchtend dar. Es wurden vier Felder à 16 Kästchen ausgezählt und die

Konzentration der Zellen in der Zellsuspension aus nachfolgender Formel ermittelt:

Zellzahl x 80 000 x Verdünnungsfaktor (hier 100) = Zellen/ml

2.2.2 Isolierung der Thrombozyten

2.2.2.1 Herstellung der Plättchensuspension

Die Blutplättchen wurden aus frisch entnommenen ACD-Blut (1,43 ml ACD/10 ml Blut) gewonnen. Hierzu erfolgte zunächt eine Zentrifugation des Blutes bei 230 x g für 15 Minuten. Das überstehende, plättchenreiche Plasma (=PRP) wurde abgesaugt und das Thrombozytenpellet durch eine anschließende 10-minütige Zentrifugation bei 593 x g gewonnen. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Pellet behutsam mit der Pipette in ca. 1 ml Plättchenwaschpuffer resuspendiert. Danach wurden die Plättchen mit jeweils 5 ml Waschpuffer zweimal gewaschen (593 x g, 10 Minuten). Das entstandene Pellet wurde in 500 µl Resuspendierungspuffer A durch Aufsaugen und Ausspritzen mit der Pipette gelöst.

2.2.2.2 Ermitteln der Zellkonzentration

Die erhaltene Plättchensuspension wurde 1:100 verdünnt, aus der verdünnten Lösung 50 µl entnommen und mit 20 ml 0,9 prozentiger NaCl-Lösung versetzt. Hieraus wurde mit dem Coulter Counter zweimal die Zellzahl bestimmt, der Mittelwert berechnet und der zuvor ebenso ermittelte Leerwert subtrahiert. Daraus ergab sich die Plättchenzahl der Lösung (=Z). Die Thrombozytenkonzentration ließ sich mit nachfolgender Formel errechnen:

Z x 800 x Verdünnungsfaktor = Zellen/ml

2.2.3 Herstellung der Erythrozyten-Ghosts

2.2.3.1 Waschen der Erythrozyten

Die Erythrozyten wurden aus frisch entnommenen Zitratblut gewonnen. Das Blut wurde bei 1210 x g zentrifugiert, das Plasma inklusive des Buffy coat abgesaugt und verworfen. Ca. 600 µl der so verbleibenden, gepackten Erythrozyten wurden mit Resuspendierungspuffer A auf 10 ml aufgefüllt und mit einem Spatel vorsichtig zu einem homogenem Gemisch verrührt. Die nachfolgende

Zentrifugation erfolgte bei 1650 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt, die gepackten Erythrozyten erneut mit Resuspendierungspuffer A auf 10 ml aufgefüllt und homogen suspendiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt.

2.2.3.2 Herstellung der Ghosts

Um den Import fluoreszenz-markierter Phospholipide in die Erythrozyten mittels Spektrofluorometer messen zu können, wurden Erythrozytenghosts verwendet, Erythrozytenmembranen die kein Hämoglobin mehr enthalten. Je 1 ml der gepackten, gewaschenen Erythrozyten wurden mit 40 ml Lysierungsmedium vermischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei werden die Erythrozytenmembranen aufgebrochen und das Hämoglobin freigesetzt. Je 10 ml der Erythrozytensuspension wurden in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und für 20 Minuten bei 22 000 x g und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der, das Hämoglobin enthaltende Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die in Eiswasser stehenden, die Erythrozyten enthaltenden Röhrchen mit Lysierungsmedium aufgefüllt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (s.o.), um die Erythrozytenmembranen vom Hämoglobin zu reinigen, wurde der Überstand abgesaugt und die Röhrchen mit Kaliummedium aufgefüllt. Es folgte eine 60-minütige Inkubation bei 37°C. Dadurch verschließen sich die Erythrozytenmembranen wieder. In Anschluss an die, wie oben durchgeführte Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das aus den Ghosts bestehende Sediment in 500 µl Resuspendierungspuffer A gelöst.

2.2.4 Cholesterinbeladung und -Entleerung der Erythrozyten

2.2.4.1 Herstellung der Vesikellösungen

Um Erythrozyten mit Cholesterin anzureichern, bzw. es aus den Zellen zu entleeren, wurden verschiedene Vesikelarten aus Phosphatidylcholin (PC) mit unterschiedlichem Cholesteringehalt hergestellt. Für die Vesikel, die zur Cholesterinentleerung der Erythrozyten dienten (C-0), wurden 20 mg PC, für die Kontrollvesikel ohne Einfluss auf den Cholesteringehalt der Erythrozyten (C-N), 10 mg PC und 10 mg Cholesterin und für die Vesikel, die die Anreicherung von Cholesterin in den Erythrozyten bewirken (C-E), 7 mg PC und 13 mg Cholesterin verwendet. Die angegebenen Mengen PC und Cholesterin wurden vermischt

und unter Stickstoff im Wasserbad bei 37°C eingedampft. Das eingedampfte Gemisch wurde mit 4 ml Resuspendierungspuffer A versetzt. Nach Zugabe von 4 Glaskügelchen/ml wurde die Suspension mit dem Vortexer verrührt bis eine homogen trübe Lösung entstanden war. Nach Entfernung der Glaskügelchen wurden die Lipidgemische für je 3 x 10 Minuten mit einer jeweils zwei Minuten dauernden Unterbrechung im Eisbad und unter ständiger N_2-Zufuhr mit dem Ultraschallstab beschallt. Die dabei entstandenen Vesikellösungen wurde unter Argon verschlossen und bei 13.793 x g und 4°C für 35 Minuten zentrifugiert. Es wurden je 80% des Überstandes abgesaugt und als Vesikellösung verwendet.

2.2.4.2 Präparieren des Plasmas

Aus einigen ml PRP wurde durch Zentrifugation bei 1210 x g plättchenarmes Plasma (PAP) gewonnen. Das PAP wurde zur Denaturierung von Plasmaproteinen bei 56°C für 30 Minuten im Wasserbad behandelt. Anschließend wurde es 35 Minuten bei 13.793 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand im folgenden Schritt für die Inkubation der Erythrozyten mit den Vesikellösungen (aus 2.2.4.1) zur Cholesterinbe- bzw. entladung verwendet.

Für die Cholesterinbe-, bzw. entladung der Erythrozyten wurden je 1,6 ml der gepackten Erythrozyten mit 1,6 ml präpariertem Plasma (vgl. 2.2.4.2), 3,2 ml Vesikellösung (C-0, C-N, bzw. C-E aus 2.2.4.1) und 100 Einheiten/ml Penicillin/Streptomycin für 17 h bei 37°C im Schwenkwasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden aus den gepackten Erythrozyten Erythrozytenghosts hergestellt (siehe 2.2.3).

2.2.5 Transfektion von Baby Hamster Kidney (BHK) Zellen

Um die Rolle von SR-BI beim Phospholipidtransfer weiter zu beleuchten, wurden BHK Zellen mit der cDNA für humanen SR-BI transfiziert. Hierzu wurde zunächst die Gesamt-RNA von HepG2-Zellen verwendet, wobei 1 µg RNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) nach dem SuperScript one step kit Protokol (Life Technologies, Inc.) amplifiziert wurde. Die Primersequenzen für die Amplifizierung der humanen cDNA waren 5´–CCCAGGCGCGCAGACATGG (Forwardprimer) und 5´–TACAGTTTTGCTTCCTGCAG (Reversprimer). Das vorwiegende Amplikationsprodukt bestand aus 1546 Basenpaaren, inklusive der

gesamten kodierenden Region für SR-BI und zusätzlich 15 Basenpaaren am 5´- und einem Basenpaar am 3´-Ende. Die Sequenz wurde mittels ABI PRISM Big Dye terminator cycle sequencing Kit (PE Biosystems, Foster City, CA) verifiziert. Die cDNA wurde in den Expressionsvektor pBK-CMV (Strategene, La Jolla, CA) geklont. Die BHK-21 Zellen wurden unter Verwendung von LipofectAMINE Reagenz (Life Technologies, Inc.) transfiziert, indem das Lipid und 1 µg DNA separat voneinander mit je 100 µl Optimem verdünnt, anschließend vorsichtig vermischt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert wurden. Das Lipid-DNA-Gemisch wurde mit 0,8 ml Medium verdünnt und auf den subkonfluenten Zellrasen in Sechslochkulturplatten gegeben. Nach 6 h wurde EMEM (mit 10% FKS) auf die Zellen gegeben und für weitere 72 h inkubiert. Stabile Zellklone wurden nach Neomycinresistenz in EMEM (mit 10% FKS und 0,8 mg/ml G418) selektiert. Die Transfektion der Zellen wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Budzinski (Boehringer Ingelheim Pharma KG) durchgeführt.

2.2.6 Kultivierung der BHK Zellen

Die mit der cDNA für humanen SR-BI transfizierten 91/4-2-Zellen sowie die entsprechenden Kontrollzellen (PCMV) wurden in T75er Zellkulturflaschen mit je 10 ml Medium im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO_2 unter sterilen Bedingungen kultiviert.

2.2.6.1 Passagieren der Zellen

Vor dem Passagieren wurden die Kulturen zweimal mit je 5 ml PBS(-) gewaschen. Anschließend wurden sie für ca. 1 Minute mit 1 ml Trypsin inkubiert bis sich die Zellen von der Kulturflasche lösten. Die so gewonnenen Zellen wurden auf die neuen Flaschen im Verhältnis 1:10 (PCMV-Zellen) bzw. 1:8 (91/4-2-Zellen) aufgeteilt. Nach Zugabe von 10 ml Kulturmedium wurde das Zellen-Medium-Gemisch durch Schwenken gleichmäßig auf dem Boden der Zellkulturflasche verteilt. Alle Schritte wurden unter dem Laminar Air Flow unter sterilen Bedingungen mit sterilen Medien und Instrumenten durchgeführt.

2.2.6.2 Aufbereitung der Zellen

Nach der Passage wurden die Zellen für 48 h kultiviert. Anschließend erfolgte der Mediumwechsel durch einmaliges Waschen mit PBS(-), Ersetzen des Kulturmedium durch Optimem und anschließende Inkubation für 24 h bei 37°C

im Brutschrank. Am Versuchstag wurden die Zellen zweimal mit PBS(-) gewaschen um tote Zellen zu entfernen und zum schonenden Ablösen der adherenten Zellen mit 1 ml einer 2 mM EDTA-Lösung (mit 0,5% BSA) im Brutschrank inkubiert, bis sich der Zellrasen durch leichtes Klopfen an die Kulturflasche lösen ließ. Die Zellen wurden mit 5 ml Resuspendierungspuffer B abgespült und in ein 15 ml Falcon Röhrchen gegeben. Sie wurden bei 120 x g für 10 Minuten zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Resuspendierungspuffer B gelöst. Die Menge von 20 µl der Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau vermischt und die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt.

2.2.7 Cholesterinentleerung der BHK Zellen mittels Cyclodextrin

Transfizierte und Wildtyp BHK Zellen wurden in T25 Zellkulturflaschen passagiert und für 48 h mit EMEM kultiviert. Anschließend wurden sie einmal mit PBS gewaschen und 24 h mit Optimem inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden 2 ml Optimem mit 20 mg/ml Cyclodextrin zugegeben und die Lösungen für 30 bzw. 60 Minuten inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit 2 ml Optimem ohne Cyclodextrin behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen wie üblich gewaschen, gelöst und daraufhin der Einbau von Fluoreszenz-markierten Phospholipiden aus Vesikeln bzw. Lipoproteinen bestimmt.
Die Reversibilität der Cholesterinentleerung wurde untersucht, indem die zuvor Cholesterin entleerten Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 60 Minuten mit 2 ml Optimem inkubiert wurde, das zusätzlich Cyclodextrin (0,4 mg/ml) und Cholesterin (0,016 mg/ml) enthielt. Auch hier wurden die Kontrollzellen mit 2 ml Optimem ohne Zusätze inkubiert.

2.2.8 Herstellung der Phospholipid-Donatoren

2.2.8.1 Präparation der Phospholipidvesikel

Fluoreszenz (Pyrendecansäure (Pyren)) markierte Phospholipide (25 µg Pyren-SM, Pyren-PC, bzw Pyren-PE) und 75 µg Ei-PC, die in Chloroform/Methanol (2:1) gelöst waren, wurden vermischt und die Lösungsmittel anschließend bei 37°C verdampft. Nach Aufnehmen in 40 µl Ethanol wurden 20 µl in eine Hamiltonspritze aufgezogen und bei leichtem Rühren sehr langsam in 1 ml

Resuspendierungspuffer A gegeben. Durch das langsame Einbringen der Phospholipide in eine wässrige Phase bildeten sich bevorzugt kleine unilamelläre Vesikel. Die beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter ständiger Zufuhr von Stickstoff durchgeführt um die Oxidation mit Luftsauerstoff zu verhindern. Diesem Zweck diente ebenso die Lagerung unter Argon. Die Vesikellösung blieb so bei 4°C im Kühlschrank vor Licht geschützt höchstens einen Tag verwendbar.

2.2.8.2 Herstellung von Phospholipid markierten Lipoproteinen

Die Pyren markierten Phospholipide wurden in die Lipoproteine HDL bzw. LDL eingebracht, um deren Funktion als Phospholipiddonatoren zu untersuchen.
Hierzu wurde 3 ml PAP mit 0,58 mg NaN_3 (Endkonzentration 3 mM) und 0,27 ml DPNP (Endkonzentration 0,74 mM) versetzt und die Lösung in ein 10 ml Schliffröhrchen gegeben. Parallel dazu wurden Lösungen aus 3 mg Ei-PC und 1 mg Pyren-Phospholipid eingedampft und anschließend in 50 µl Ethanol gelöst. Das Gemisch wurde in eine Hamiltonspritze aufgezogen und unter Stickstoff sehr langsam in das vorbereitete Plasma gegeben. Danach erfolgte die Inkubation bei 37°C für 24 h unter Argon. Hierdurch wurde das markierte Phospholipid in die Lipoproteine des Plasmas eingebaut.

2.2.8.2.1 Isolierung der Lipoproteine

Nach der Inkubation wurden die Lipoproteine mittels Ultrazentrifugation, basierend auf ihrer unterschiedlichen Dichte aus dem Plasma isoliert. Zunächst wurde das Plasma in Quick Seal Ultrazentrifugenröhrchen gegeben, mit KBr Lösung (Dichte= 1,006 kg/m^3) aufgefüllt und das Röhrchen verschweißt, wobei eine kleine Luftblase über dem Plasma blieb. Die erste Ultrazentrifugation erfolgte bei 142.960 x g und 4°C für 20 h. Hierdurch bildete sich seitlich am Boden des Röhrchens ein kleiner Blutkuchen und eine darüber befindliche, gelbliche HDL/LDL-Phase. Es wurde vorsichtig mit einer Kanüle in die Luftblase eingestochen, um das Röhrchen zu belüften. Gegenüber des Blutkuchens wurde erneut eingestochen und mit einer Spritze die gelbliche HDL/LDL-Phase abgezogen. Diese wurde in ein Becherglas gegeben, 83,4 mg/ml KBr dazugefügt und die Lösung mit einem Rührfisch vermischt. Das Gemisch wurde erneut in ein Quick Seal UZ-Röhrchen gegeben, das mit KBr Lösung (d=1,063 kg/m^3) aufgefüllt und verschlossen wurde. Die zweite Ultrazentrifugation erfolgte bei 142.960 x g und 4°C für 24 h. Hierdurch bildete sich eine oben liegende,

weißliche LDL-Phase. Das Röhrchen wurde durch Einstechen belüftet und die dabei austretende Flüssigkeit sofort mit einer Spritze aufgenommen. Die weißliche LDL-Phase wurde abgesaugt und im Kühlschrank gelagert. Die unten liegende HDL-Phase wurde durch Einstechen mit einer Spritze abgenommen. Die Menge von 0,252 g/ml KBr wurden zugegeben, verrührt und das Gemisch in ein Quick-Seal Röhrchen gegeben, wiederum mit KBr-Lösung (d=1,220 kg/m^3) aufgefüllt und verschlossen. Die dritte Ultrazentrifugation erfolgte wiederum bei 142.960 x g und 4°C für 24 h. Anschließend wurde die oben liegende HDL-Phase abgesaugt.

2.2.8.2.2 Aufbewahrung und Dialyse der Lipoproteine

Um die aus 3 ml Plasma gewonnene, relativ geringe Menge an Lipoproteinen zu reinigen, wurden die Lipoproteinsuspensionen (HDL bzw. LDL) in Zentricons gegeben und mit Aufbewahrungspuffer auf ca. 1,5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Zur Verhinderung der Oxidation wurden die Lösungen mit Argon überschichtet und die Röhrchen mit Parafilm verschlossen. Nach der Zentrifugation bei 1.750 x g und 4°C verringerte sich das Volumen im Allgemeinen erheblich. Die Lipoproteinlösungen wurden noch zweimal mit Aufbewahrungspuffer aufgefüllt und wieder zentrifugiert. Um die Lipoproteine nach der Reinigung aus den Zentricons zu gewinnen, wurden diese umgedreht und bei 3.110 x g für 4 Minuten zentrifugiert. Die Lipoproteinlösungen wurden anschließend unter Argon im Kühlschrank gelagert.

Um die mit Pyren-SM, Pyren-PC oder Pyren-PE markierten Lipoproteine als Phospholipiddonatoren bei einem Versuch am Spectrofluorometer einsetzen zu können, wurden sie zuvor 1:100 mit Resuspendierungspuffer A verdünnt.

2.2.9 Fluoreszenzmessungen

2.2.9.1 Verwendete Messparameter

Die zur Markierung der Phospholipide verwendete fluoreszierende Pyrendecansäure wurde bei einer Wellenlänge von 343 nm angeregt. Die Emissionen wurden bei den Wellenlängen 378 nm (Monomer 1), 395 nm (Monomer 2) und 490 nm (Excimer) gemessen. Die Messung erfolgte alle 30 Sekunden. Die Messdauer für Plättchen, Monozyten und BHK Zellen betrug 10 Minuten und für Erythrozytenghosts 16 Minuten.

2.2.9.2 Bestimmung des Phospholipideinbaus

In direkter Nachbarschaft vorliegende Pyrenmoleküle regen sich gegenseitig an und emittieren Licht bei einer Wellenlänge von 470 nm (Excimeremission). Räumlich voneinander getrennte Pyrenmoleküle emittieren hingegen bei den Wellenlängen 378 nm (=Monomer1) und 395 nm (=Monomer2). Durch den Transfer der Phospholipide aus den Lipiddonatoren (Vesikel) in die Akzeptorzellen kommt es zu einer Zunahme der Monomerfluoreszenz in der Gesamtsuspension (*Abb. 8*). Der Grund hierfür liegt darin, dass die in die Akzeptorzellen inkorporierten Pyren-Phospholipide wegen ihrer relativ geringen Menge räumlich voneinander getrennt sind. Da gleichzeitig die Anzahl der Pyrenmoleküle in den Donatoren abnimmt, kommt es auch zu einer Verminderung der Excimer Fluoreszenz der Probe (*Abb. 8*). Daher erlaubt die Abnahme des Excimer/Monomer-Quotienten den besten Anhalt für die Quantifizierung des Phospholipideinbaus.

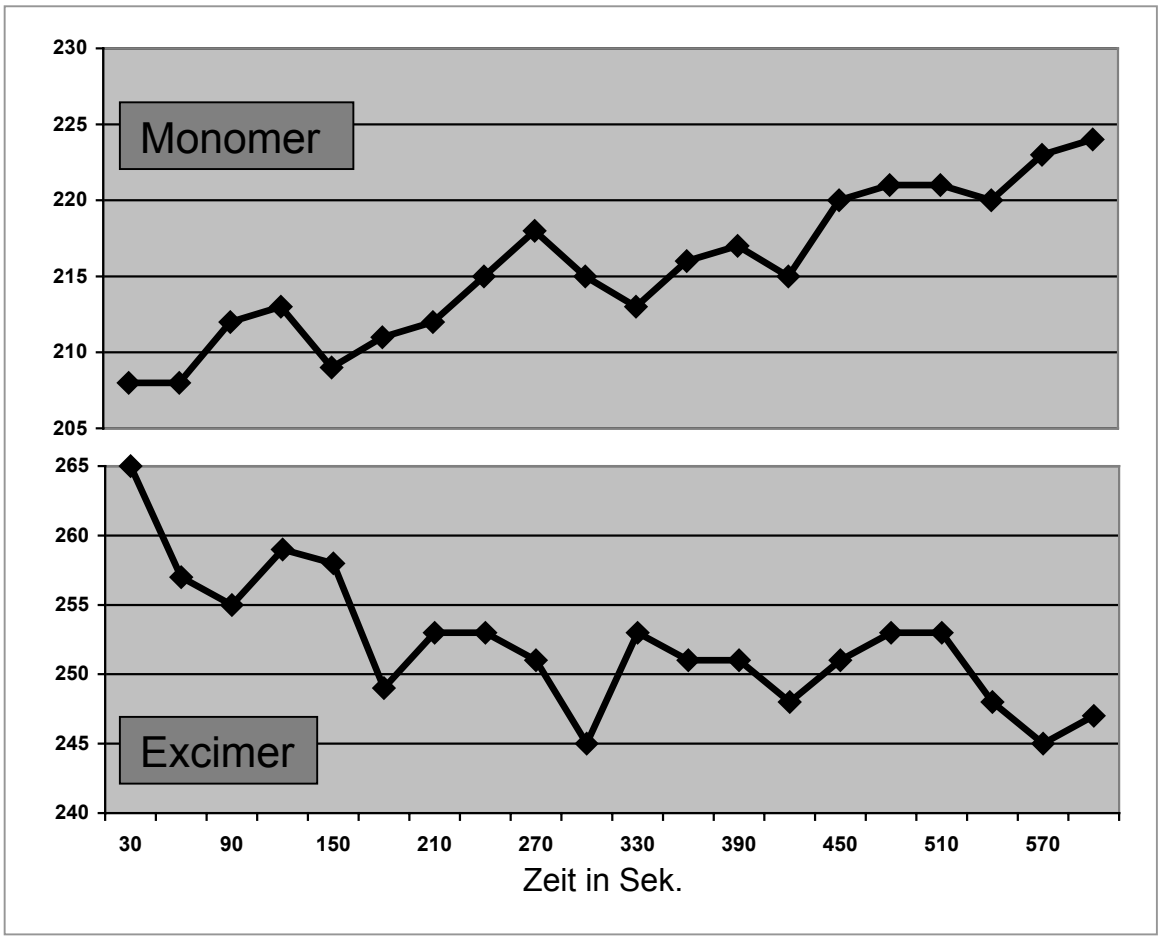


***Abb. 8* Monomer- und Excimersignale der Pyrenfluoreszenz während des Phospholipid-Transfers.** *Durch die selektive Lipidaufnahme kommt es zu einem Anstieg des Monomers und zu einem Abfall des Excimers.*

Zunächst wurde das Ausmaß, der durch den Lichteinfall ausgelösten Bleichung der Pyrenfluoreszenz bestimmt. 10-20 µl der Lösung mit Phospholipiddonatoren (Vesikel oder Lipoproteine) wurden ad 400 µl Resuspendierungspuffer in die Küvette gegeben und das Programm gestartet. Anschließend wurde die gleiche Menge der Donatorenlösung zu der Zellsuspension gegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Probe in die auf 37°C geheizte Küvette pipettiert und dann die Messung gestartet.

2.2.10 Analyse des Phospholipideinbaus mit ^{14}C-markierten Phospholipiden

Zur Bestätigung der mit den Pyren markierten Phospholipiden gewonnenen Ergebnisse wurden auch die radioaktiv ^{14}C-markierten Phospholipide SM und PC verwendet. Die Anreicherung der Lipoproteine mit den radioaktiven Phospholipiden erfolgte wie unter 2.2.8.2 beschrieben.

Zunächst wurden die BHK Zellen für den Versuch vorbereitet (vgl.2.2.6.2). Anschließend wurden 3 x 10^4 Zellen in 200 µl Resuspendierungspuffer B für 10 Minuten bei 37° mit ^{14}C-SM-, bzw. ^{14}C-PC-LDL inkubiert. Um das mit ^{14}C-SM, bzw. ^{14}C-PC-markierte, an der Zellmembran gebundene LDL zu entfernen, wurde anschließend für 45 Minuten mit einem 50-fachen Überschuss an unmarkiertem LDL gewaschen. Hierbei wurde die Zellsuspension im Wärmeschrank bei 37°C kontinuierlich geschüttelt, um eine gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten und ein Absetzen und Verklumpen der Zellen zu verhindern. Dann wurden die Zellen durch zweimalige Zentrifugation bei 210 x g mit Resuspendierungspuffer B gewaschen, in je 4 ml Szintillationsflüssigkeit gelöst und die zellassoziierte Radioaktivität bestimmt.

2.2.11 Western Blot Analysen

Um die Expression von SR-BI in verschiedenen Zellen darzustellen, wurden Western Blot Analysen verwendet. Hierbei wurden die isolierten Blutzellen in Elektrophoreseprobenpuffer aufgelöst und das Solubilisat mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE,10%) aufgetrennt. Nachdem die Proben auf PVDF Membranen transferiert wurden, wurden sie über Nacht mit dem ersten Antikörper inkubiert, einem polyklonalen in der Ziege generierten Antikörper, der gegen humanen SR-BI gerichtet ist (1:1000). Anschließend

wurde der sekundäre Anti-Ziegen Antikörper, der aus Schafserum gewonnen wurde, hinzugefügt (1:150000) und die Proteine mittels Chemilumineszenz (Immun-star, Bio-Rad, Glattbrugg, Schweiz) sichtbar gemacht.

2.2.12 Northern Blot Analysen

Um die Expression der SR-BI Messenger RNA (mRNA) in Zellen nachzuweisen, wurden Northern Blot Analysen verwendet. Hierbei wurde die gesamte RNA aus den Zellen nach dem RNeasy Kit Protokoll (Qiagen) extrahiert, hitzedenaturiert und anschließend je 10 µg/Lane auf einem 1,2 % Agaroseformaldehydgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf einen Nytran-N Filter (Schleicher + Schuell) wurde die RNA mit UV-Strahlung fixiert. Die Hybridisierung wurde mittels Rapid-Hyp System (Amersham Pharmacia Biotech) nach den Herstellerangaben durchgeführt, wobei die radioaktive Sonde aus einem Fragment menschlicher cDNA gewonnen wurde, das die komplette SR-BI kodierende Region enthielt. Die Markierung erfolgte mit [α^{32}-P]dCTP mittels “Random Priming” unter Verwendung des Rediprime Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech). Der Blot wurde mittels Storm 840 Phosphorimager (Molecular Dynamics) dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 SR-BI vermittelter Phospholipidimport in Monozyten

3.1.1 SR-BI in Blutzellen

Aus Ergebnissen anderer Autoren ist bekannt, dass SR-BI den selektiven Einbau von Cholesterin in Zellen vermittelt sowie als Rezeptor für HDL und LDL fungiert[2]. Wir analysierten daher die Rolle dieses Rezeptors bei der zellulären Aufnahme von Phospholipiden. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Plättchen Phospholipide hauptsächlich über einen endozytoseunabhängigen, protein-vermittelten Mechanismus aufnehmen[20]. Aus diesem Grund wurde zunächst analysiert, ob SR-BI in Blutplättchen exprimiert wird. Hierzu wurden Western Blots mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen humanen SR-BI durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten intestinale Caco-2 Zellen und Bürstensaummembranvesikel (Brush border membrane vesicles, BBMV), bei denen die für SR-BI typische Bande bei 84 kDa sichtbar wurde (*Abb. 9*). In den Solubilisaten von isolierten humanen Plättchen zeigte sich keine Bande. Dagegen konnte SR-BI in solubilisierten humanen Monozyten und Neutrophilen nachgewiesen werden. Die Differenzen der Molekulargewichte zwischen den Blut- und Darmzellen beruhen wahrscheinlich auf einem unterschiedlichen Glykosylierungsmuster des Proteins[6]. Um zu testen, ob SR-BI den selektiven Einbau von Phospholiden in Zellen vermittelt, wurden in den folgenden Experimenten zunächst die SR-BI positiven Monozyten verwendet.

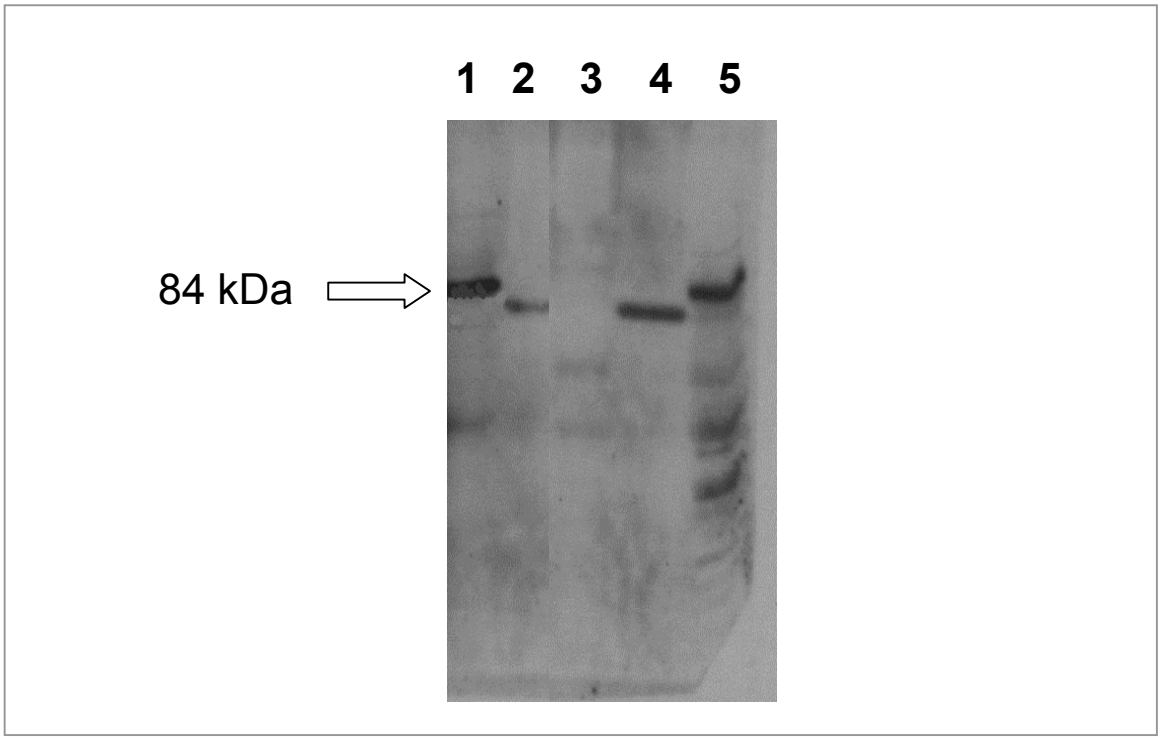


***Abb. 9* Western Blot Analyse zur Detektion von SR-BI in humanen Blutzellen.** *1, Kaninchen brush border membrane Vesikel (BBMV); 2,humane Monozyten; 3, humane Plättchen; 4, humane Neutrophile; 5, Caco-2 Zellen. Der aus Ziegen gewonnene, gegen menschlichen SR-BI gerichtete Antikörper wurde als primärer Antikörper verwendet. In jeder Reihe wurden etwa 50 µg Protein appliziert. Der Pfeil auf der linken Seite markiert die Position des 84 kDa Markerproteins.*

3.1.2 Phospholipidtransfer aus Lipoproteinen in Monozyten

Frisch gewonnene humane Monozyten wurden für 10 Minuten mit LDL inkubiert, das mit Pyren markierten Phospholipiden (py-SM, py-PC bzw. py-PE) angereichert war. Dabei zeigte sich, dass die markierten Phospholipide in die Zelle aufgenommen wurden (*Abb. 10*). Der Phospholipidimport war selektiv, da es hierbei zu einem Abfall des Excimer/Monomer Quotienten der Pyrenfluoreszenz kam (vgl. 2.2.9.2).

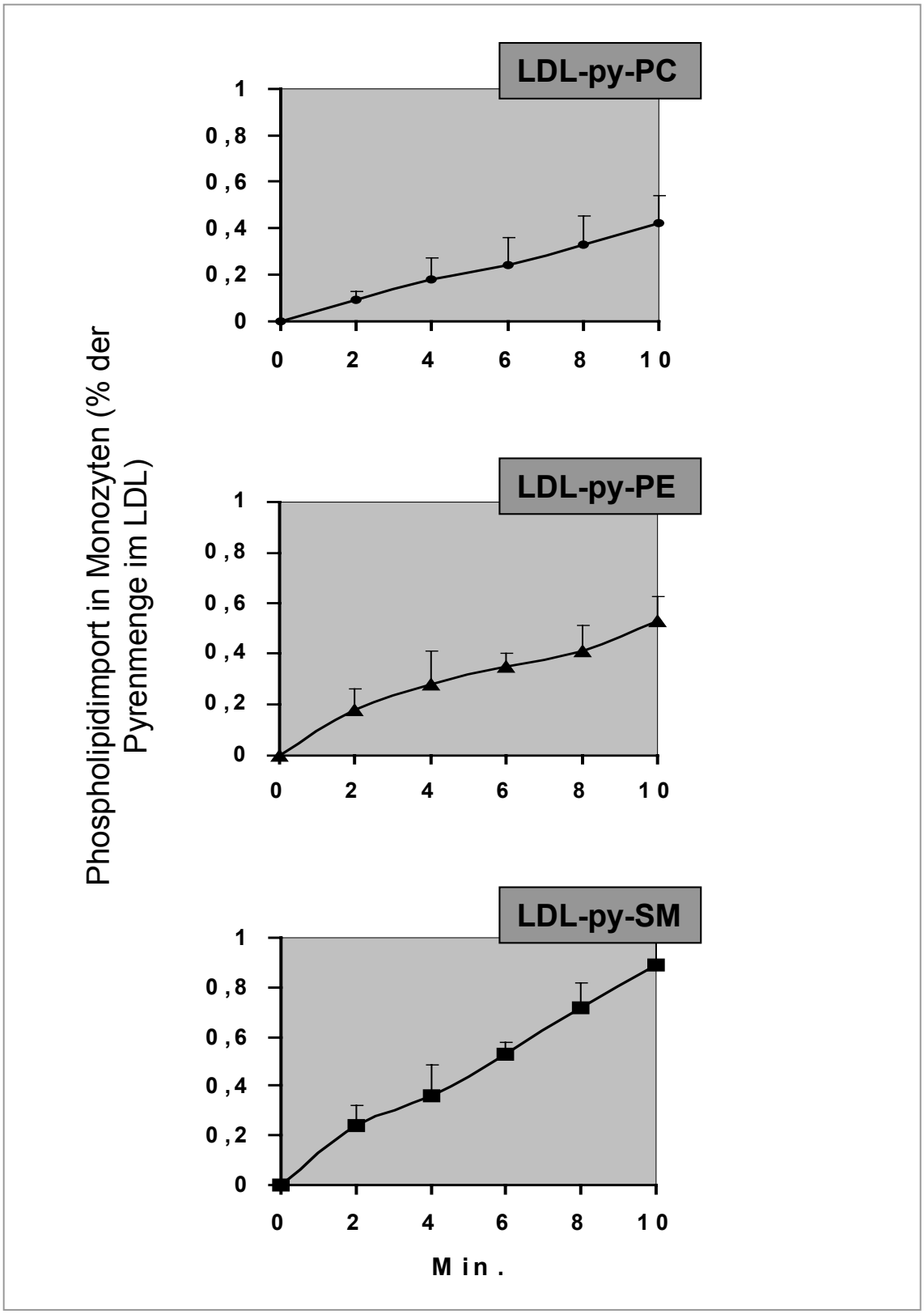


Abb. 10 ***Pyren-Phospholipidtransfer aus LDL in Monozyten.*** *Mit py-PC, py-PE und py-SM angereicherte LDL-Partikel (20 µg/ml) wurden für die angegebene Zeit mit Monozyten (10^6) bei 37°C inkubiert. Mittelwerte aus 3-6 unabhängigen Experimenten.*

Um die Rolle des SR-BI für den Phospholipidimport zu ermitteln, wurde ein gereinigter anti-human-SR-BI Antikörper verwendet, der gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors gerichtet war. Nach Zugabe des Antikörpers war der Phospholipidimport aus den LDL-Partikeln vermindert (*Tab. 2*). Es zeigte sich eine Reduzierung des Phospholipidtransfers um 40% für py-PC, 47% für py-PE und 44% für py-SM (*Tab. 2*). Auch aus HDL-Partikeln, die mit Pyren-Phospholipiden angereichert waren, fand ein selektiver Phospholipidtransfer statt. Dieser konnte ebenfalls mit anti-SR-BI Antikörpern gehemmt werden. Es kam zu einer Reduzierung des Importes um 36% für py-PC und um 44% für py-SM (*Tab. 2*). Ein irrelevanter Antikörper des gleichen Isotyps hatte auf den py-SM Transfer aus LDL keinen Effekt.

***Tab. 2* Hemmung des Phospholipidtransfers aus Lipoproteinen in Monozyten durch den anti-SR-BI Antikörper.** *LDL- und HDL-Partikel, die mit den angegebenen Pyren-Phospholipiden angereichert waren, wurden für 10 Minuten bei 37°C mit den Monozyten (10^6) in Anwesenheit und Abwesenheit des anti-SR-BI Antikörpers (0,1 mg/ml) inkubiert. Die Lipoproteinkonzentration betrug 20 µg Protein/ml, was einer Gesamtphospholipidmenge von 23 nmol (LDL) bzw. 26 nmol (HDL) entspricht. Mittelwerte +/- S.D. aus je 3-5 Experimenten.*

		Pyren-Phospholipidtransfer (% der Menge an py-Phospholipid im Lipoprotein)		
		Py-PC	py-PE	py-SM
LDL	Kontrolle	0.40 ± 0.11	0.53 ± 0.17	0.90 ± 0.38
	+ anti-SR-BI	0.24 ± 0.09	0.28 ± 0.06	0.50 ± 0.22
	+Isotyp-Antikörper	-	-	1.01 ± 0.08
HDL	Kontrolle	0.31 ± 0.09	-	0.32 ± 0.11
	+ anti-SR-BI	0.20 ± 0.07	-	0.18 ± 0.08

3.1.3 Phospholipidimport aus Vesikeln

Um die Rolle der Apoproteinkomponenten der Lipoproteine für den Transfer von Phospholipiden in die Zelle zu untersuchen, wurden als Phospholipiddonatoren Vesikel verwendet, die aus den jeweiligen Pyren markierten Phospholipiden und einer Matrix aus Ei-PC bestanden. Dabei zeigte sich, dass auch die Vesikel als Donatoren für den Phospholipidtransfer fungieren. In Gegenwart des anti-SR-BI Antikörpers wurde der Transfer der Phospholipide in Monozyten um 70% (py-PC), 77% (py-PE) und 62% (py- SM) gehemmt (*Abb. 11*).

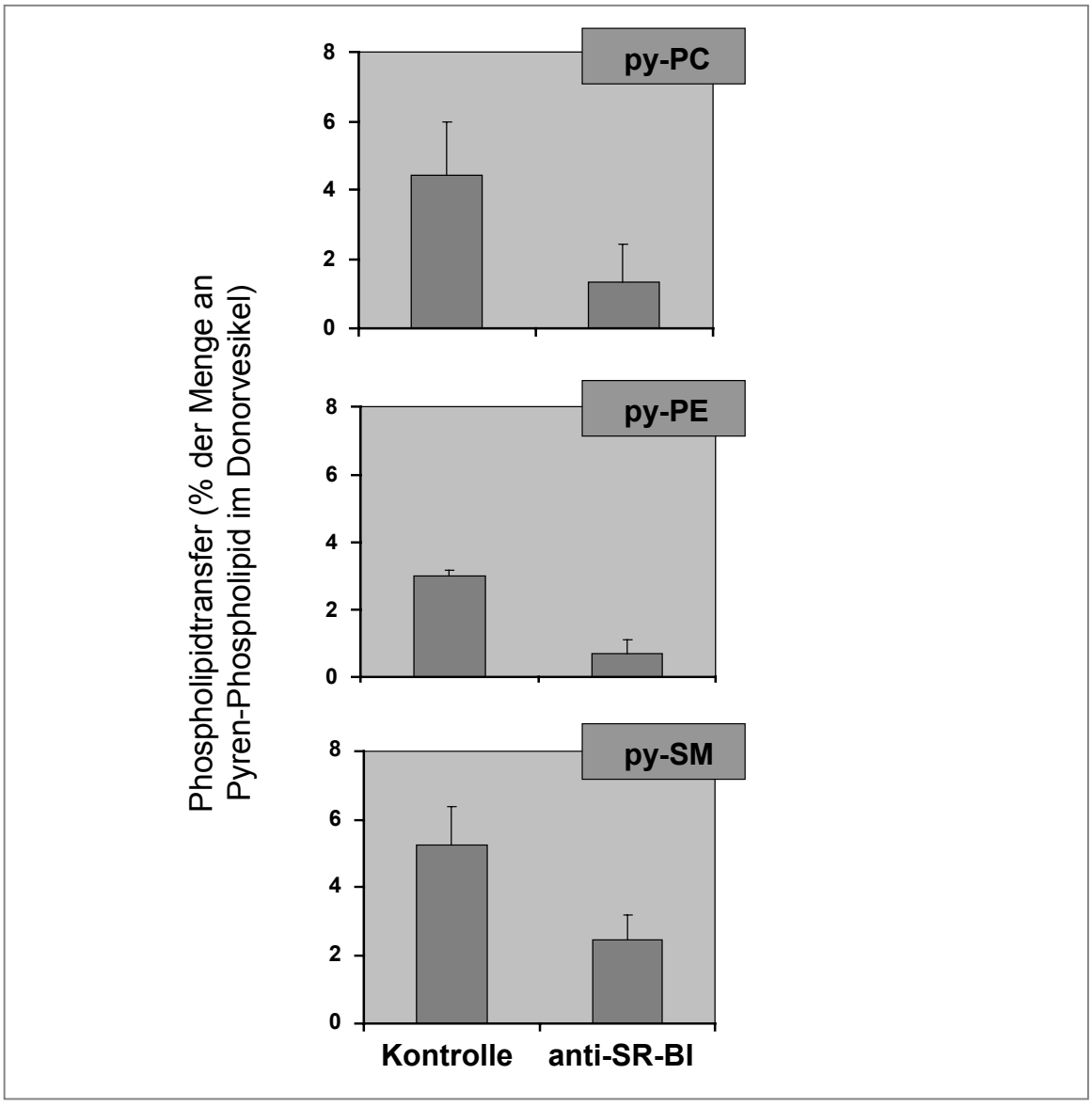


***Abb. 11* Einfluss des anti-SR-BI Antikörpers.** *Der Transfer von Pyren-Phospholipiden zwischen Lipidvesikeln und Monozyten wurde durch anti-SR-BI Antikörper gehemmt. Lipidvesikel (1,9 µg/ml Ei-PC und 0,6 µg/ml des angegebenen Phospholipids) wurden für 10 Minuten bei 37°C mit Monozyten (10^6) mit und ohne anti-SR-BI Antikörper (0,1 mg/ml) inkubiert. Mittelwerte +/- S.D. aus 4-6 Experimenten.*

3.1.4 Hemmung des Phospholipidimportes durch unmarkierte Lipoproteine

Durch die Zugabe von unmarkiertem HDL bzw. LDL konnte die Aufnahme von Phospholipiden aus Vesikeln gehemmt werden. LDL (20 µg Protein/ml) hemmte die Phospholipidaufnahme zwischen 75 und 93%, während HDL den Import um 53 bis 61% reduzierte (*Abb. 12*).

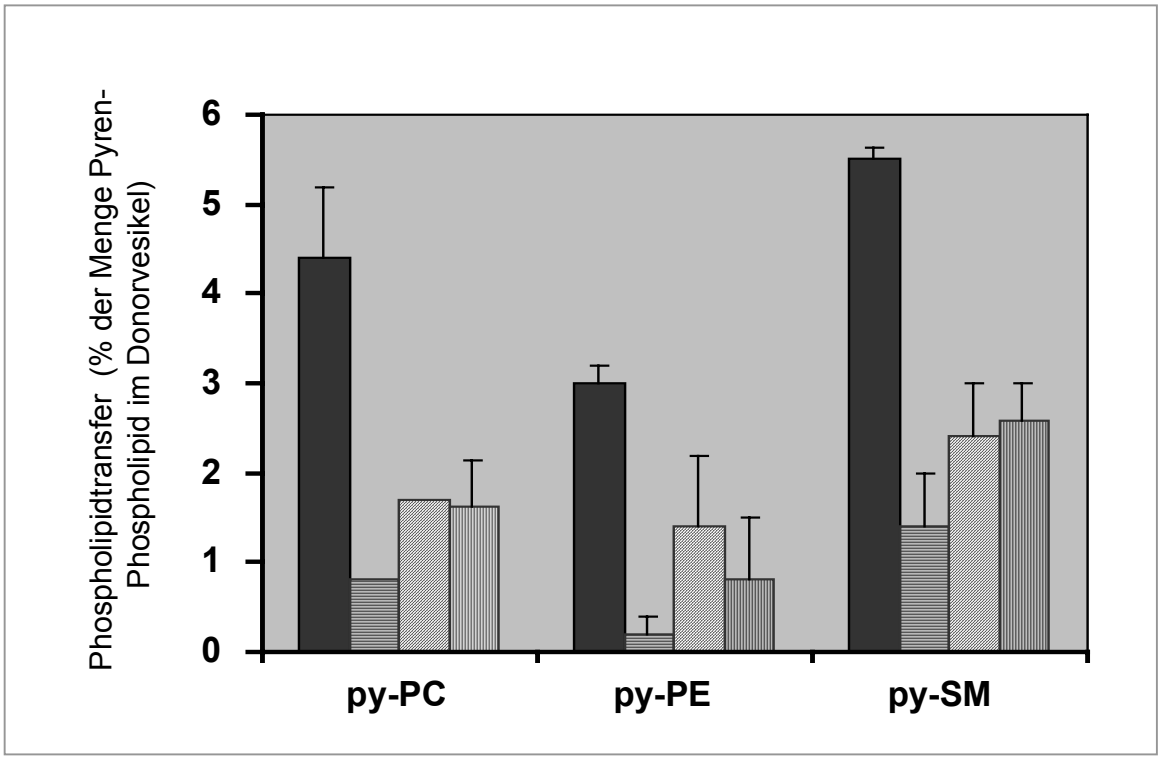


***Abb. 12* Hemmung des Pyren-Phospholipidtransfers durch Lipoproteine und Apo A-I.** *Lipidvesikel (1,9 µg/ml Ei-PC und 0,6 µg/ml des angegebenen py-Phospholipides) wurden für 10 Minuten bei 37°C mit Monozyten (10^6) inkubiert. Schwarze Säulen: Kontrolle; horizontal gestreifte Säulen: LDL (20 µg Protein/ml); diagonal gestreifte Säulen: HDL (20 µg/ml); vertikal gestreifte Säulen: ApoA-I (10 µg/ml), Mittelwerte +/- S.D. aus 4 Experimenten. Wo keine Standardabweichung angegeben ist, n=2.*

ApoA-I, ein HDL-spezifisches Apoprotein, verminderte bei einer Konzentration von 10 µg/ml den Phospholipidtransfer um 64% (py-PC), 73% (py-PE) und 53% (py-SM) (*Abb.12*). In Abb. 13 ist die Konzentrationsabhängigkeit des py-SM Transfers durch Apo A-I dargestellt. Zwischen 0 und 10 µg/ml Apo A-I kam es zu

einer deutlichen Zunahme der Inhibition. Höhere Konzentrationen als 10 µg/ml führten zu keinem weiteren Anstieg der Hemmung.

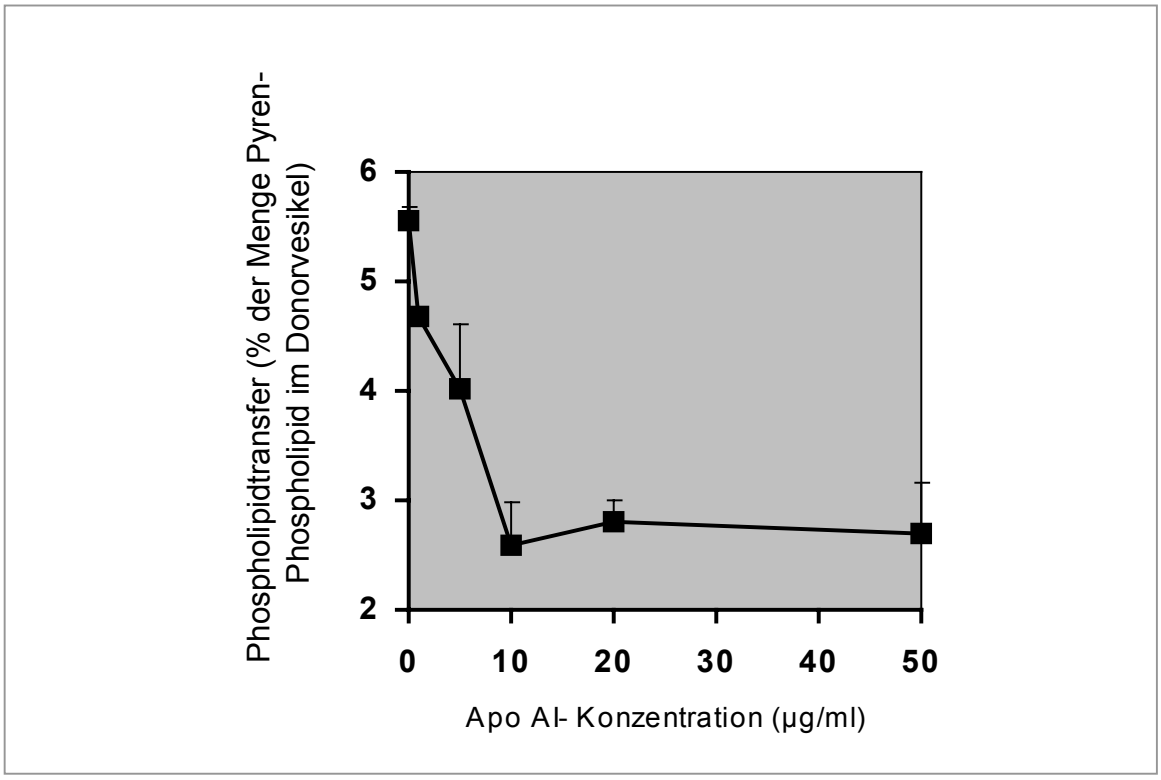


Abb. 13 ***Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Apo A-I auf den py-SM Transfer aus Lipidvesikeln in Monozyten.*** *Lipidvesikel (1,9 µg/ml Ei-PC und 0,6 µg/ml py-SM) wurden für 10 Minuten bei 37°C mit Monozyten (10^6) und der jeweils angegebenen Menge Apo A-I inkubiert. Mittelwerte +/- S.D. aus 3 Experimenten.*

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Lipoproteine und Phospholipidvesikel um die Bindung an das SR-BI-Protein kompetieren. Apo A-I ist offensichtlich an der Hemmung des Imports von Phospholipiden aus Vesikeln in Zellen durch HDL beteiligt.

3.2 Phospholipidimport in SR-BI transfizierte Baby Hamster Kidney (BHK) Zellen

3.2.1 Überexpression von SR-BI in BHK Zellen

Um die bis zu diesem Zeitpunkt gewonnenen Erkenntnisse über die Rolle des SR-BI beim selektiven Phospholipidtransfer weiter zu untermauern, wurden BHK

Zellen verwendet, die mit der cDNA für den humanen SR-BI transfiziert waren. Im Folgenden wurden SR-BI überexprimierende mit den Vehikel transfizierten Zellen (Kontrolle) bezüglich ihres Phospholipidimportes verglichen. Abb. 14 zeigt die mRNA Expression von SR-BI in den beiden Zelltypen. Die SR-BI-mRNA Expression lag in den transfizierten BHK Zellen höher als in den HepG2 Zellen, einem Zelltyp, der bekannterweise Cholesterin selektiv über SR-BI aufnimmt[54]. In den Kontrollzellen konnte keine mRNA Expression für SR-BI nachgewiesen werden.

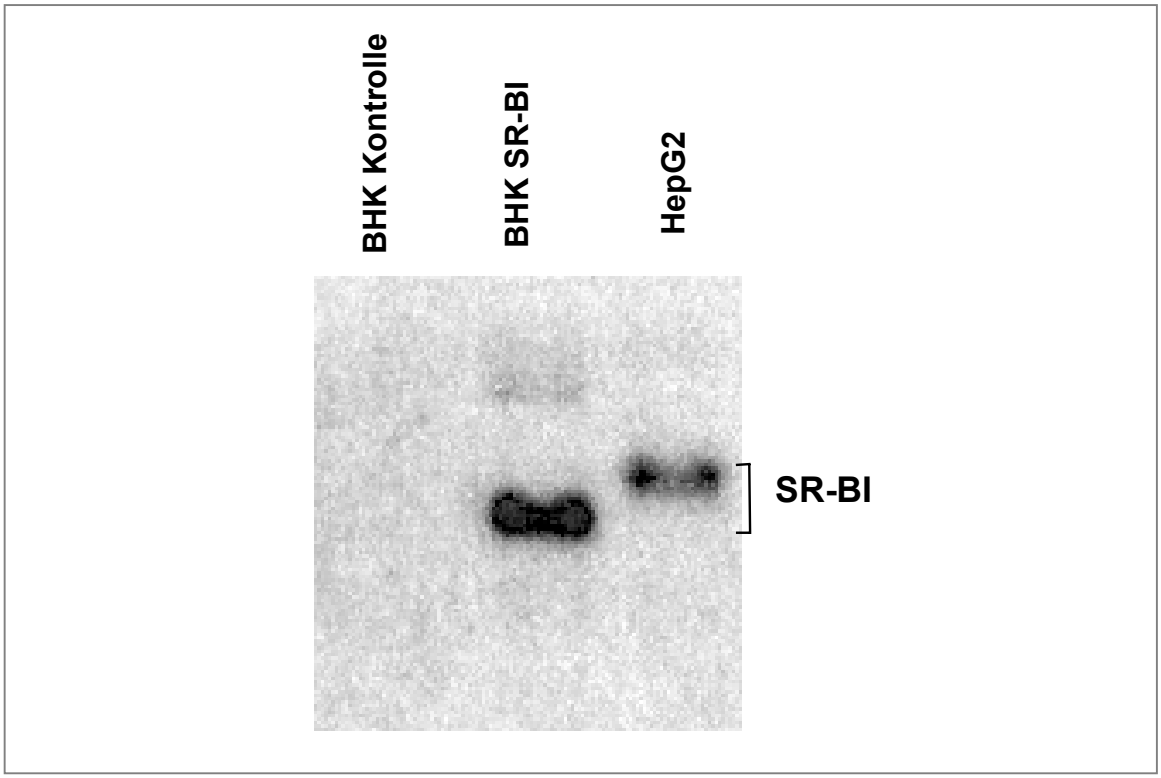


***Abb. 14* Expression von SR-BI in BHK Zellen.** *Northern Blot Analyse der Gesamt-RNA (je 10 µg) von Kontroll-BHK Zellen, mit der cDNA für SR-BI transfizierten BHK Zellen und HepG2 Zellen.*

3.2.2 Phospholipidimport in Zellen mit SR-BI Überexpression

Die Phospholipidaufnahme aus Vesikeln war bei den transfizierten Zellen im Vergleich zu den Wildtyp Zellen um das 4,8- (py-PC), 5,6- (py-PE) bzw. 5,2-fache (py-SM) gesteigert (*Abb.15*).

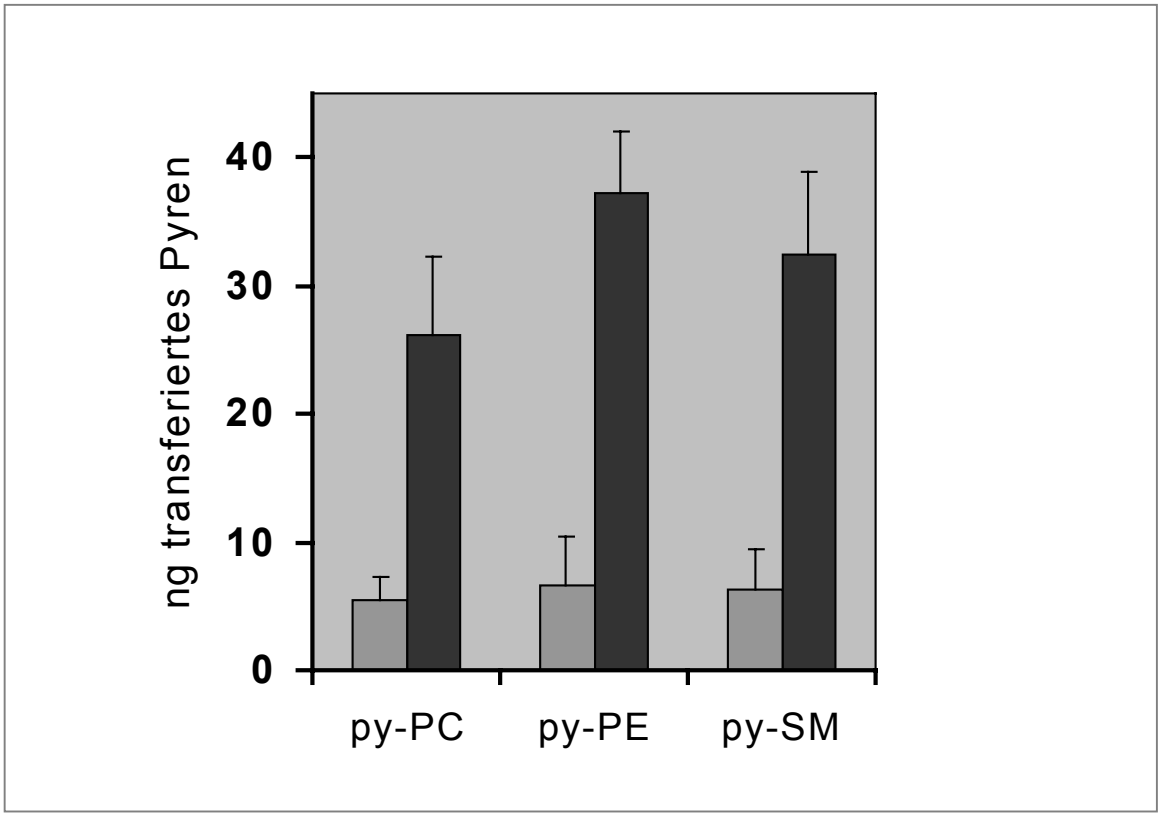


Abb. 15 ***Pyren-Phospholipidimport in native und SR-BI transfizierte BHK Zellen.*** *Lipidvesikel (1,9 µg/ml Ei-PC und 0,6 µg/ml des angegebenen Phospholipides) wurden mit BHK Zellen ($5x10^4$) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Graue Säulen: native Zellen, schwarze Säulen: SR-BI transfizierte Zellen. Mittelwerte+/- S.D. aus 5 Experimenten.*

3.2.3 Phospholipidtransfer aus Lipoproteinen

In weiteren Experimenten wurde der Phospholipidtransfer aus Lipoproteinen in die SR-BI transfizierten Zellen analysiert. Im Falle des LDL wurde eine 2,8- (py-PC) bzw. 3,6-fach (py-PE) höhere Menge an Phospholipiden in die transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen aufgenommen (*Abb. 16).* Für den Transfer von py-SM aus LDL war sogar eine 7,5- fache Steigerung in die SR-BI überexprimierenden Zellen gegenüber den Wildtyp-Zellen festzustellen (*Abb. 16*).

Bei der verwendeten Konzentration des LDL von 2 µg Protein/ml (*Abb. 16*) war die Gesamtmenge an Phospholipiden im LDL derjenigen in den Vesikeln in Abb. 15 vergleichbar. Auch bei einer LDL Konzentration von 20 µg/ml kam es zu einer deutlich höheren Stimulation der py-SM Aufnahme in die SR-BI transfizierten Zellen im Vergleich zu der Zunahme des Einbaus der Glycerophospholipide PC und PE (*Abb. 16*).

Der Phospholipidtransfer aus HDL (20 µg/ml) war bei den transfizierten Zellen um das 2,4- (py-PC), 3,2- (py-PE), bzw. 2,8-fache (py-SM) im Vergleich zu den nativen BHK Zellen gesteigert *(Abb. 16).*

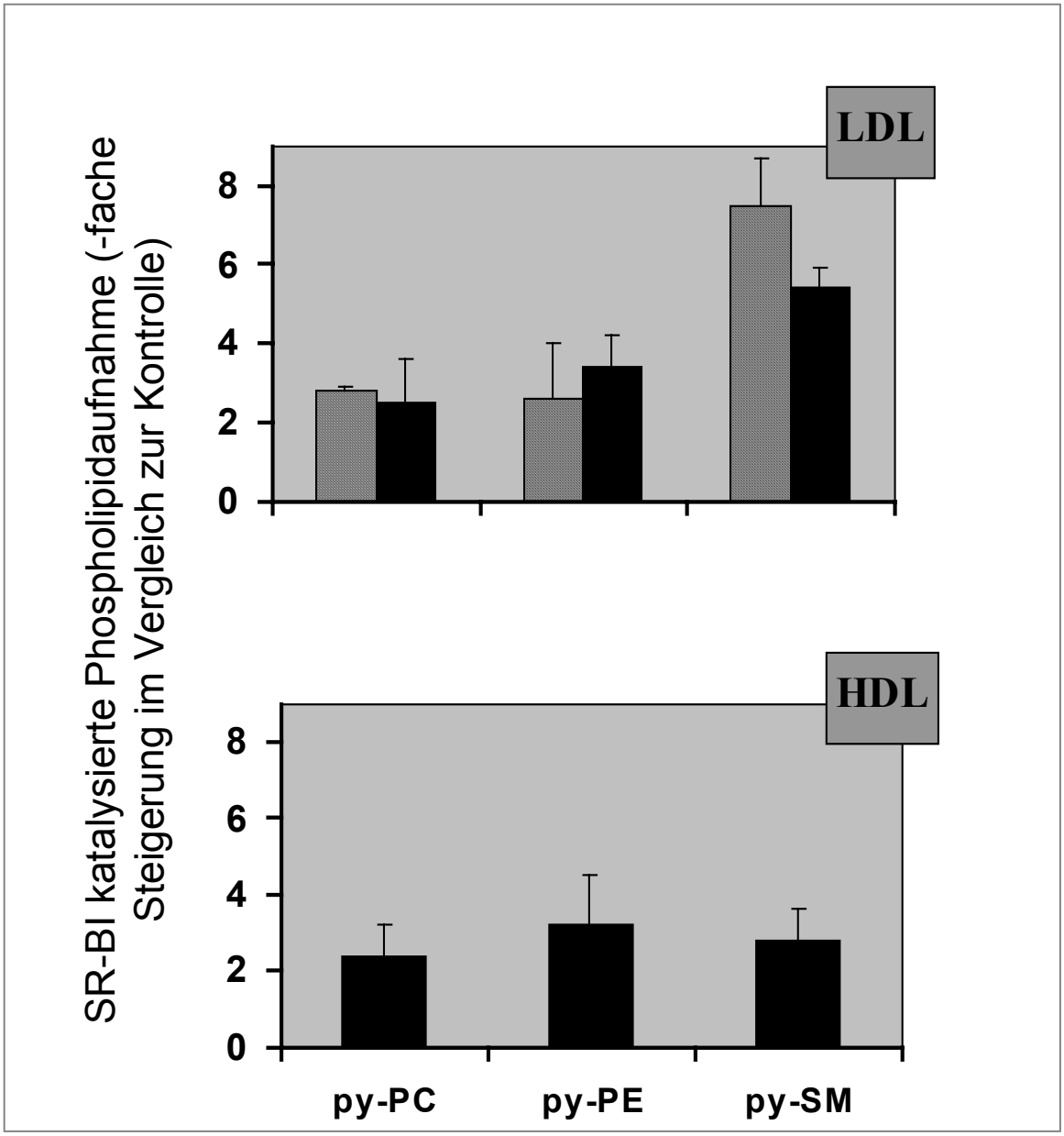


Abb. 16 ***Die Steigerung der Pyren-Phospholipidaufnahme aus Lipoproteinen in SR-BI transfizierte BHK Zellen.*** *Konzentrationen von 2 µg Protein/ml (graue Säulen) und 20 µg Protein/ml (schwarze Säulen) für LDL und 20 µg Protein/ml (schwarze Säulen) für HDL. Mittelwerte +/- S.D. aus 3-5 Experimenten.*

3.2.4 Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit der zellulären Sphingomyelinaufnahme aus LDL

Auf Grund der besonders ausgeprägten Steigerung des py-SM Transfers aus LDL in die SR-BI überexprimierenden Zellen wurde die Konzentrationsabhängigkeit des Transfers untersucht.

Die Menge des über SR-BI in die Zelle aufgenommenen py-SM stieg im Bereich zwischen 0 und 10 µg LDL Protein/ml steil an (*Abb. 17*). Bei einer Konzentration von 20 µg/ml war kein weiterer Anstieg des py-SM Einbaus festzustellen. Aus der in Abb. *17* dargestellten Konzentrationsabhängigkeit wurde mittels eines Hanes-Plots der apparente K_m-Wert für den durch SR-BI vermittelten py-SM Transfer errechnet. Dabei wurde ein Wert von 4,4 µg LDL Protein/ml ermittelt. Der Graph der Konzentrationsabhängigkeit für den py-PE Import aus LDL in BHK Zellen zeigte einen weniger steilen Verlauf als derjenige des py-SM Transfers (*Abb. 17*). Der apparente K_m-Wert für den durch SR-BI vermittelten py-PE Einbau lag bei 7,1 µg LDL Protein/ml. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass SR-BI offensichtlich eine besonders hohe Affinität zu LDL–assoziiertem py-SM aufweist.

Um die Aktivierungsenergie des Phospholipideinbaus zu ermitteln, wurde die Temperaturabhängigkeit des py-SM Einbaus in die BHK Zellen mit SR-BI Überexpression bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die Aufnahme von py-SM in SR-BI transfizierte und Kontroll-BHK Zellen bei vier Temperaturen zwischen 4°C und 37°C analysiert. Aus den Ergebnissen wurden daraufhin Arrhenius Plots erstellt. Für den SR-BI vermittelten py-SM Import aus LDL ergab sich eine Aktivierungsenergie von 7 kcal/mol. Für den Einbau von py-SM aus Phospholipidvesikeln wurde eine Aktivierungsenergie von 8 kcal/mol ermittelt.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Phospholipidtransfer durch die wässrige Phase in einer ausschließlich hydrophoben Umgebung stattfindet (vgl. Diskussion).

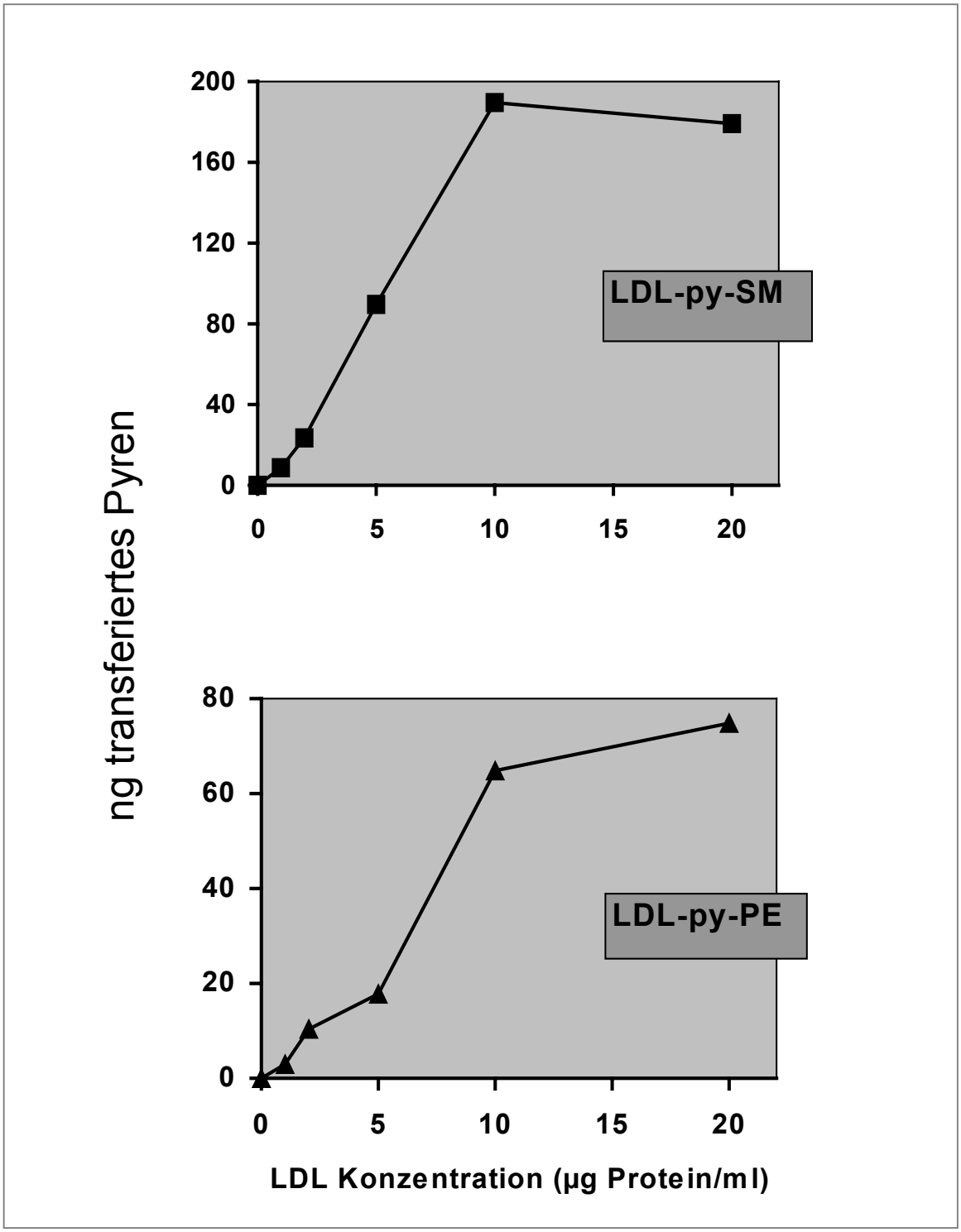


Abb. 17 ***Konzentrationsabhängigkeit des Pyren-Phospholipidtransfers zwischen LDL und BHK Zellen****. Wildtyp und SR-BI transfizierte BHK Zellen (5 x 10^4) wurden für 10 Minuten bei 37°C in den angegebenen Konzentrationen mit LDL-Partikeln inkubiert, die mit den bezeichneten Phospholipiden angereichert waren.*

3.2.5 Import von ^{14}C-Phospholipiden

Zur weiteren Bestätigung der durch die Fluoreszenz markierten Phospholipide gewonnenen Ergebnisse wurden LDL-Partikel eingesetzt, die mit ^{14}C-SM bzw. ^{14}C-PC angereichert waren. Die markierten Lipoproteine wurden in einer Konzentration von 65 µg/ml für 10 Minuten bei 37°C mit den nativen und den transfizierten BHK Zellen (3 x 10^4) inkubiert. Anschließend wurde ein 50-facher Überschuss an unmarkiertem LDL hinzugefügt, um radioaktiv markiertes LDL zu entfernen, das an die Zelloberfläche gebunden war.

Die Menge an zellassoziiertem ^{14}C-SM, die daraufhin bestimmt wurde, lag bei den transfizierten Zellen um das 3,4-fache höher als bei den Kontrollzellen. Für PC konnte eine Steigerung der Menge an zellassoziiertem ^{14}C-PC um das 2,1-fache ermittelt werden (*Abb. 18*).

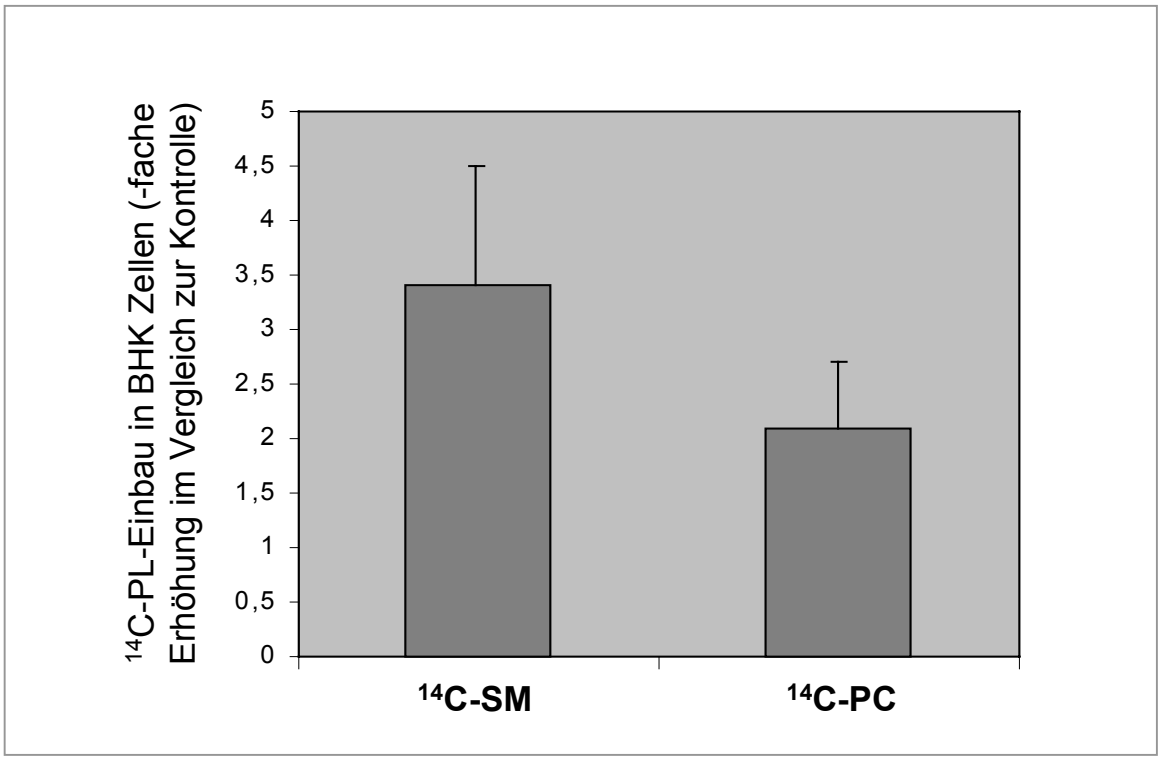


***Abb. 18* Steigerung des Einbaus von ^{14}C-markiertem SM und PC in SR-BI transfizierte BHK Zellen.** *Native und SR-BI transfizierte Zellen (3 x 10^4) wurden für 10 Minuten bei 37°C mit LDL-Partikeln (65 µg/ml) inkubiert, die mit den angegebenen Phospholipiden angereichert waren. Mittelwerte +/- S.D., Doppelbestimmungen aus 2-3 unabhängigen Experimenten.*

3.3 Rolle von Caveolae beim Phospholipidimport

Bekannterweise ist SR-BI hauptsächlich in sphingomyelin-und cholesterin-reichen Domänen der Zellmembran, den sogenannten Caveolae, lokalisiert[6,33] . Es wurde daher untersucht, ob der durch SR-BI vermittelte SM Einbau an die Anwesenheit intakter Caveolae gebunden ist. Hierzu wurden die Zellen mittels Cyclodextrin an Cholesterin verarmt, wodurch die Caveolae desintegriert werden[27]. Der py-SM Einbau aus Vesikeln in native BHK Zellen blieb durch die Behandlung mit Cyclodextrin unbeeinflusst. Auch die anschließende Wiederanreicherung der Zellen mit Cholesterin veränderte den Phospholipid-import in die Kontrollzellen nicht (*Tab. 3*). Dagegen war der py-SM Import in die transfizierten BHK Zellen nach einer 30-minütigen Inkubation mit Cyclodextrin um 29% vermindert. Nach 60-minütiger Inkubation mit Cyclodextrin war der py-SM Import in die transfizierten BHK Zellen um 61% gegenüber den SR-BI überexprimierenden Kontrollzellen vermindert. Durch Wiederauffüllung des Cholesterinpools der Zelle stieg der Import von py-SM wieder auf Werte an, die denjenigen der unbehandelten Kontrollzellen entsprachen (*Tab. 3*).

***Tab. 3* Behandlung mit Cyclodextrin verminderte reversibel den SR-BI vermittelten py-SM Transfer.** *Mittelwerte +/- S.D. aus 3 Experimenten.*

	SR-BI vermittelter py-SM Transfer (% des Einbaus in unbehandelte Zellen)	
	native Zellen	SR-BI transfizierte Zellen
Kontrollzellen	100	100
30 Min. Entleerung mit Cyclodextrin	104 ± 13	71 ± 15
60 Min. Entleerung mit Cyclodextrin	104 ± 36	39 ± 12
Reversibilität (30 Min. Cyclodextrin, dann Cholesterin-Zugabe)	91 ± 24	100 ± 10

3.4 Phospholipidimport in Erythrozytenghosts

Erythrozyten stellen einen wichtigen Phospholipidpool im Blut dar, ihr Phospholipidgehalt (5,2 mmol/l Blut) liegt im gleichen Größenbereich wie derjenige der Gesamtlipoproteine. Es wurde der Transfer von py-SM in Erythrozyten untersucht. Da das Hämoglobin der roten Blutzellen mit der Messung der Pyrenfluoreszenz interferiert hätte, wurden sogenannte Erythrozytenghosts verwendet, Plasmamembranen der Erythrozyten, die frei von Hämoglobin sind.

Nach einer 10- bzw. 16-minütigen Inkubation der Ghosts mit py-SM enthaltenden Lipidvesikeln war ein Teil der Phospholipide der Donorpartikel in die Erythrozytenmembranen selektiv aufgenommen worden (*Abb. 19*).

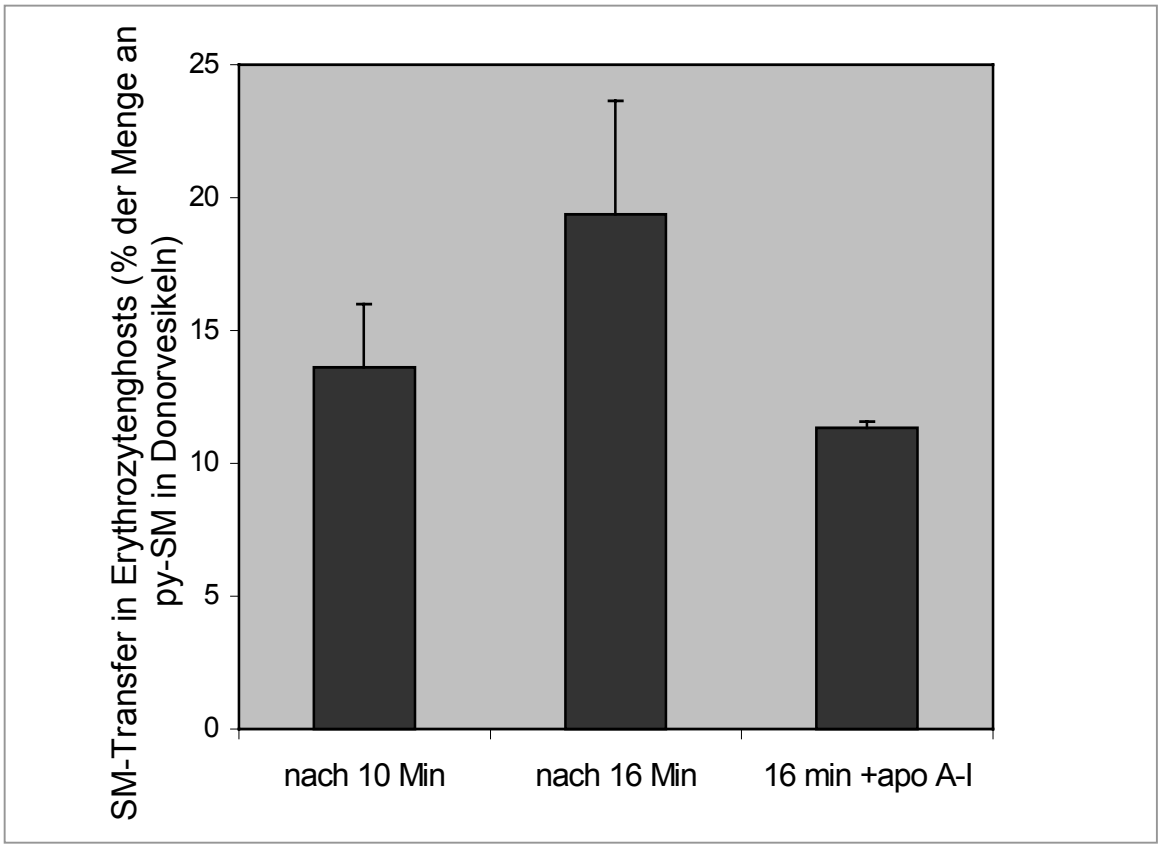


***Abb. 19* Transfer von Pyren-SM in Erythrozytenghosts.** *Mittelwerte aus 3 Experimenten +/- S.D., Hemmung durch Apo A-I (10 µg/ml, n=2).*

Apo A-I hemmte den Phospholipidimport um 41%. In Westernblots konnte jedoch kein SR-BI in Erythrozyten nachgewiesen werden. Die Hemmbarkeit des

Transfers durch Apo A-I könnte bedeuten, dass Erythrozyten ein Protein aus der CD36-Proteinfamilie, zu der auch SR-BI gehört, besitzen.

Wie bei den BHK Zellen, wurde auch bei den Erythrozytenghosts eine Be-und Entladung mit Cholesterin durchgeführt, um den Einfluss des Cholesterin-gehaltes der Zelle auf den Phospholipidimport zu untersuchen. Die Cholesterinentladung führte zu einer 17-33%igen Hemmung des py-SM Transfers aus Lipidvesikeln in die Erythrozytenghosts (n=3). Erythrozyten weisen bekanntlich cholesterin- und sphingomyelinreiche Domänen, die sog. Rafts auf. Die Ergebnisse lassen daher vermuten, dass durch die Auflösung der Struktur der Rafts der Phospholipidimport in die Erythrozyten vermindert wird und damit die erythrozytären Kandidatenproteine ebenfalls in den genannten Domänen lokalisiert sind.

4 DISKUSSION

In der hydrophilen Umgebung des Blutes wird für hydrophobe Moleküle wie den Phospholipiden, Cholesterin und den Triglyceriden ein Transfersystem benötigt, das von den Lipoproteinen bereitgestellt wird. Während die Bedeutung der Lipoproteine für die Cholesterinhomöostase von Zellen des Organismus bereits detailiert analysiert wurde, ist über die Funktion der Lipoproteine für den Phospholipidmetabolismus noch relativ wenig bekannt. Phospholipide können durch Endozytose der Lipoproteine in die Zellen aufgenommen werden, u.a. vermittelt über die Bindung von LDL an den klassischen LDL-Rezeptor. Einigen Blutzellen fehlt jedoch der LDL-Rezeptor, z.B. Blutplättchen und Erythrozyten. Sie können daher Lipoproteine nicht über Endozytose aufnehmen. Ausgehend von dieser Überlegung wurde analysiert ob Phospholipide auch selektiv aus Lipoproteinen in Zellen importiert werden können. In der Tat wurde ein schneller endozytoseunabhängiger (selektiver) Einbau der Phospholipide in die Plättchen beobachtet[23]. Dabei werden die Phospholipide offenbar gezielt aus dem Monolayer der Lipoproteine herausgelöst und in den äußeren Monolayer der Zellmembran inseriert. Die Fettsäuren, die verestert in den selektiv importierten Phospholipiden vorliegen, werden u.a. als Präkursoren wichtiger Signalstoffe verwendet. Dies gilt z.B. für die über den Phospholipdimport aufgenommene Arachidonsäure, die zu Eikosanoiden wie Thromboxan A_2 und Lipoxygenase-produkten metabolisiert wird[7,20]. Desweiteren wird auch durch Lipoproteine Sphingomyelin in die Zellen eingeschleust, wodurch vermehrt Sphingo-lipidmetabolite wie Ceramid und Sphingosin gebildet werden[67].

4.1 Verwendung Fluoreszenz markierter Phospholipide zur Analyse der Lipidaufnahme in Zellen

In zahlreichen Studien zur Analyse des Transfers von Lipiden in und aus der Zelle wurden Phospholipid- und Cholesterinmoleküle verwendet, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert waren. Die Markierung von Phospho-lipiden mit Fluorophoren (z.B. Pyrendecansäure) verändert die Struktur der Lipide und könnte damit deren Interaktion mit anderen Molekülen (Proteinen,

anderen Lipiden) modifizieren. Zur Bestätigung der mit den Fluoreszenz markierten Phospholipiden erzielten Ergebnisse wurden daher in der vorliegenden Studie auch Experimente mit radioaktiv markierten Lipiden durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass sich die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Pyrendecansäure markierten Phospholipide in ihrer Interaktion mit Proteinen und Zellen von den radioaktiv markierten Phospholipide kaum unterscheiden (*Abb. 18*). Diese Ergebnisse bestätigen frühere Arbeiten, in denen sich die Pyrendecansäure als exzellentes Analogon physiologischer Fettsäuren erwiesen hat[53].

4.2 Phospholipidimport in Blutzellen

In den vorliegenden Versuchen wurde zunächst gezeigt, dass Monozyten Phospholipide selektiv aufnehmen (*Abb. 10*, *Abb. 11*). Dies galt für die quantitativ wichtigsten Phospholipide der Lipoproteine, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin. Danach analysierten wir die Bedeutung des Kandidatenproteins SR-BI für den selektiven Phospholipidimport. SR-BI wie auch CD36 gehören zu einer gemeinsamen Rezeptorfamilie. Dies kommt auch darin zum Ausdruck, dass die häufig für den humanen SR-BI verwendete Bezeichnung CLA-1 "**C**D36 und **L**IMPII -**A**nalogon 1" bedeutet. Die Struktur von SR-BI zeigt in der Tat deutliche Ähnlichkeiten mit derjenigen des CD36. Die Sequenzen der beiden Proteine weisen eine 20-33%ige Analogie auf[17,69]. Auf Grund von Strukturmodellen ist davon auszugehen, dass die beiden Rezeptoren jeweils eine große extrazelluläre Schleife, zwei transmembranäre Anteile sowie kurze C-und N-terminale zytoplasmatische Anteile besitzen[17] (*Abb. 7*). Für die Lipidtransferfunktion ist im Besonderen die extrazelluläre Domäne von SR-BI entscheidend[17].

Nachdem wir SR-BI in Monozyten nachgewiesen hatten (*Abb. 9*), analysierten wir den Einfluss eines gegen die extrazelluläre Domäne von SR-BI gerichteten Antikörpers auf den Phospholipidtransfer. Der anti-SR-BI Antikörper bewirkte eine deutliche Hemmung des Phospholipidimportes in die Monozyten (*Abb. 11*). Dies legt nahe, dass SR-BI für einen gewichtigen Teil der Phospholipidaufnahme in die Monozyten verantwortlich ist. SR-BI stellt den ersten bekannten HDL-Rezeptor dar und bindet auch LDL. Um die bei Monozyten erhobenen Daten zu untermauern, wurden Zellen untersucht, die SR-BI überexprimieren. BHK Zellen, die mit der cDNA für menschlichen SR-BI transfiziert waren, exprimierten in

hohem Maße SR-BI. Im Northern-Blot zeigte sich in den SR-BI transfizierten Zellen eine höhere SR-BI Expression als in HepG2-Zellen, die konstitutiv eine relativ hohe SR-BI Expression aufweisen (*Abb. 14*). Verglichen mit den Vehikel transfizierten Kontrollzellen, die wie in *Abb. 14* dargestellt, keine SR-BI Expression zeigten, fand sich bei den SR-BI transfizierten Zellen eine starke Zunahme der Phospholipidaufnahme (*Abb.15*, *Abb. 16*). Diese Daten bestätigen, dass SR-BI den selektiven Phospholipideinbau in Zellen vermitteln kann. SR-BI stellt folglich das erste bekannte Membranprotein dar, das den endozytose-unabhängigen Phospholipidimport in die Zelle katalysiert.

Durch den anti-SR-BI Antikörper ließ sich keine vollständige Hemmung der Phospholipidaufnahme in Monozyten erzielen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass außer dem SR-BI noch weitere Transportmechanismen am Einbau der Phospholipide in die Monozyten beteiligt sind. Monozyten exprimieren neben SR-BI auch den verwandten Rezeptor CD36. Diese beiden Rezeptoren haben nicht nur eine ähnliche Struktur, sie besitzen auch teilweise überlappende Ligandenaffinitäten. In der Tat binden sowohl SR-BI als auch CD36 mit hoher Affinität modifiziertes LDL und anionische Phospholipide[55]. Es wurde gezeigt, dass native Lipoproteine ebenfalls an CD36 binden[15], was in anderen Studien jedoch angezweifelt wird[2,19,55]. CD36 kann ebenfalls die selektive Cholesterin-aufnahme vermitteln, jedoch mit erheblich geringerer Effektivität als SR-BI[17,19]. In welchem Ausmaß CD36 zum Phospholipidimport beiträgt, ist noch nicht bekannt. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass Plättchen kein SR-BI aufweisen. Thrombozyten nehmen bekannterweise Phospholipide hauptsächlich über einen endozytoseunabhängigen Mechanismus auf. Es wurde bereits gezeigt, dass die Phospholipidaufnahme in die Plättchen proteinvermittelt ist[23,24]. Hieraus lässt sich folgern, dass es neben dem SR-BI noch weitere Rezeptoren geben muss, die die Phospholipidaufnahme vermitteln.

4.3 SR-BI vermittelter Phospholipidtransfer aus verschiedenen Phospholipiddonatoren

Der Phospholipidtransfer in Zellen war nicht auf einen bestimmten Phospholipiddonator beschränkt. Wir konnten zeigen, dass SR-BI den Transfer der Phospholipide aus LDL-und HDL-Partikeln in die Zelle fördert (*Abb. 10, Tab. 2, Abb. 16)*. Bekannterweise binden die beiden genannten Lipoproteine mit hoher Affinität an SR-BI. Der halbmaximale Phospholipidimport über SR-BI

wurde bei einer LDL Konzentration beobachtet, die im Bereich der apparenten Dissoziationskonstante für die Interaktion von LDL mit SR-BI liegt (~ 5 µg Protein/ml, *Abb. 17*)[2]. Hieraus lässt sich folgern, dass die Bindung des LDL Partikels an SR-BI für den Transfer von Phospholipiden in die Zelle essentiell ist. Für den selektiven Cholesterineinbau wurde bereits der Nachweis erbracht, dass die Bindung von HDL an SR-BI den Lipidtransfer in die Zelle ermöglicht[34]. Vergleiche mit CD36, das ebenfalls HDL binden kann, machen jedoch deutlich, dass die Bindung der Lipoproteine an die Zellmembran alleine für einen effektiven Transfer von Lipiden nicht ausreicht[44]. Studien, die den Cholesterin-einbau durch SR-BI/CD36 Chimären und SR-BI Mutanten untersuchten, legen nahe, dass speziell die extrazelluläre Domäne des SR-BI direkt am Transfer der Lipide beteiligt ist[17].

Es stellt sich dabei die Frage, inwieweit die Proteinkomponenten der Lipoproteine für den Lipidtransfer über SR-BI von Bedeutung sind. SR-BI vermittelte den Phospholipidtransfer aus reinen Lipidvesikeln in die Zelle mit hoher Effizienz (*Abb. 11, Abb.15*). Dies deutet darauf hin, dass SR-BI direkt mit den Phospholipiden der Donorvesikel interagieren kann, ohne dass Apolipoproteine im Donator vorhanden sein müssen. Jedoch deuten Arbeiten anderer Autoren darauf hin, dass die Apolipoproteinkomponenten des HDL für die Bindung an SR-BI verantwortlich sind und Lipidvesikel nicht an das Membranprotein binden[77]. So kann das HDL assoziierte Apo A-I über Protein-Protein-Interaktionen zwischen HDL und SR-BI die Bindung des Lipoproteins an die Zellmembran vermitteln. Im Falle des HDL könnte daher die Apolipo-proteinkomponente an dem Transfer von Phospholipiden zwischen HDL und der Zelle über SR-BI mitverantwortlich sein. Nachdem aber SR-BI mit unterschiedlichen Liganden interagieren kann, die keine gemeinsamen Proteinkomponenten aufweisen, wurde bereits diskutiert, dass SR-BI unter-schiedliche Bindungstellen für Proteine und Lipide besitzen könnte[70]. In einer unlängst erschienenen Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass die Effektivität des Lipidtransfers von der Region des SR-BI abhängig ist, an die der Donorpartikel bindet[70]. Dies könnte darauf hindeuten, dass durch die Interaktion des Apo A-I an SR-BI ein anderer Mechanismus der Lipidaufnahme bewirkt wird als über die Bindung der Lipidkomponenten des Donorpartikels an das Membranprotein. Die durch Apo A-I vermittelte Interaktion mit dem Rezeptor führte dabei zu einer höheren Effektivität der Lipidaufnahme in die Zelle. Auch

geht aus Untersuchungen zum Cholesterinefflux hervor, dass für den Export von Cholesterinestern aus der Zelle über SR-BI keine Apolipoproteinkomponenten im Akzeptorpartikel erforderlich sind. Im Einzelnen konnte u.a. der Efflux von Cholesterinestern aus der Zelle in Lipidvesikel nachgewiesen werden[39]. Dabei können sowohl HDL als auch LDL als Akzeptoren für den durch SR-BI vermittelten Cholesterinefflux dienen[65]. Die dargestellen Untersuchungen legen insgesamt gesehen den Schluss nahe, dass der durch SR-BI vermittelte bidirektionale Transfer von Lipiden zwischen Lipidpartikeln und Zellen auch ohne spezifische Apolipoproteinkomponenten stattfindet.

Um die Interaktion von SR-BI mit den strukturell unterschiedlichen Liganden weiter zu beleuchten, untersuchten wir den Einfluss von nicht-markierten Lipoproteinen und einzelnen Apoproteinkomponenten (Apo A-I). Der Einbau von Phospholipiden aus Lipidvesikeln wurde sowohl durch LDL als auch durch HDL gehemmt (*Abb.12*). Dies deutet darauf hin, dass die unterschiedlichen Phospholipiddonatoren um die Interaktion mit dem Scavenger Rezeptor kompetieren[49]. Auch Apo A-I alleine konnte die Phospholipidaufnahme aus Lipidvesikeln inhibieren (*Abb.12).* Andere Autoren konnten diesen Befund in der Zwischenzeit bestätigen. So wurde die intestinale Lipidaufnahme über SR-BI durch Lipoproteine und Apolipoproteine kompetetiv gehemmt[75]. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse vermuten, dass SR-BI Bindungsstellen für Apolipoproteine und Phospholipide besitzt, um die die Lipiddonatoren kompetieren.

4.4 Abhängigkeit der Spezifität des Phospholipidtransfers vom Phospholipiddonator

Bei der Analyse des Phospholipidtransfers aus unterschiedlichen Donatoren in die Zellmembran fiel auf, dass der durch SR-BI vermittelte Transfer der verschiedenen Phospholipide aus HDL-Partikeln in die Zellen mit annähernd gleicher Effizienz stattfand (*Abb. 16*). Auch in den Experimenten, in denen Vesikel als Phospholipiddonatoren dienten, fand sich für den Transfer der Phospholipide PE, PC und SM über SR-BI eine vergleichbare Steigerung des Importes (*Abb. 15*). Jedoch ergaben sich teilweise deutliche Unterschiede für den Transfer der Phospholipide aus den LDL-Partikeln. Wir beobachteten, dass SM aus den LDL-Partikeln wesentlich effektiver über SR-BI in die Zelle

transferiert wurde als PC bzw. PE (*Abb. 16*). Frühere Arbeiten deuten darauf hin, dass SR-BI eine wichtige Rolle im Metabolismus von LDL und Apolipoprotein B enthaltenden Lipoproteinen im Allgemeinen spielt. Der SR-BI bindet nicht nur LDL mit hoher Affinität[2], er führt den Zellen auch Cholesterinester aus den Lipoproteinen zu[68]. Die Überexpression von SR-BI im Ganztiermodell führte zu einer deutlichen Reduktion Apoprotein B enthaltender Lipoproteine im Plasma[71]. Weiterhin wurde gefunden, dass Polymorphismen im SR-BI Gen des Menschen mit Veränderungen der LDL-Konzentration im Plasma assoziiert waren[3].

Wie lässt sich nun der präferentielle Transfer von SM aus den LDL-Partikeln erklären? Frühere Arbeiten zeigen, dass PC innerhalb des Monolayers von LDL hauptsächlich in gebundener Form an Apoprotein B_{100} vorliegt. Im Gegensatz dazu ist SM offensichtlich weniger proteingebunden, so dass sich das Sphingolipid relativ frei in der Phopholipidschicht des LDL Partikels bewegen kann[50,64]. Im HDL-Partikel ist die Beweglichkeit des SM wahrscheinlich durch die Interaktion des Sphingolipides mit dem Apoprotein A-I stark eingeschränkt[48]. Neben anderen Faktoren könnten diese Interaktionen zwischen Phospholipiden und Proteinkomponenten in den Lipoproteinen dazu beitragen, dass SR-BI SM aus den LDL-Partikeln leichter extrahieren kann als PC, wohingegen das Herauslösen von SM aus den HDL-Partikeln relativ gesehen erschwert ist[59]. Der Transfer von Sphingomyelin aus den Lipoproteinen in die Zelle könnte eine wichtige Bedeutung für verschiedene Zellfunktionen besitzen. Unter Einfluss einer Sphingomyelinase wird Sphingomyelin zu Ceramid abgebaut, aus dem dann wieder über Ceramidase Sphingosin gebildet werden kann. Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-P, ein weiteres Produkt des Sphingolipid-stoffwechels, fungieren als wichtige intrazelluläre Messengermoleküle[22]. Zusammenfassend lässt sich hieraus folgern, dass das LDL-assoziierte SM - verglichen mit PC - für die Interaktion mit SR-BI besser zugänglich ist. Dadurch wird offensichtlich der präferentielle Transfer von SM aus der Phospholipid-schicht des LDL über SR-BI ermöglicht. Somit spielt die Struktur des Donorpartikels eine wesentliche Rolle für die Selektivität des durch SR-BI vermittelten Phospholipidimports.

4.5 Mechanismus des Phospholipidtransfers

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Importmechanismus der amphiphilen Phospholipide über SR-BI zu charakterisieren. Der Transfer von Phospholipiden aus Donatoren in Zellen muss prinzipiell die energetische Barriere des zwischen den beiden Kompartimenten gelegenen wässrigen Mediums überwinden. Die Aktivierungsenergie für den durch SR-BI vermittelten Transfer von Sphingomyelin über das extrazelluläre Medium lag im Bereich von 7-8 kcal/mol (3.2.4). Ein ähnlicher Wert wurde kürzlich für die Aktivierungsenergie des SR-BI vermittelten Transports von Cholesterinestern ermittelt (ca. 9 kcal/mol)[17,59]. Frühere Arbeiten zeigen, dass die Aktivierungsenergie für die proteinunabhängige Diffusion von Sphingomyelin durch die wässrige Phase bei 21-25 kcal/mol liegt[13]. SR-BI reduziert folglich die Aktivierungsenergie für den Sphingomyelintransport zwischen den beiden Lipidkompartimenten um etwa 70%.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der proteinvermittelte SM-Transfer durch das extrazelluläre Medium in einer hydrophoben Umgebung stattfinden muss. Hieraus ist zu folgern, dass während des gesamten Transferprozesses, dem Herauslösen des Phospholipides aus dem Donator, dem Durchtritt durch die wässrige Phase sowie dem Eintreten in die äußere Schicht der Zellmembran der Akzeptorzelle es zu keinem Kontakt zwischen dem Phospholipid und dem wässrigen Medium kommt. Denkbar ist daher, dass es zwischen der externen Domäne von SR-BI und dem Donorpartikel zur Bildung eines Lipidtunnels kommt. Wir favorisieren den Begriff “Tunnel”, da der von Williams und Mitarbeitern verwendete Begriff “Kanal”[17] üblicherweise den Transfer von hydrophilen Teilchen durch Lipidphasen charakterisiert. Dieser Lipidtunnel besteht offensichtlich vorwiegend aus hydrophoben Molekülen (Aminosäuren, Lipiden) von Donator und Zellmembran (*Abb. 20*). Die Existenz eines hydrophoben Tunnels wird auch durch die Ergebnisse verschiedener Arbeiten gestützt, die zeigen, dass hydrophobe Moleküle über SR-BI mit höherer Effektivität transferiert werden als polare Phospholipide[70,75].

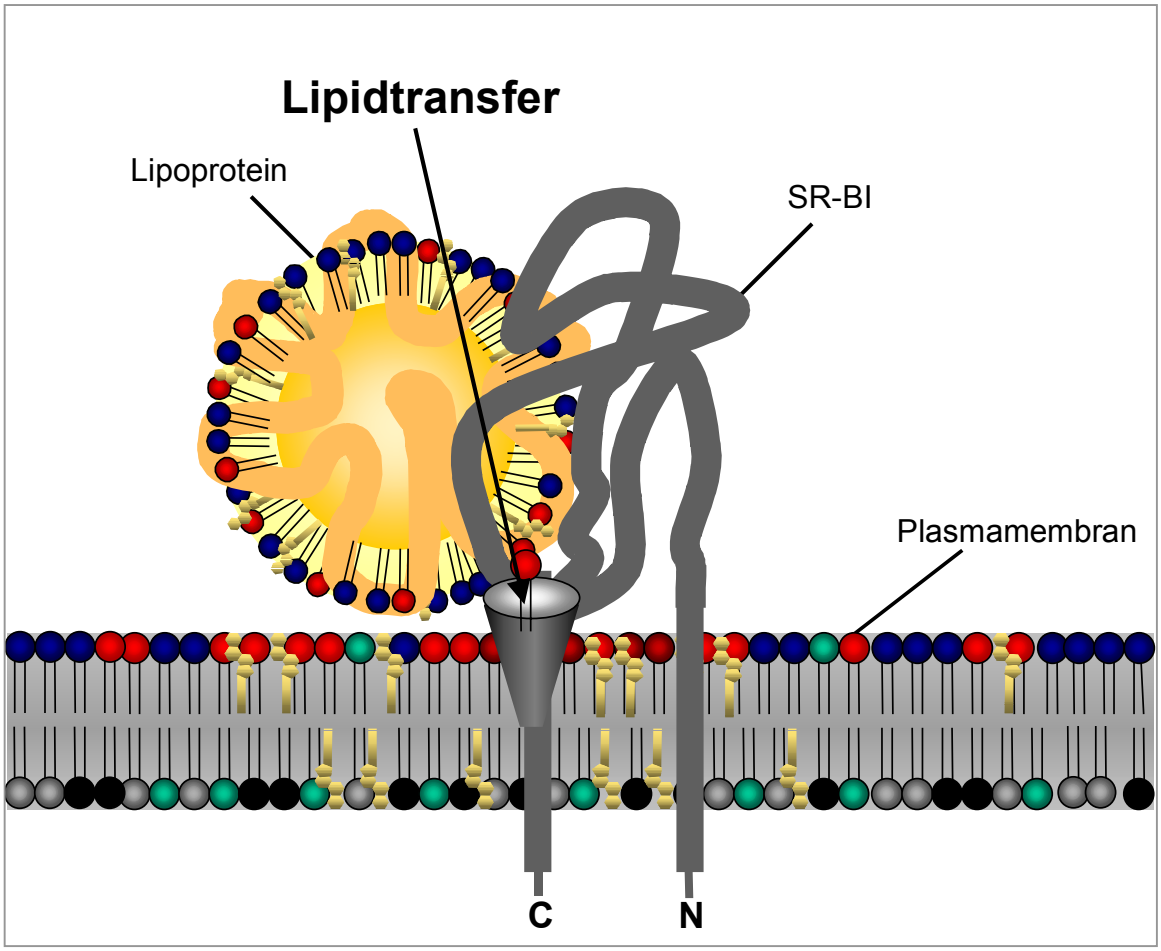


***Abb. 20* Modell des Phospholipidtransfers über SR-BI.** *Denkbar ist, dass SR-BI einen Tunnel für die Phospholipide bildet, wodurch die wässrige Phase überbrückt wird.*

4.6 Bedeutung der Caveolae

Die Phospholipide in der Doppelschicht von Plasmamembranen sind asymmetrisch über beide Schichten verteilt[4]. Allerdings gibt es auch innerhalb einer Lipidschicht ein heterogenes Verteilungsmuster der Moleküle. In der Zellmembran existieren sog. Rafts, die reich an Glycosphingolipiden, wie beispielsweise dem Sphingomyelin, und Cholesterin sind. Die Caveolae sind Sonderformen der Rafts, in denen sich vermehrt das Membranprotein Caveolin-1 findet. *Abb. 21* zeigt eine schematische Darstellung sphingolipidreicher Membrandomänen.

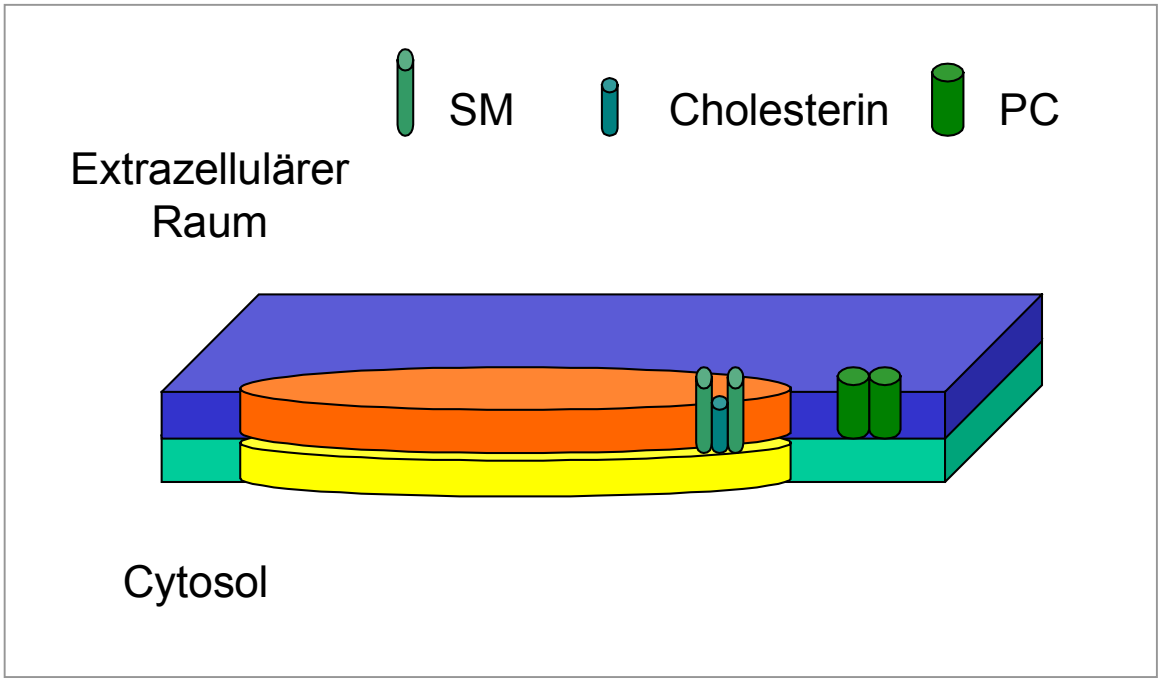


Abb. 21 SM-und Cholesterinreiche Domänen in der Zellmembran (Rafts, Caveolae). *In der äußeren Membranschicht finden sich SM und Cholesterin in bestimmten Membrandomänen (orange), umgeben von PC. In der inneren Membranschicht vermutet man als Gegenstück Phosphatidylserin/Cholesterin-domänen (gelb) umgeben von PE (grün) (Modifiziert aus 40).*

Früher stellte man sich Caveolae als bloße Einstülpungen in der Zellmembran vor. Inzwischen kennt man noch weitere Eigenschaften, die für Caveolae typisch sind. Sie sind charakteristischerweise nicht durch Detergenzien wie das Triton X-100 solubilisierbar. Dies liegt daran, dass der Schmelzpunkt natürlich vorkommender Sphingolipide und Cholesterine höher liegt als derjenige der meisten Glycerophospholipide. In den Caveolae sind auch Proteine angereichert, die über Lipidverankerungen in dieser Membrandomäne gehalten werden, die sog. Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-verankerten Proteine[5,11]. Auch die für die Stickstoffoxidsynthese wichtige eNOS (endothelial nitric oxide synthase) findet sich vermehrt in den Caveolae[5]. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass HDL die eNOS über SR-BI aktiviert[78]. Es wird vermutet, dass diese Aktivierung zum protektiven Effekt des HDL bei der Atherogenese beitragen könnte.

Caveolin-1, die charakteristische Komponente der Caveolae, interagiert mit GPI-verankerten Proteinen und auch direkt mit Cholesterin. Die beiden Komponenten Caveolin-1 und Cholesterin scheinen für die Aufrechterhaltung der Integrität der

Caveolae von besonderer Bedeutung zu sein. Anreicherung von Cholesterin in der Zelle führt zu einer Zunahme der Expression von Caveolin-1[5]. Andererseits führt auch die Steigerung der Caveolin-1-Expression zu einem erhöhten Gehalt an Cholesterin in den Caveolae. Caveolae und Rafts können desintegriert werden, indem man der Zelle Cholesterin entzieht. Diese Wirkung wurde in unseren Experimenten mit Cyclodextrin erzielt, einem wasserlöslichen Oligosaccharid, das Cholesterin bindet und transferiert. In niedriger Konzentration (<1 mM) dient es als Cholesterinshuttle, das sowohl den Efflux als auch den Influx von Cholesterin aus und in die Zelle ermöglicht. In hohen Konzentrationen (5-100mM) vermittelt es ausschließlich den Efflux von Cholesterin aus der Zelle[61], wodurch es zu einer Cholesterinentleerung der Zelle kommt. Wurden die Caveolae durch Cyclodextrinbehandlung desintegriert, so war die SR-BI vermittelte Aufnahme von SM in die Zelle vermindert. Folglich sind intakte Caveolae für den Import von Phospholipiden von Bedeutung. Es wurde kürzlich gezeigt, dass SR-BI zu einem großen Teil in Caveolae lokalisiert ist[33]. Es ist denkbar, dass noch andere Komponenten aus den Caveolae, wie z.B. das Caveolin-1, an der zellulären Phospholipidaufnahme beteiligt sind und zusammen mit dem SR-BI einen hydrophoben Tunnel für den Lipidtransport aus Lipoproteinen bilden. Auch ist vorstellbar, dass das Clustern von SR-BI Monomeren in den Caveolae für den effektiven Import von Lipiden in die Zelle von Bedeutung ist. Die Desintegrierung der Membrandomänen durch Cyclodextrin könnte dieses Clustern verhindern.

Bekannterweise findet ein ständiger Austausch von Cholesterin zwischen den Caveolae und nicht-Caveolae-Domänen statt. Für die Erhaltung der Caveolae ist daher ein Transportsystem erforderlich, das diese Domänen mit Sphingolipiden, Cholesterin und anderen Lipidkomponenten versorgt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und frühere Untersuchungen weisen darauf hin, dass SR-BI für die Aufnahme der beiden Hauptlipidkomponenten der Caveolae, Sphingomyelin und Cholesterin, verantwortlich ist. Somit trägt SR-BI einen entscheidenden Teil zur Erhaltung dieser Membrandomänen bei.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung vom Scavenger Rezeptor B-I (SR-BI) für den selektiven Import von Phospholipiden in Zellen zu klären. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass Zellen Phospholipide endozytose-unabhängig aufnehmen können und dass dieser Einbau proteinvermittelt ist. An humanen Monozyten wurde gezeigt, dass das Sphingolipid Sphingomyelin und die Glycerophospholipide Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin selektiv in die Monozyten aufgenommen werden. Ein Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne von SR-BI gerichtet war, hemmte die selektive Phospholipidaufnahme um 40-77%. In BHK Zellen, die mit der cDNA für SR-BI transfiziert waren, war der Phospholipidtransfer um ein Mehrfaches erhöht. Die Ergebnisse zeigen, dass SR-BI den selektiven Phospholipideinbau in die Zelle vermittelt. SR-BI stellt somit das erste Membranprotein dar, das an der endozytoseunabhängigen Phospholipidaufnahme in Zellen beteiligt ist. Als Phospholipiddonatoren für den Phospholipidtransfer über SR-BI dienten Lipoproteine und reine Lipidvesikel, die keine Proteinkomponenten enthielten. Apo A-I, eine charakteristische Apoproteinkomponente des HDL, führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung des Transfers. Auch die Lipoproteine HDL und LDL inhibierten den Phospholipidimport. Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass SR-BI sowohl Bindungsstellen für Lipide als auch für die Proteinkomponenten der Lipoproteine aufweist.

SR-BI transferierte Sphingomyelin aus dem LDL mit höherer Effizienz in die Zellen als aus anderen Donatoren. Dies deutet darauf hin, dass die Eigenschaften des Donorpartikels, wie beispielsweise die Protein-Lipidinter-aktionen im Lipoprotein, für die Effektivität der Phospholipidaufnahme von besonderer Bedeutung sind. Zudem lässt sich hieraus eine besondere Rolle des LDL für die Versorgung der Zellen mit Sphingomyelin folgern.

Die Aktivierungsenergie des über SR-BI vermittelten Phospholipidtransfers war deutlich geringer als die Diffusion von Phospholipiden durch das wässrige Medium. Dies legt die Vermutung nahe, dass es beim Import von Phospholipiden in Zellen über SR-BI zur Bildung eines hydrophoben Tunnels kommt. Für die effiziente Aufnahme von Phospholipiden in die Zelle spielten bestimmte

Domänen der Plasmamembran, die reich an Sphingolipiden und Cholesterin sind und als Rafts bzw. Caveolae bezeichnet werden, eine wichtige Rolle. Durch die Desintegrierung dieser Domänen, die mittels Cyclodextrinbehandlung erreicht wurde, kam es zu einer deutlichen Abnahme des SR-BI vermittelten Phospholipidtransfers. Hieraus ergibt sich, dass SR-BI eine bedeutende Funktion für die Aufrechterhaltung dieser Domänen erfüllt, da das Protein die Domänen mit deren wichtigsten Lipidkomponenten, Sphingomyelin und Cholesterin versorgt.

6 LITERATUR

[1] Acton S., Rigotti A., Landschulz K., Xu S., Hobbs H.H., Krieger M.M.
Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor
Science **271**, 518-520 (1996)

[2] Acton S.L., Scherer P.E., Lodish H.F., and Krieger M.
Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor
J. Biol. Chem. **269**, 21003-21009 (1994)

[3] Acton S., Osgood D., Donoghue M., Corella D., Pocovi M., Cenarro A., Mozas P., Keilty J., Squazzo S., Woolf E.A., Ordovas J.M.
Association of polymorphisms at the SR-BI gene locus with plasma lipid levels and body mass index in a white population.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **19**, 1734-1743 (1999)

[4] Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter D.
Lehrbuch der molekularen Zellbiologie
Wiley-VCH

[5] Anderson R.G.W.
The caveolae membrane system
Annu. Rev. Biochem. **67**, 199-225 (1998)

[6] 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)

[7] Bevers E.M., Confurius P., Dekkers D.W.C., Harmsma M., Zwaal R.F.A.
Transmembrane phospholipid distribution in blood cells: control mechanisms and pathophysiological significance
J. Biol. Chem. **379**, 973-986 (1998)

[8] 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)

[9] Bitbol M., Devaux P.F.
Measurement of outward translocation of phospholipids across human erythrocyte membrane
Proc. Natl. Acad. Sci **85**, 6783-6787 (1988)

[10] Botham K.M., Bravo E.
The role of lipoprotein cholesterol in biliary steroid secretion. Studies with in vivo experimental models
Prog. Lipid Res. **34,** 71-97 (1995)

[11] Brown D.A., London E.
Functions of lipid rafts in biological membranes
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **14**, 111-136 (1998)

[12] Brown M.S., Goldstein J.L.
A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis
Science **232**, 34-47 (1986)

[13] Brown R.E.
Spontaneous transfer of lipids between membranes
Subcellular Biochemistry vol.**16**,333-363 (1991)
H.J. Hilderson, ed. Plenum Press, New York, London

[14] Cai S.F., Kirby R.J. Howles P.N., Hui D.Y.
Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine.
J. Lipid Res. **42** (6), 902-909 (2001)

[15] Calvo D., Gòmez-Coronado D., Suárez Y., Lasunción M.A., Vega M.A.
Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL
J. Lipid Res. **39**, 777-788 (1998)

[16] Cao G., Garcia C.K., Wyne K.L., Schulz R.A., Parker K.L., Hobbs H.H.
Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1
J. Biol. Chem. **272**, 33068-33076 (1997)

[17] 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-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake
J. Biol. Chem. **274**, 41-47 (1999)

[18] Connor J., Gillum K., Schroit A.J.
Maintenance of membrane lipid asymmetry in red blood cells and ghosts: effect of divalent cations and serum albumin on the transbilayer distribution of endogenous and NBD-labeled phosphatidylserine
Biochim. Biophys. Acta **1025**, 82-86 (1990)

[19] De Villiers W.J., Cai L., Webb N.R., de Beer M.C., van der Westhuyzen D.R., de Beer F.C.
CD36 does not play a direct role in HDL or LD metabolism
J. Lipid Res. **42**, 1231-1238 (2001)

[20] Dobner P., Engelmann B.
Low-density lipoproteins supply phospholipid-bound arachidonic acid for platelet eicosanoid production
Am. J. Physiol. **275**, E777-E784 (1998)

[21] Dobner P., Koller E., Engelmann B.
Platelet high affinity low density lipoprotein binding and import of lipoprotein derived phospholipids
FEBS Letters **444**, 270-274 (1999)

[22] Downes C.P., Currie R.A.
Lipid signaling
Curr. Biol. **3**, R865-R867 (1998)

[23] Engelmann B., Kögl C., Kulschar R., Schaipp B.
Transfer of phosphatiylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin from low- and high-density lipoprotein to human platelets
Biochem. J. **315**, 781-789 (1996)

[24] Engelmann B., Schaipp B., Dobner P., Stoeckelhuber M., Kögl C., Siess W., Hermetter A.
Platelet agonists enhance the import of phosphatidylethanolamine into human platelets
J.Biol. Chem. **273**, 27800-27808 (1998)

[25] Fadok V.A., Savill J.S., Haslett C., Bratton D.L., Doherty D.E., Campbell P.A., Henson P.M.
Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor of the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells
J. Immunol. **149**, 4029-4035 (1992)

[26] Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Henson P.M.
Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages
J. Immunol. **148**, 2207-2216 (1992)

[27] Furuchi T., Anderson R.G.W.
Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK)
J.Biol.Chem. **273**, 21099-21104 (1998)

[28] Gerrity R.G.
The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions
Am. J. Pathol. **103**, 181-190 (1981)

[29] Gerrity R.G.
The role of monocytes in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions
Am. J. Pathol. **103**, 191-200 (1981)

[30] Glass C., Pittman R.C., Civen M., Steinberg D.
Uptake of high density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesteryl esters by 16 tissues of the rat in vivo and by adrenal glands and hepatocytes in vitro
J. Biol.Chem. **260**, 744-750 (1985)

[31] Glass C., Pittman R.C., Weinstein D.W., Steinberg D.
Dissociation of tissue uptake of cholesterol from that of apoprotein A-I of rat high density lipoproteins: selective delivery of cholesterol to liver, adrenal and gonad
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 5435-5439 (1983)

[32] Goldstein J.L., Brown M.S., Anderson R.G., Russel D.W., Schneider W.J.
Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system
Annu. Rev. Cell Biol. **1**, 1-39 (1985)

[33] Graf G.A., Connell P.M., van der Westhuyzen D.R., and Smart E.J.
The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol ethers into caveolae
J. Biol. Chem. **274**, 12043-12048 (1999)

[34] Gu X., Trigatti B., Xu S., Acton S., 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)

[35] Gwynne J.T., Strauss J.F.
The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands
Endoc. Rev. **3**, 299-329 (1982)

[36] Hatzopoulus A.K., Rigotti A., Rosenberg R.D., Krieger M.
Temporal and spatial pattern of expression of the HDL receptor SR-BI during murine embryogenesis
J. Lipid Res. **39**, 495-508 (1998)

[37] Hauser H., Dyer J., Nandy A., Vega M.A., Werder M., Bieliauskaite E., Weber F.E., Compassi S., Gemperli A., Boffelli D., Wehrli E., Schulthess G., Phillips M.C.
Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine
Biochemistry **37**, 17843-17850 (1998)

[38] Ji Y., Jian B., Wang N., Sun Y., Llera-Moya M., Phillips M.C., Rothblat G.H., Swaney J.B., Tall A.R.
Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux
J. Biol. Chem. **272**, 20982-20985 (1997)

[39] Jian B., Llera-Moya M., Ji Y., Wang N., Phillips M.C., Swaney J.B., Tall A.R., Rothblat G.H.
Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors
J. Biol. Chem. **273**, 5599-5606 (1998)

[40] Killian J.A., van Meer G.
The ´double lives´ of membrane lipids
EMBO reports **2**, 91-95 (2001)

[41] Kozarsky K.F., Donahee M.H., Rigotti A., Iqbal S.N., Edelman E.R., Krieger M.
Overexpression of HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels
Nature **387**, 414-417 (1997)

[42] Krieger M.
The “best” of cholesterols, the “worst” of cholesterols: A tale of two receptors
Proc. Nat. Acad. Sci. **95**, 4077-4080 (1998)

[43] Landschulz K., Pathak R.P., Rigotti A., Krieger M., Hobbs H.H.
Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high desity lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissue of the rat
J. Clin. Invest. **98**, 984-995 (1996)

[44] Llera-Moya M., Rothblat G.H., Connelly M.A., Kellner-Weibel G., Sakr S.W., Phillips M.C., Williams D.L.
Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface
J. Lipid Res. **40**, 575-580 (1999)

[45] Lobo M.V., Huerta L., Ruiz-Velasco N., Teixeiro 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: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids
J. Histochem. Cytochem. **49**, 1253-1260 (2001)

[46] Martin S.J., Reutelingsperger C.P.M., Mcgahon A.J., Rader J.A., Vanschie R.C.A.A., Laface D.M., Green D.R.
Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of bcl-2 and abl
J.Exp. Med. **182**, 1545-1556 (1995)

[47] Mason W., Freeman M.D.
Scavenger receptors in atherosclerosis
Curr. Opin.Hematology **4**, 41-47 (1997)

[48] Molotkovsky J.G., Manevich Y.M., Gerasimova E.N., Molotkovskaya I.M., Polessky V.A., Bergelson L.D.
Differential study of phosphatidylcholine and sphingomyelin in human high-density lipoproteins with lipid-specific fluorescent probes.
Eur. J. Biochem. **122**, 573-579 (1982)

[49] Murao K., Terpstra V., Green S.R., Kondratenko N., Steinberg D., Quehenberger O.
Characterization of CLA-1, a human homolouge of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptototic thymocytes
J. Biol. Chem. **272**, 17551-17557 (1997)

[50] Murphy H.C., Ala-Korpela M., White J.J., Raoof A., Bell J.D., Barnard M.L., Burns S.P., Iles R.A.
Evidence for distinct behavior of phosphatidylcholine and sphingomyelin at the low density lipoprotein surface.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **234**, 733-737 (1997)

[51] Nozawa Y., Nakashima S., Nagata K.I.
Phospholipid-mediated signaling in receptor activation of human platelets
Biochim. Biophys. Acta **1082**, 219-238 (1991)

[52] Pittman R.C., Knecht T.P., Rosenbaum M.S., Taylor C.A.
A nonendocytic mechanism for the selecive uptake of high density lipoprotein-associated cholesterol esters
J. Biol. Chem. **262**, 2443-2450 (1987)

[53] Pownall H.J., Smith L.C.
Chem. Phys. Lipids **50**, 191-211 (1998)

[54] Rhainds D., Falstrault L., Tremblay C., and Brissette L.
Uptake and fate of class B scavenger receptor ligands in HepG2 cells
Eur. J. Biochem. **261**, 227-235 (1999)

[55] Rigotti A., Acton S., Krieger M.
The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids
J. Biol. Chem. **270**, 16221-16224 (1995)

[56] Rigotti A., Edelman E.R., Seifert P., Iqbal S., DeMattos R.B., Tremel R.E., Krieger M., Williams D.
Regulation by adrenocorticotropic hormone of the in vivo expression of SR-BI, a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland
J. Biol. Chem. **271**, 33545-33549 (1996)

[57] Rigotti A., Trigatti B., Babitt J. ,Penman M., Xu S., Krieger M.
Scavenger receptor B I- a cell surface receptor for high density lipoproteins
Curr. Opin. Lipid. **8**, 181-188 (1997)

[58] Rigotti A., Trigatti B.L., Penman M., Rayburn H., Herz J., Krieger M.
A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism
Proc. Nat. Acad. Sci. **94**, 12610-12615 (1997)

[59] 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)

[60] Rothblat G.H., Bamberger M., Phillips M.C.
Reverse Cholesterol Transport
Methods in Enzymology **129**, 628-644 (1986)

[61] Rothblat G.H., Llera-Moya M., Atger V., Kellner-Weibl 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)

[62] Ruf W., Rehemtulla A., Morrissey J.H., Edington T.S.
Phospholipid-independent and-dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function
J. Biol. Chem. **266**, 16256 (1991)

[63] 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. **81**, 3751-3755 (1984)

[64] Sommer A., Prenner E., Gorges R., Stütz H., Grillhofer H., Kostner G.M., Paltauf F. ,Hermetter A.
Organization of Phosphatidylcholine and Sphingomyelin in the surface monolayer of low density lipoprotein and lipoprotein(a) as determined by time-resolved fluorometry
J. Biol. Chem. **267**, 24217-24222 (1992)

[65] Stangl H., Cao G., Wyne K.L., Hobbs H.H.
Scavenger receptor, class B, type I – dependent stimulation of cholesterol esterification by high density lipoproteins, and nonlipoprotein cholesterol
J. Biol. Chem. **273**, 31002-31008 (1998)

[66] Stein O., Stein Y.
Atheroprotective mechanisms of HDL
Artherosclerosis **144**(2), 285-301 (1999)

[67] Stoeckelhuber M., Dobner P., Baumgartner P., Ehlert J., Brandt E., Mentele R., Adam D., Engelmann B.
Stimulation of cellular sphingomyelin import by chemokine connective tissue-activating peptide III
J. Biol. Chem. **275**, 37365-37372 (2000)

[68] Swarnakar S., Temel R.E., Connelly M.A., Azhar S., Williams D.L.
Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester
J. Biol. Chem. **274**, 29733-29739 (1999)

[69] 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. Nat. Acad. Sci. **94**, 13600-13606 (1997)

[70] Thuahnai S.T., Lund-Katz S., Williams D.L., Phillips M.C.
Scavenger receptor class B, type I (SR-BI)-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)

[71] Ueda Y., Royer L., Gong E., Zhang J., Cooper P.N., Francone O., Rubin E.M.
Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice
J. Biol. Chem. **274**, 7165-7171 (1999)

[72] Varban M.L., Rinninger R., Wang N., Fairchild-Huntress V., Dunmore J.H., Fang Q., Gasselin M.C., Dixon K.L., Deeds J.D., Acton S.L., Tall A.R., Huszar D.
Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol
Proc. Nat. Acad. Sci. **95**, 4619-4624 (1998)

[73] Wang N., Arai T., Ji Y., Rinninger F., Tall A.R.
Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein Apo B, low density lipoprotein Apo B, and high density lipoprotein in transgenic mice
J. Biol. Chem. **273**, 32920-32926 (1998)

[74] Wang N., Weng W., Breslow J.L., Tall A.R.
Scavenger receptor BI (SR-BI) is up-regulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase knock-out mice as a response to depletion of cholesterol stores. In vivo evidence that SR-BI is a functional high density lipoprotein receptor under feedback control
J. Biol. Chem. **271**, 21001-21004 (1996)

[75] 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)

[76] Wyne K.L., Woollett L.A.
Transport of maternal LDL and HDL to the fetal membranes and placenta of the Golden Syrian hamster is mediated by receptor-dependent and receptor-independent processes
J. Lipid Res. **39**,518-530 (1998)

[77] Xu S., Laccotripe M., Huang X., Rigotti A., Zannis V.I., Krieger M.
Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake
J. Lipid Res. **38**, 1289-1298 (1997)

[78] Yuhanna I.S., ZhuY., Cox B.E., Hahner L.D., Osborne-Lawrence S., Lu P., Marcel Y.L., Anderson R.G., Mendelsohn M.E., Hobbs H.H., Shaul P.W.
High density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase.
Nature Medicine **7**, 853-857 (2001)

[79] Zwaal R.F., Comfuruis P., Bevers E.M.
Lipid-protein interaction in blood coagulation
Biochim. Biophys. Acta **1376**, 433-453 (1998)

7 DANKSAGUNGEN

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Engelmann für die Themenstellung, die fachliche Anleitung bei der Planung der Experimente und die jederzeitige Gesprächsbereitschaft bei Fragen und Problemen.

Herrn Prof. Dr. U. Pohl danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation in seinem Institut durchführen zu können.

Für technische Unterstützung sowie ein zu jeder Zeit herzliches und produktives Arbeitsklima danke ich Susanne Zieseniss, Ingrid Müller, Andreas Zillmann, Sonja Klein und Teresa Kauke.

Des Weiteren möchte ich mich bei den zahlreichen anderen Mitarbeitern des Physiologischen Institutes für die allzeitige Hilfsbereitschaft bezüglich jeder Art von Problemen bedanken.

Herrn Ralph Budzinski danke ich für das Bereitstellen der transfizierten BHK Zellen. Herrn Prof. H. Hauser und Dr. M. Werder danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Unmöglich wäre diese Arbeit ohne die bedingungslose Unterstützung meiner Familie und Freunde, im Speziellen meines Mannes Michael.

8 LEBENSLAUF

Name:	Stephanie Urban
Geburtstag/-ort:	2.12.73 in München
Anschrift:	Renatastr. 28, 80634 München

Schulbildung

09.1980-07.1984	Grundschule an der Kleinfeldstraße in Germering
09.1984-07.1993	Carl-Spitzweg-Gymnasium Germering, Abitur

Auslandsaufenthalt

08.1993-09.1994	Au pair in Chicago, Illinois, USA Betreuung von zwei Kindern im Alter von 3 und 5 Jahren

Medizinstudium

10.1994-09.1998	Universität Leipzig
08.1996	Ärztliche Vorprüfung
08.1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11.1998-06.2001	Ludwig-Maximilians-Universität München
04.2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06.2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktische Tätigkeiten

Famulaturen:

Internistische Praxis Dr. Krödel/Dr.Barduzky, Puchheim
Stiftsklinik Augustinum, München, kardiologische Abteilung
Universitätskinderklinik Leipzig, Neonatologie
Unfallkrankenhaus Lorenz-Böhler, Wien

PJ-Tertiale:

24.04.2000-13.08.2000	Chirurgie Klinikum Innenstadt der LMU München, Gefäßchirurgie, Viszeralchirurgie, Traumatologie
14.08.2000-03.12.2000	Kinderklinik an der Lachnerstraße, Säuglingsstation und Kinderstation
04.12.2000-25.03.2001	Innere Abteilung Klinikum Schwabing, Schwerpunkt Nephrologie
Zeitraum 1998-2001	Experimenteller Teil der Promotionsarbeit
01.07.2001-31.12.2002	Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Rheumatologie und Immunologie im Krankenhaus München Bogenhausen

9 VERÖFFENTLICHUNGEN

Scavenger receptor BI transfers major lipoprotein-associated phospholipids into the cells

S.Urban, S. Zieseniss, M. Werder, H. Hauser, R. Budzinski, B. Engelmann

J. Biol. Chem. **275**, 33409-33415 (2000)

Transfer of lipoprotein-associated phospholipids into cells is mediated by scavenger receptor BI (SR-BI)

S.Urban, S. Zieseniss, M. Werder, H.Hauser, R. Budzinski, B.Engelmann

72nd Congress of the European Atherosclerosis Society. Glasgow, 20-23 May 2001 Abstracts.
Atherosclerosis Suppl. **2**, 31 (156) (2001)