

**Etablierung einer Methode zur Untersuchung der Endozytose  
von Chylomikronen durch Leukozyten**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Judith Knoop, geb. Heinemann  
aus Köln

Gießen, 2010

**Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin  
der Universitätsklinik Giessen und Marburg GmbH  
Standort Giessen  
Direktor: Prof Dr. med. Gregor Bein**

1. Gutachter: PD Dr. med. Hassan Jomaa
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulf Müller-Ladner

Tag der Disputation: 07.12.2010

## **Inhaltsverzeichnis**

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
|             | <b>Abkürzungen</b>  | <b>3</b>  |
| <b>1</b>    | <b>Einleitung</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1.1</b>  | <b>Struktur und Funktion der Lipoproteine</b>                     | <b>4</b>  |
| <b>1.2</b>  | <b>Die fünf Klassen der Lipoproteine</b>                          | <b>6</b>  |
| 1.2.1       | Chylomikronen und Chylomikronen-Restkörper (CM und CM-Restkörper) | 6         |
| 1.2.2       | VLDL, IDL, LDL und Lipoprotein (a)                                | 7         |
| 1.2.3       | HDL   | 9         |
| <b>1.3</b>  | <b>Apolipoproteine</b>  | <b>10</b> |
| <b>1.4</b>  | <b>Lipoproteinrezeptoren</b>                                      | <b>11</b> |
| 1.4.1       | Der LDL-Rezeptor  | 11        |
| 1.4.2       | Der Scavenger-Rezeptor B1 und das ABC1-Protein                    | 12        |
| 1.4.3       | Der Apo B-48-Rezeptor   | 12        |
| <b>1.5</b>  | <b>Endozytose von Lipoproteinen durch Leukozyten</b>              | <b>13</b> |
| <b>1.6</b>  | <b>Zielsetzung</b>  | <b>14</b> |
| <b>2</b>    | <b>Material und Methoden</b>                                      | <b>15</b> |
| <b>2.1</b>  | <b>Geräte</b>   | <b>15</b> |
| <b>2.2</b>  | <b>Chemikalien und Reagenzien</b>                                 | <b>16</b> |
| <b>2.3</b>  | <b>Zelllinien</b>   | <b>20</b> |
| <b>2.4</b>  | <b>Verbrauchsmaterialien</b>                                      | <b>20</b> |
| <b>2.5.</b> | <b>Isolation und Fluoreszenzmarkierung von Chylomikronen</b>      | <b>22</b> |
| 2.5.1       | Isolation der Chylomikronen aus Vollblut                          | 22        |
| 2.5.2       | Markierung der Chylomikronen mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) | 22        |
| 2.5.3       | Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)   | 23        |
| 2.5.4       | Western-Blot-Analyse  | 25        |
| 2.5.5       | Lipoproteinelektrophorese   | 27        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>2.6</b> | <b>Endozytose-Versuche mit PBMC und klonierten Zelllinien</b>  | <b>28</b> |
| 2.6.1      | Isolierung, Aktivierung und Kultivierung von PBMC ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ) aus Vollblut | 28        |
| 2.6.2      | Kultivierung der Makrophagenzelllinie (MONO-MAC-6) sowie der Lymphozytenzelllinien (MOLT-14 und MOLT-16)     | 30        |
| 2.6.3      | Einfrieren der Zellen  | 31        |
| 2.6.4      | Inkubation der Zellen mit Chylomikronen zum Nachweis der Endozytoseaktivität                                 | 32        |
| 2.6.5      | Untersuchung der Endozytoseaktivität durch FACS ( <i>fluorescence activated cell scanning</i> )-Analyse      | 32        |
| 2.6.6      | Konfokale Mikroskopie  | 33        |
| 2.6.7      | Elektronenmikroskopie  | 34        |
| <b>3</b>   | <b>Ergebnisse</b>  | <b>36</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Isolation und Fluoreszenzmarkierung von Chylomikronen</b>   | <b>36</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Durchflusszytometrische Untersuchung der Aufnahme von Chylomikronen durch Leukozyten</b>                  | <b>43</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Mikroskopische Untersuchung der Aufnahme von Chylomikronen durch Leukozyten</b>                           | <b>48</b> |
| <b>4</b>   | <b>Diskussion</b>  | <b>54</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Isolation von Chylomikronen</b>   | <b>54</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Fluoreszenzmarkierung isolierter Chylomikronen</b>  | <b>55</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Endozytoseversuche mit Chylomikronen</b>  | <b>56</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Mögliche physiologische Bedeutung der Endozytose von Chylomikronen durch Zellen des Immunsystems</b>      | <b>59</b> |
| <b>5</b>   | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>61</b> |
| <b>6</b>   | <b>Literaturverzeichnis</b>  | <b>63</b> |

## Abkürzungen

|                  |  |
|------------------|--|
| AK               | Antikörper                                 |
| APC              | Allophycocyanin                            |
| APS              | Ammonium Peroxidsulfat                     |
| BSA              | <i>Bovine serum albumin</i>                |
| CM               | Chylomikronen                              |
| ConA             | Concanavalin A                             |
| DiI[3]           | 3,3'-Dioctadecylindocarbocyanin-Iodid      |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                           |
| ECD              | Phycoerythrin-Texas Red                    |
| FACS             | <i>Fluorescence activated cell scanner</i> |
| FBS              | <i>Fetal bovine serum</i>                  |
| FITC             | Fluorescein-Isothiocyanat                  |
| HAB-Serum        | Humanes AB-Serum                           |
| HDL              | <i>High density lipoproteins</i>           |
| IDL              | <i>Intermediate density lipoproteins</i>   |
| IL2              | Interleukin 2                              |
| LDL              | <i>Low density lipoproteins</i>            |
| LPL              | Lipoproteinlipase                          |
| LRP              | <i>LDL receptor-related protein</i>        |
| LSM <sup>®</sup> | <i>Lymphocyte seperation medium</i>        |
| MS               | <i>Microspheres</i>                        |
| NGS              | <i>Normal goat serum</i>                   |
| PBMC             | <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>  |
| PBS              | <i>Phosphate buffered saline</i>           |
| PE               | Phycoerythrin                              |
| PHA              | Phytohämagglutinin                         |
| RT               | Raumtemperatur                             |
| SDS              | Natriumdodecylsulfat                       |
| TBS              | Tris-buffered saline                       |
| TEMED            | N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin      |
| Tris             | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan            |
| VLDL             | <i>Very low density lipoproteins</i>       |
| WM               | Wachstumsmedium                            |

# 1 Einleitung

## 1.1 Struktur und Funktion der Lipoproteine

Der Mensch nimmt mit der Nahrung Lipide auf, die sich aus Cholesterin, Triacylglyceriden (ca. 90%) und anderen Fetten zusammensetzen (Lichtenstein 2006). Schon bei der Nahrungsaufnahme spalten Lipasen im Mund die langkettigen Triacylglyceride hydrolytisch auf. Im Magen wiederum spaltet die Magenlipase mittel- und kurzkettige Fettsäuren vom Glycerin ab. Anschließend wird im Dünndarm mit Hilfe von Gallensalzen und Gallensäuren die Fettaggregation so weit reduziert, dass die Fette zu Micellen emulgieren (Houten et al. 2006). Dadurch vergrößert sich die Wasser-Lipid-Grenzfläche, an der die Triacylglyceride mit Hilfe der Pankreaslipase in freie Fettsäuren, Mono- und Diacylglyceride abgebaut werden. Die Enterozyten der Dünndarmschleimhaut nehmen die Mono- und Diacylglyceride auf, die dann im Endoplasmatischen Retikulum zu Triacylglyceriden verestert werden (Thomson 1989). Da Fette hydrophobe Eigenschaften besitzen, werden für den Transport im Blut hydrophile Transportmittel benötigt (Glickman & Kirsch 1973). Diese Transportmittel sind die Lipoproteine. Lipoproteine sind sphärische Partikel mit einem hydrophoben Kern und einer polaren Hülle (Abb. 1). Der Kern besteht aus Cholesterinestern und Triacylglyceriden, die Hülle aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und den Apolipoproteinen. Die geladenen Gruppen dieser Phospholipide, die Hydroxylgruppe des Cholesterins und die Apolipoproteine interagieren mit dem wässrigen Milieu. Die apolaren Fettsäuren der Phospholipide und die Sterolringe des Cholesterins hingegen orientieren sich zum Zentrum des Lipoproteins. Die physikochemischen Eigenschaften der Lipoproteine werden maßgeblich durch die an die Oberfläche assoziierten amphipatischen Apolipoproteine bestimmt. Je mehr Apolipoproteine und je weniger Triacylglyceride ein Lipoprotein besitzt, desto höher ist seine Dichte. Die fünf Lipoproteinklassen unterscheiden sich in ihrem Gehalt an Proteinen und Fetten, ihrer Dichte und Größe sowie in ihrer elektrischen Ladung und ihrer Funktion (Tab.1). Die Auftrennung der einzelnen Lipoproteinfraktionen erfolgt, basierend auf ihren physikalischen Eigenschaften, durch Ultrazentrifugation (nach ihrer Dichte), durch Gelelektrophorese (nach ihrer Größe und Ladung) oder durch Zonenelektrophorese (nach ihrer Ladung) (Schaefer et al. 1978).

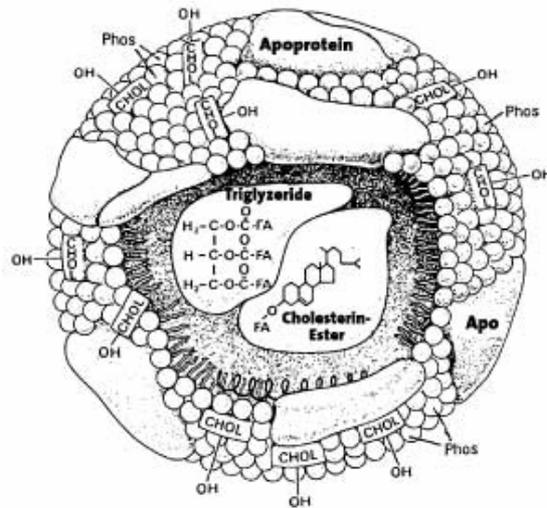


Abb. 1. Schematische Darstellung des Lipoproteinaufbaus ([www.megru.unizh.ch/j3/media/endo/lipoprotein.jpg](http://www.megru.unizh.ch/j3/media/endo/lipoprotein.jpg)). Lipoproteine sind sphärische Partikel, die aus einem Kern hydrophober Lipide (Triglyzeride, Cholesterin-Ester) und einer Hülle (*Monolayer*) aus amphiphilen Lipiden (Phospholipide (Phos), freies Cholesterin (CHO)) bestehen. In der Hülle sind verschiedene Apolipoproteine (durch nicht-kovalente Bindungen) verankert, welche für die hydrophilen Eigenschaften und die Erkennung durch verschiedene Rezeptoren wichtig sind.

Die meisten Lipoproteine werden sowohl in der Leber als auch im Darm synthetisiert (Glickman et al. 1972). Nur Chylomikronen werden ausschließlich im Darm synthetisiert. Chylomikronen sind für den Transport exogen aufgenommener Lipide im Körper zuständig (Mahley & Ji 1999). Die Lipoproteine sehr geringer Dichte (*Very low density lipoproteins*, VLDL) dagegen werden in der Leber synthetisiert und sind am Transport endogener Lipide aus der Leber und eines geringen Teils der exogenen Lipide beteiligt. Durch intravaskuläre Modifikation entstehen aus VLDL die IDL (*Intermediate density lipoproteins*). Die Lipoproteine geringer Dichte (*Low density lipoproteins*, LDL) wiederum entstehen aus den Lipoproteinen intermediärer Dichte (Mahley et al. 1999). Die Lipoproteine hoher Dichte (*High density lipoproteins*, HDL) entstehen in der Leber und im Darm und transportieren Cholesterin aus der Peripherie zurück in die Leber, wo es in Gallensalze umgewandelt und ausgeschieden werden kann (reverser Cholesterintransport) (Schaefer et al. 1978).

Tab. 1. Eigenschaften der Lipoproteine

| Lipoproteinpartikel                                   | Wichtigste Lipidklasse im Kern                 | Apolipoproteine        | Dichte (g cm <sup>-3</sup> ) | Durchmesser (nm) |
|---|--|------------------------|------------------------------|------------------|
| <b>Chylomikronen</b>                                  | Triacylglyceride                               | B-48, A I, II, IV      | < 0,95                       | 75-1200          |
| <b>Chylomikronen Restkörper</b>                       | Cholesterinester                               | B-48, E, C I, II, III  |                              |                  |
| <b>VLDL (<i>very low density lipoproteins</i>)</b>    | Endogene Triacylglyceride                      | B-100, E, C I, II, III | 0,94-1,006                   | 30-80            |
| <b>IDL (<i>intermediate density lipoproteins</i>)</b> | Endogene Triacylglyceride und Cholesterinester | B-100, E               | 1,006-1,019                  | 25-35            |
| <b>LDL (<i>low density lipoproteins</i>)</b>          | Endogene Cholesterinester                      | B-100                  | 1,019-1,063                  | 18-25            |
| <b>HDL (<i>high density lipoproteins</i>)</b>         | Endogene Phospholipide und Cholesterinester    | A I, II, C I, II, E    | 1,063-1,210                  | 5-12             |
| <b>Lipoprotein(a)</b>                                 | Cholesterinester                               | B-100, Apo(a)          | 1,05-1,09                    |                  |

## 1.2 Die fünf Klassen der Lipoproteine

### 1.2.1 Chylomikronen und Chylomikronenrestkörper (CM und CM-Restkörper)

Chylomikronen werden in den Enterozyten der duodenalen Schleimhaut synthetisiert. Dazu werden Fettsäuren und Monoacylglyceride im glatten Endoplasmatischen Retikulum zu Triacylglyceriden resynthetisiert und an ein Triacylglyceridtransferprotein gebunden. Nachdem dieses die Fette zum rauen Endoplasmatischen Retikulum transportiert hat, assoziieren diese cotranslational mit Apolipoprotein B-48 und Apo AIV (Black 2007). In der Folgezeit reifen die Chylomikronen durch die Aufnahme von weiteren Lipiden, wie Cholesterin und Phospholipiden (Schaefer et al. 1978; Dugué-Pujol et al. 2006). Vom rauen Endoplasmatischen Retikulum werden die Chylomikronen zum Golgiapparat weitertransportiert, wo sie in Sekretvesikel verpackt und durch Exozytose in das Lymphsystem abgegeben werden (Glickman et al. 1978). Hier kommt es zur Anlagerung der Apolipoproteine AI und AII. Mit dem Lymphstrom gelangen die Chylomikronen zum linken Venenwinkel, an dem die Lymphbahn in die Blutbahn einmündet. Unmittelbar nach dem Eintritt der Chylomikronen in den Blutkreislauf werden die Apolipoproteine A II und A IV der Chylomikronen gegen die Apolipoproteine E, C I, C II, C III der HDL ausgetauscht, wodurch sich die Chylomikronenoberfläche verändert. Mit dem Blutstrom gelangen die Chylomikronen an ihre Zielgewebe (Abb. 2).

Die Triacylglyceride der Chylomikronen werden durch die mit Hilfe des Apolipoproteins CII aktivierte Lipoprotein-Lipase, die sich vorwiegend in den Blutgefäßen der Muskulatur, des Fettgewebes und anderer peripherer Organe befindet, hydrolysiert (Mahley & Ji 1999). Dazu bleiben die Chylomikronen zunächst an Bindungsstellen des Endothels der Blutkapillaren haften. Im Anschluss werden die Triacylglyceride von der Lipoprotein-Lipase in freie Fettsäuren und Glyceride gespalten. 70-90 % des Triacylglyceridgehalts sowie beträchtliche Mengen an Apolipoprotein A I und Cholesterin gehen den Chylomikronen verloren und werden auf discoidale HDL-Vorstufen übertragen. Einen Teil der freigesetzten Fettsäuren nimmt das umgebende Gewebe auf. Sie werden als Brennstoffe und Vorstufen für die Lipidsynthese verwendet. Das freigesetzte Glycerin wird zur Leber transportiert und in den Stoffwechsel eingeschleust.

In Folge der Hydrolyse der Triacylglyceride schrumpfen die Chylomikronen zu cholesterinreichen Chylomikronenrestkörpern. Die Chylomikronenrestkörper lösen sich vom Kapillarendothel und gelangen mit dem Blutstrom zur Leber, wo sie durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden (Haraguchi et al. 2003). Die Endozytose wird über Apolipoprotein E, das Bestandteil der Chylomikronenrestkörper ist, durch Bindung an den LDL-Rezeptor und andere Rezeptorproteine ausgelöst. Die Menge an Cholesterin, die die Leber auf diesem Weg erreicht, reguliert die Aktivität der endogenen 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase, welche die Schrittmacherreaktion der endogenen Cholesterinsynthese katalysiert. Ein Teil der Chylomikronen wird in die Zellen des retikuloendothelialen Systems aufgenommen. Neuere Forschungsergebnisse lassen vermuten dass die Aufnahme von Lipiden der Chylomikronenrestkörper in Zellen des Immunsystems durch den Apo B-48 Rezeptor vermittelt wird. Dieser Rezeptor ist vorwiegend auf Makrophagen und Monozyten lokalisiert (Haraguchi et al. 2003; Brown et al. 2002).

### **1.2.2 VLDL, IDL, LDL und Lipoprotein(a)**

Neben den mit der Nahrung aufgenommenen Lipiden synthetisiert die Leber endogene Triacylglyceride und Cholesterin. Die von der Leber nicht selbst benötigten Lipide und das überschüssige Cholesterin werden durch die in der Leber synthetisierten VLDL und deren Abkömmlinge zu ihren Zielgeweben transportiert (Stoll & Bendszus 2006). Während ihrer Bildung in der Leber werden die VLDL mit dem Apolipoprotein B-100 ausgestattet. Im Blut nehmen die VLDL durch Wechselwirkung mit den HDL die Apolipoproteine E und C (vor allem CII) auf. Die in VLDL enthaltenen Triacylglyceride werden durch die in der Gefäßwand lokalisierte und durch CII aktivierte Lipoprotein-Lipase hydrolysiert und von den

umgebenden Zellen absorbiert. Die cholesterinesterreiche Reststruktur wird als IDL bezeichnet.

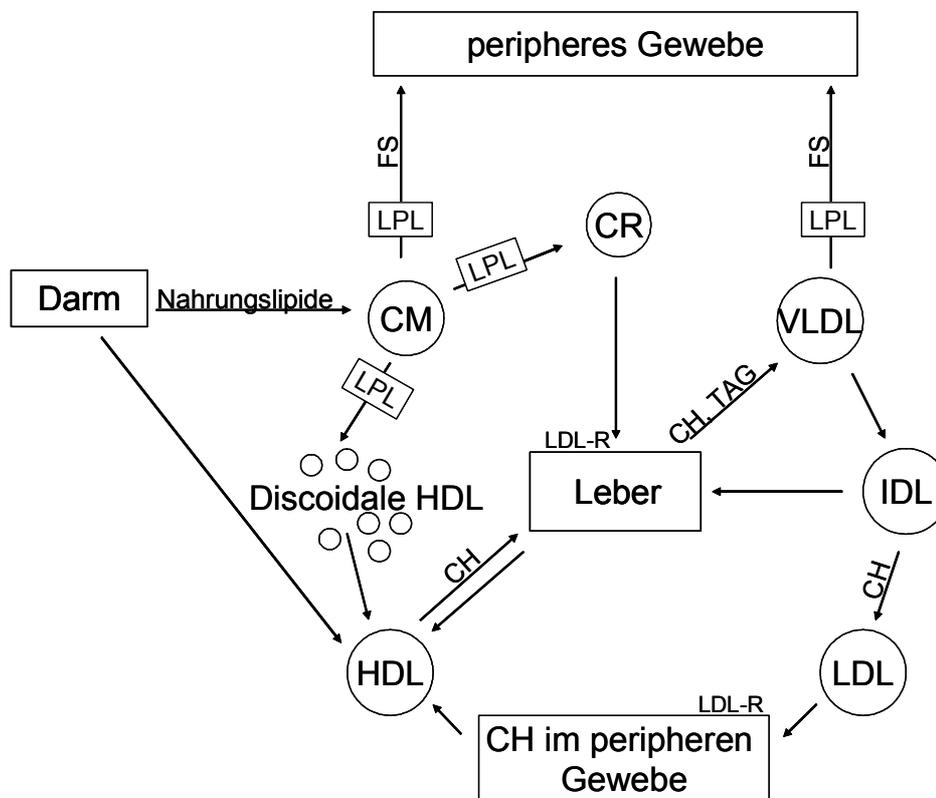


Abb. 2. Der Kreislauf der Lipoproteine. CH = Cholesterin; CM = Chylomikronen; CR = Chylomikronenrestkörper; FS = Fettsäuren; HDL = *High density lipoproteins*; IDL = *Intermediate density lipoproteins*; LDL = *Low density lipoproteins*; LDL-R = LDL-Rezeptor; LPL = Lipoproteinlipase; TAG = Triacylglyceride; VLDL = *Very low density lipoproteins*.

Die IDL werden über Apo E an den LDL-Rezeptor der Leber gebunden, durch Endozytose aufgenommen und metabolisiert (Mahley & Ji 1999).

Aus den IDL entstehen in der Leber durch einen nicht vollständig geklärten Prozess LDL-Partikel. Zusätzlich können die LDL auch außerhalb der Leber durch Reduktion des Triacylglycerid-Gehalts aus den IDL entstehen (Stoll & Bendszus 2006). Die LDL enthalten einen großen Teil des in der Leber synthetisierten Cholesterins, das sie über das Blut ins periphere Gewebe transportieren. Die Zellen des peripheren Gewebes nehmen die LDL durch rezeptorvermittelte Endozytose über den LDL-Rezeptor auf. Dort hemmen diese die zelleigene Cholesterinsynthese sowie die Synthese des LDL-Rezeptors.

Das Lipoprotein(a) stellt eine Untergruppe der LDL dar und enthält neben dem Apolipoprotein B-100 noch das Apo(a). Seine Funktion ist nicht bekannt. In der Klinik gelten erhöhte Apo(a)-Konzentrationen als Risikofaktor für die Entwicklung einer Arteriosklerose. Bekannt

ist seine hemmende Wirkung auf die Thrombolyse. Der Plasmaspiegel des Lipoproteins(a) ist genetisch determiniert und wird nur in geringem Maße von der Ernährung beeinflusst (Lippi & Guidi 2000).

### **1.2.3 HDL**

Die HDL spielen eine entscheidende Rolle im reversen Cholesterin-Kreislauf (Ji et al. 1997). Aufgrund ihrer spezifischen Dichte und Größe werden verschiedene HDL-Subpopulationen unterschieden. Ein wichtiger Bestandteil ist Apolipoprotein AI, das in der Leber und im Dünndarm synthetisiert wird. Dieses verbindet sich in der Blutbahn mit Phospholipiden und formt so die discoidale Vorstufen der HDL (Ohashi et al. 2005). Durch den Abbau von Chylomikronen entstehen zusätzlich in der Peripherie phospholipid- und cholesterinesterreiche discoidale HDL-Partikel. Sie sind die Vorstufen der reifen HDL. Auf ihrer Oberfläche tragen sie die Apolipoproteine CI und II sowie AI, AII und E (Schaefer et al. 1978). Sie integrieren in ihre äußere Hülle Cholesterin, das von abgestorbenen Zellen stammt oder mit Hilfe des ATP-abhängigen Transporters ABC-1 aktiv aus cholesterinreichen lebenden Zellen ausgeschleust wird. Die HDL verestern das aufgenommene Cholesterin mit Hilfe der an Apo AI gebundenen, hepatisch synthetisierten Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT). Die LCAT katalysiert die Umwandlung von Cholesterin und Phosphatidylcholin zu Cholesterinestern und Lysophosphatidylcholin. Während das Lysophosphatidylcholin abdiffundiert sinken die entstandenen Cholesterinester in den apolaren Kern der HDL-Partikel. Durch diese parallel ablaufenden Vorgänge wird die micelläre Form der HDL begünstigt und die zunächst discoidalen Partikel runden sich ab (Forti & Diament 2006). Zugleich entsteht auf der HDL-Oberfläche Platz für eine erneute Aufnahme von Cholesterin. Die HDL geben die Cholesterinester an VLDL und LDL weiter oder transportieren sie zur Leber (Ji et al. 1997). Die Aufnahme in die Leber erfolgt mit Hilfe des Apolipoprotein E über den LDL-Rezeptor. Außerdem können Cholesterinester der HDL über den Scavenger Rezeptor-B1 in Hepatozyten und steroidproduzierende Zellen aufgenommen werden. In der Leber wird das Cholesterin in den enterohepatischen Kreislauf integriert, zu Gallensalzen umgesetzt und in den Dünndarm sezerniert. 90 % der Gallensäuren werden rückresorbiert, der Rest wird mit dem Stuhl ausgeschieden (Houten et al. 2006).

### 1.3 Apolipoproteine

Die verschiedenen Lipoproteine sind durch ihre Apolipoproteine (Syn.: Apoproteine) charakterisiert. Es existieren mindestens elf verschiedene Apolipoproteine. Ihre Funktionen sind nur unvollständig bekannt. Die meisten Apolipoproteine werden in der Leber synthetisiert und sind zwischen den einzelnen Lipoprotein-Klassen austauschbar. Nur Apo B-48 und Apo B-100 sind in ihrer Lokalisation konstant (Schaefer et al. 1978). Apo B-48 ist nur in den Chylomikronen enthalten und wird ausschließlich in den Enterozyten gebildet. Apo B-100 wird vor allem in der Leber synthetisiert und ist in den VLDL, IDL und LDL zu finden.

Tab. 2. Molekulargewicht und Funktion der Apolipoproteine.

| <b>Apolipoprotein</b> | <b>Molekulargewicht (Dalton)</b> | <b>Funktion (soweit bekannt)</b>  |
|-----------------------|----------------------------------|---|
| <b>Apo A I</b>        | 28.331                           | aktiviert die LCAT  |
| <b>Apo A II</b>       | 17.380                           | Strukturelement der HDL   |
| <b>Apo A IV</b>       | 44.000                           | unbekannt   |
| <b>Apo(a)</b>         | 300.000-800.000                  | unbekannt, Risikofaktor für Arteriosklerose                                 |
| <b>Apo B-48</b>       | 240.000                          | Strukturelement der Chylomikronen   |
| <b>Apo B-100</b>      | 513.000                          | bindet an LDL-Rezeptor  |
| <b>Apo C I</b>        | 7.000                            | inhibiert Chylomikronen- und VLDL-Aufnahme in die Leber, aktiviert die LCAT |
| <b>Apo C II</b>       | 8.837                            | aktiviert die LPL   |
| <b>Apo C III</b>      | 8.751                            | hemmt die LPL, aktiviert die LCAT   |
| <b>Apo D</b>          | 32.500                           | aktiviert die LCAT, Strukturelement   |
| <b>Apo E</b>          | 34.145                           | Ligand des LDL-Rezeptors und des LRP  |

Apo B-48 entsteht in einem als RNA-Editing bekannten Vorgang durch Modifizierung der Basensequenz der Apo B-mRNA (Anant & Davidson 2001). Hierbei wandelt die im Darm lokalisierte Cytosin-Desaminase am Codon 2153 der Apolipoprotein B-mRNA einen Cytosin-Rest in einen Uracil-Rest um, wodurch ein Stopp-Codon (UAA) entsteht. Dieser Vorgang führt zur Synthese des Apo B-48 als Translationsprodukt des vorderen Abschnittes der Apo B-mRNA. In den übrigen Geweben, vor allem der Leber, erfolgt kein Editing, so dass als vollständiges Translationsprodukt das Apo B-100 gebildet wird.

Die Struktur der Apolipoproteine zeichnet sich durch das Vorkommen ausgeprägter amphiphiler  $\alpha$ -helicaler Domänen aus. Dadurch sind die Lipoproteine in der Lage, gleichzeitig mit lipidreichen Kernen der Lipoproteine und dem umgebenden wässrigen Milieu in Wechselwirkung zu treten. Mehrere  $\beta$ -Faltblattstrukturen tragen zur Stabilität der Lipoproteine bei.

## 1.4 Lipoproteinrezeptoren

### 1.4.1 Der LDL-Rezeptor

Der LDL-Rezeptor wird in nahezu allen Geweben synthetisiert. Die Aufgabe des LDL-Rezeptors besteht in der Aufnahme von LDL über Apo B-100 in das periphere Zielgewebe und in die Leber (Haraguchi et al. 2003) sowie von Chylomikronen, VLDL-Restkörpern und HDL über Apo E in die Leber (Mahley & Ji 1999). Um eine Bindung von Apolipoprotein E herzustellen und zur Aktivierung der rezeptorvermittelten Endozytose in die Leber wird neben dem LDL-Rezeptor auch das LRP (*LDL receptor-related protein*) benötigt (Mahley & Ji 1999). Mehrere Rezeptoren liegen in einem bestimmten Bereich der Zellmembran assoziiert vor und können mit Hilfe ihrer cytoplasmatischen Domäne mit Clathrin interagieren. Durch diese Interaktion entstehen *coated pits* in der Zellmembran. Die über Apo B-100 oder Apo E gebundenen Lipoproteine werden in endozytotischen Vesikeln in die Zelle transportiert. Die Vesikel fusionieren mit Lysosomen, die verschiedene Proteasen enthalten, welche die Apolipoproteine zu freien Aminosäuren abbauen. Zusätzlich werden durch verschiedene Lipasen die Phosphoglyceride und Cholesterinester hydrolysiert. Der LDL-Rezeptor wird nach Dissoziation der Lipoproteine unverändert an die Zelloberfläche zurücktransportiert. Das freigesetzte Cholesterin und die Fettsäuren werden in das Cytosol aufgenommen. Das Cholesterin kann als Membranbaustein verwendet oder erneut verestert und in der Zelle gespeichert werden. Die Wiederveresterung wird durch die zelleigene, durch freies Cholesterin aktivierbare, Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) katalysiert.

Der LDL-Rezeptor ist ein Transmembranglykoprotein, das aus 839 Aminosäuren besteht. Das negativ geladene und Cystein-reiche N-terminale Ende des Rezeptorproteins ragt in den extrazellulären Raum und enthält die Bindungsstellen für das Apolipoprotein B-100 und Apolipoprotein E. An diese Ligandenbindungsdomäne schließt sich eine 400 Aminosäuren lange Domäne mit Homologie zum EGF-Rezeptor-Vorläufer (*Epidermal-Growth-Factor*) an. Es folgt eine O-glykosidisch modifizierte Domäne mit 58 Aminosäuren. Die Transmembran-

domäne besteht aus 22 hydrophoben Aminosäuren. Das intrazellulär lokalisierte C-terminale Ende besteht aus weiteren 50 Aminosäuren.

#### **1.4.2 Der Scavenger-Rezeptor B1 und das ABC1-Protein**

Der Scavenger-Rezeptor (SR-BI) vermittelt eine partielle und selektive Aufnahme von Cholesterinestern und Lipiden aus den HDL und LDL in Hepatozyten und in steroidhormonproduzierende Zellen der Nebennierenrinde, der Ovarien und des Hodens (Dorfman et al. 2005). Die entladenen HDL dissoziieren und kehren in den Blutkreislauf zurück, um erneut Lipide aus Chylomikronen- und VLDL-Restkörpern sowie aus abgestorbenen Zellen aufzunehmen. Entladene HDL können auch zur Entladung von Cholesterin-Speichern peripherer Zellen beitragen. Dabei bewirkt die Interaktion der HDL mit dem SR-BI die passive Bewegung von Cholesterin der Zelloberfläche zu den HDL (Gu X et al. 2000). Das so aufgenommene Cholesterin und die Lipide werden zur Leber transportiert und dort verstoffwechselt (reverser Cholesterintransport).

Eine weitere Möglichkeit der Cholesterinaufnahme der HDL basiert auf der Interaktion des Apo A I mit dem ABC1-Transporter einer cholesterinreichen Zelle (Ji et al. 1997). Das ABC1-Protein gehört zu einer großen Familie von *Multidrug*-Transportern, die ATP-abhängig eine Vielzahl von Ionen, Aminosäuren, Vitaminen, Steroidhormonen und Gallensalzen durch die Plasmamembran transportieren. Das Apo A I wird vermutlich gemeinsam mit dem HDL durch Endozytose aufgenommen und mit Hilfe des ABC1-Proteins recycelt. Dieses transportiert zusätzlich Cholesterin an die Zelloberfläche (Knight 2004).

#### **1.4.3 Der Apo B-48 Rezeptor**

Die Struktur und Funktion des Apo B-48 Rezeptors ist im Gegensatz zu den anderen Lipoproteinrezeptoren wenig erforscht. Der Apo B-48 Rezeptor wird auf Blutmonozyten sowie auf Makrophagen im Gehirn, im Herzen, in den Nieren, in der Leber, in der Lunge, im Pankreas und in der Plazenta exprimiert. Die Rezeptordichte ist in der Plazenta und Lunge größer als im Herz und Gehirn (Tanaka 2004; Brown et al. 2000).

Der Rezeptor bindet das Apo B-48 der Chylomikronen und der Chylomikronenrestkörper. Zusätzlich ist der Rezeptor in der Lage, die Apolipoprotein B-48-äquivalente Domäne des Apo B-100 der VLDL zu binden. Eine Aufnahme von Triglyceriden konnte experimentell bei Überexpression des Apo B-48 Rezeptors in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) gezeigt werden. Der genaue Aufnahmemechanismus ist unbekannt. Die Aufnahme ist jedoch von Apo E unabhängig. Da der Rezeptor auch auf Schaumzellen gefunden wurde, wird

vermutet dass eine Aufnahme von Lipiden über den Apo B-48 Rezeptor in Makrophagen und Monozyten zur Schaumzell-Bildung führt und damit die Entstehung von artherosklerotischen Plaques begünstigt (Brown et al. 2000; Haraguchi et al. 2003).

Es sind zwei unterschiedliche Formen des Apolipoprotein B-48 Rezeptors bekannt, die sich in ihrer Größe (200 kDa und 235 kDa) unterscheiden (Brown et al. 2000). Hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz sind die sehr polaren Rezeptoren einzigartig. Es wird vermutet, dass sie über eine der zwei vorhandenen hydrophoben Regionen in der Zellmembran verankert sind. Die erste hydrophobe Region besteht aus 30 helikal angeordneten Aminosäuren. Die zweite hydrophobe Domäne besitzt eine geringere Hydrophobizität. Sie ist 23 Aminosäuren lang und hat ebenfalls ein hohes helikales Potential. Außerdem weist sie potentielle Bindungsstellen für Glycosaminoglykane sowie eine N- und vier O-Glycosylierungsstellen auf. Aufgrund der *Coiled-Coil*-Motive liegt die Vermutung einer Homodimerbildung nahe (Brown et al. 2000 und 2002).

### **1.5 Endozytose von Lipoproteinen durch Leukozyten**

Die Aufnahme von Chylomikronenrestkörpern durch Makrophagen wurden unter anderem von Palmer et al. (2005), Napolitano und Bravo (2006) und De Pascale et al. (2006) beschrieben. Von ihnen werden LDL-Rezeptor-unabhängige Aufnahmemechanismen von Chylomikronenrestkörpern in Makrophagen, unter anderem über den SR-BI Rezeptor, vermutet. Allerdings wird eine Aufnahme von Chylomikronen durch Phagozytose oder Makropinozytose von Elsegood und Mamo (2006) prinzipiell ausgeschlossen. Diese Arbeitsgruppe begründet ihre Aussage damit, dass keine Phagolysosomen in den untersuchten Makrophagen gefunden wurden und eine pharmakologische Hemmung des Phagozytoseprozesses keinen Effekt auf die Aufnahme von Chylomikronen in Makrophagen hatte.

Napolitano und Bravo (2006) stellten fest, dass die Aufnahme von mit Choleteryleat, Triacylglycerol, Triolein oder Trilinolein beladenen Chylomikronenrestkörpern in Makrophagen hauptsächlich über den LDL-Rezeptor erfolgt. Daneben existiert eine selektive Cholesterinaufnahme durch den SR-BI Rezeptor, die weder von der LDL-Rezeptor-vermittelten Endozytose noch von der Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL) abhängt.

Die Arbeitsgruppe um Napolitano und Bravo (2005) stellte weiter fest, dass bei Makrophagen die Sekretion spezifischer Entzündungsmediatoren durch die Aufnahme bestimmter Fette aus Chylomikronenrestkörpern moduliert wird. Die Aufnahme von Chylomikronenrestkörpern bewirkt unabhängig von ihrer Beladung mit Oxysterol eine verminderte Ausschüttung von

TNF- $\alpha$ , während die IL-10-Sekretion unbeeinflusst bleibt. Die IL-6-Sekretion war hingegen abhängig von der Art der in den Chylomikronenrestkörpern enthaltenen Lipide. So wurde die Interleukin-6-Sekretion bei Aufnahme von mit 7 $\beta$ -Hydroxysterol beladenen Chylomikronen reduziert wohingegen sie bei mit 7-Ketosterol beladenen Chylomikronen gleich blieb.

Miura et al. (1993) stellten fest, dass das Proliferationsvermögen sowie die Mobilität von Lymphozyten durch die Gegenwart von Chylomikronen und deren Beladung beeinflusst wird. So regen vor allem lange Fettsäuren die Lymphozytenproliferation und Zytokinsekretion an. Diesen Ergebnissen widersprechen De Deckere et al. (1988), die zu dem Schluss kommen, dass VLDL und Chylomikronen die Lymphozytenproliferation hemmen.

De Sanctis et al. (1995) beschäftigten sich mit der Aufnahme von Lipoproteinen in natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Dabei stellten sie fest, dass alle Klassen von Lipoproteinen in die NK-Zellen aufgenommen werden und sowohl die Proliferation als auch die Zytotoxizität dieser Zellen beeinflussen. Die Aufnahme von Chylomikronen führt zu einer verstärkten Proliferation der NK-Zellen. Die Beeinflussung der Zytotoxizität durch Chylomikronen ist abhängig von ihrer Konzentration. So führen sie in geringeren Konzentrationen zu einer verstärkten Zytotoxizität, während sie diese in höheren Konzentrationen hemmen.

## **1.6 Zielsetzung**

Aufgrund der dargestellten Datenlage erscheint es naheliegend, dass die Aufnahme von Fetten aus Lipoproteinen durch Zellen des Immunsystems eine bisher wenig untersuchte Rolle für immunologische Prozesse spielt. Die zu erwartenden Effekte sowie die beteiligten Mechanismen sind noch weitgehend unklar. Möglicherweise spielt der Apo B-48 Rezeptor eine entscheidende Rolle. Die Aufnahme von Chylomikronen könnte nicht nur der Versorgung von Zellen des Immunsystems mit Lipiden dienen, sondern auch eine Rolle in der Immunregulation spielen.

Um eine detailliertere Untersuchung der Bedeutung der Chylomikronen für das Immunsystem zu ermöglichen, sollte eine Methode zum Nachweis der Aufnahme dieser Lipoproteine durch Lymphozyten etabliert werden. Dazu wurden Chylomikronen aus humanem Vollblut isoliert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Anschließend wurden erste orientierende Endozytose-Versuche mit klonierten Leukozyten-Zelllinien durchgeführt. Versuche zum Nachweis der Aufnahme der Chylomikronen erfolgten durch FACS-Analyse, konfokale und Elektronen-Mikroskopie.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

#### *Zentrifugen*

|              |   |
|--------------|---|
| Cyto-Tek     | Sakura Finetek, Zoeterwoude,<br>Niederlande |
| Mikro 220 R  | Hettich, Tuttlingen                         |
| Mikro 200    | Hettich, Tuttlingen                         |
| Rotanta 46 R | Hettich, Tuttlingen                         |

#### *Protein-Gelelektrophorese-Apparatur/Blotting-Apparatur*

|  |                            |
|--|----------------------------|
| Horizontal Mini Gel System Model: The Unleakable | AGS, Heidelberg            |
| Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell              | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| PowerPac 200 Power Supply                        | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| Transblot SD Semi-Drying System                  | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |

#### *Lipoprotein-Elektrophorese-Apparatur*

|                                   |              |
|-----------------------------------|--------------|
| Elektrophoreseapparatur, HYDRASYS | Sebia, Fulda |
|-----------------------------------|--------------|

#### *Schüttler, Rührer, Wasserbäder, Inkubatoren, pH-Meter*

|                                       |                         |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Begasungsbrutschrank                  | Heraeus, Hanau          |
| Heizer/Magnetrührer; IKA-COMBIMAG RET | Janka & Kunkel, Staufen |
| Schüttler: UNIMAX 1010                | Heidolp, Kelheim        |
| DUOMAX 1030                           | Heidolp, Kelheim        |
| Wasserbad U3                          | Julabo, Seelbach        |

#### *Mikroskope*

|  |                  |
|--|------------------|
| Elektronenmikroskop EM 902                                 | Zeiss, Jena,     |
| Fluoreszenzmikroskop Axiolab                               | Zeiss, Göttingen |
| Konfokales Laser-Scanning Mikroskop<br>Leica-TCS SP2 AOBS; | Leica, Mannheim, |
| Transmissionselektronenmikroskop EM 902                    | Zeiss, Göttingen |

Zellkulturmikroskop Wollovert 30

hund, Wetzlar

### ***Sonstige Geräte***

Einfrierautomat Nicool plus PC

Air liquide, Kryotechnik GmbH,  
Düsseldorf

FACS (*Fluorescence Activated Cell Scanner*)

Beckman Coulter, Krefeld

FACS (*Fluorescence Activated Cell Scanner*) Epics XL  
mit Betriebssystem CellQuest Pro

BD Biosciences, San Jose, CA  
USA

Flüssigstickstoff-Probenaufbewahrungsbehälter  
Arpege 140

Air liquide, Kryotechnik GmbH,  
Düsseldorf

HAMILTON-Spritze: 25 µl

Roth, Karlsruhe

Mikrotom: Reichert Ultracut E

Leica, Unterentfelden, Schweiz

Multipette plus

Eppendorf, Hamburg

Pipetten: 10 µl/ 20 µl/ 200 µl/ 1000 µl

GILSON, Villiers-le-Bel,  
Frankreich

Präzisionswaage: DeltaRange

Mettler Toledo, Schweiz

Reinstwasseranlage Milli-Q Synthesis A 10

Millipore, Bedford, MA, USA

Thermomixer compact

Eppendorf, Hamburg

Zell-Zählgerät A<sup>C</sup>, T8

Beckman Coulter, Krefeld

## **2.2 Chemikalien und Reagenzien**

### ***Chemikalien für die Kultur von PBMC und Zelllinien***

Aqua ad injectabilia

Baxter, Unterschleißheim

DMSO (Dimethylsulfoxid)

Fluka Chemie, Sigma-Aldrich,  
Steinheim

Gentamicin 50 mg/ml

Invitrogen, Zellsysteme GIBCO,  
Karlsruhe

HAB Serum

Rotes Kreuz

Humaninsulin, rekombinant,

Invitrogen, Zellsysteme GIBCO,  
Karlsruhe

L-Glutamin 200 mM (100 ×), flüssig

Invitrogen, Zellsysteme GIBCO,  
Karlsruhe

LSM<sup>®</sup> (Lymphocyte Separation Medium)

Cappel, Aurora, Ohio, USA

MEM Nichtessentielle Aminosäure (100 ×), flüssig

Invitrogen, Zellsysteme GIBCO,  
Karlsruhe

Natriumpyruvat MEM 100 mM, flüssig

Invitrogen, Zellsysteme GIBCO,  
Karlsruhe

PBS (10 x) pH 7,4 –CaCl<sub>2</sub>-MgCl<sub>2</sub>

Invitrogen Corporation, GIBCO,  
Paisley, Schottland

### ***Zellaktivatoren***

ConA (Concanavalin A)

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,  
USA

IL-2 (= Proleukin)

Chiron Behring GmbH & Co KG,  
Marburg

PHA (Phytohämagglutinin)

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,  
USA

### ***Kulturmedien***

Fetales Rinderserum (FCS)

Sigma Aldrich, Taufkirchen

RPMI 1640 Medium (with 25 MM HEPES Buffer  
without L-Glutamine)

Invitrogen, Zellsysteme GIBCO,  
Karlsruhe

RPMI 1640 Medium

Invitrogen Corporation, GIBCO,  
Paisley, Schottland

### ***Fluoreszenzmarkierung***

Fluorescein Isothiocyanate Isomer I\*MINI

Sigma Aldrich, Schnelldorf

### ***FITC-markierte Polystyrenpartikel***

FluoSpheres<sup>®</sup> carboxylate-modified microspheres,

Molecular Probes, Eugene, USA

### ***Reagenzien und Materialien für die Western-Blot-Analyse***

2-Mercaptoethanol

Roth, Karlsruhe

30 % NF-Rotiphoese Arylamid/Bis  
(30 % Monoacrylamid/0,8 % Bisacrylamid)

Roth, Karlsruhe

APS (Ammonium-Peroxidsulfat)

Fluka, BioChemika,  
Sigma Aldrich, Steinheim

Coomassie Brilliant Blue

SERVA, Boehringer, Ingelheim

Essigsäure

Roth, Karlsruhe

Extra Thick Filter Paper

Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Fixierer: AGFA ACIDOFIX Fixer

Agfa-Gevaert AG, Leverkusen

Foto-Entwickler: Eukobrom

TETENAL, Norderstedt

Glycin

Roth, Karlsruhe

|   |  |
|---|--|
| Immun-Blot PVDF Membran                     | Bio-Rad, Hercules, CA, USA                     |
| Methanol                                    | Roth, Karlsruhe                                |
| Röntgenfilm: Kodak BioMax XAR Film          | Sigma-Aldrich, Steinheim                       |
| Salzsäure (HCl)                             | Roth, Karlsruhe                                |
| SDS-Laufpuffer                              | Roth, Karlsruhe                                |
| SDS-Probenpuffer                            | Roth, Karlsruhe                                |
| SDS 10 %                                    | Fluka, BioChemika,<br>Sigma Aldrich, Steinheim |
| TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin) | Fluka, BioChemika,<br>Sigma Aldrich, Steinheim |
| Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)      | Roth, Karlsruhe                                |

### ***Molekulargewichtsstandard***

|                      |                 |
|----------------------|-----------------|
| Roti-Mark PRESTAINED | Roth, Karlsruhe |
|----------------------|-----------------|

### ***Detektions-Kit für Western Blot***

|  |                 |
|--|-----------------|
| Lumi-Light <sup>Plus</sup> Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit) | Roche, Penzberg |
|--|-----------------|

### ***Reagenzien für die Lipoprotein-Elektrophorese***

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Ethanol (unvergällt)    | MERCK, Darmstadt<br>Riedel de Haën, Seelze |
| Hydragel 7 LIPO + Lp(a) | sebia, Fulda                               |
| Isopropanol             | Roth, Karlsruhe                            |

### ***Fixationsmittel für die konfokale Mikroskopie***

|  |  |
|--|--|
| Formalin 4 %                                   | Roth, Karlsruhe                              |
| NaCl 0,9 %                                     | Braun, Melsung                               |
| Vectashield (Mounting Medium for Fluorescence) | Vector Laboratories Inc.,<br>Burlingham, USA |
| Vectashield with Dapi                          | Vector Laboratories Inc.,<br>Burlingham, USA |

### ***Einbettmedium für die Elektronenmikroskopie***

|               |                |
|---------------|----------------|
| Epon: Agar100 | Plano, Wetzlar |
|---------------|----------------|

## *Antikörper*

### *für FACS-Messung*

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| APC-markierter anti-CD19 Antikörper, Klon SJ25C1       | BD Biosciences, San Jose, USA |
| APC-markierter anti-CD3 Antikörper, Klon SK7           | BD Biosciences, San Jose, USA |
| APC-markierter anti-CD33 Antikörper, Klon P67.6        | BD Biosciences, San Jose, USA |
| ECD-IgG1-Antikörper, Klon 679.1Mc7                     | Beckman Coulter, Krefeld      |
| ECD-markierter anti-CD3 Antikörper, Klon UCHT1         | Beckman Coulter, Krefeld      |
| FITC-IgG1-Antikörper, Klon 679.1Mc7                    | Beckman Coulter, Krefeld      |
| FITC-markierter anti-CD19 Antikörper, Klon J3-119      | Beckman Coulter, Krefeld      |
| FITC-markierter anti-V $\gamma$ 9 Antikörper, IMMU-360 | Beckman Coulter, Krefeld      |
| PC5-markierter anti-CD14 Antikörper, Klon RMO52        | Beckman Coulter, Krefeld      |
| PE-IgG1-Antikörper, 679.1Mc7                           | Beckman Coulter, Krefeld      |
| PE-markierter anti-CD14 Antikörper, Klon RMO52         | Beckman Coulter, Krefeld      |
| PE-markierter anti-CD19 Antikörper, Kon J4.119         | Beckman Coulter, Krefeld      |
| PE-markierter anti-CD33 Antikörper, Klon D3HL60.251    | Beckman Coulter, Krefeld      |
| PE-markierter anti-CD4 Antikörper, Klon 13B8.2         | Beckman Coulter, Krefeld      |
| PE-markierter anti-CD5 Antikörper, Klon BL1a           | Beckman Coulter, Krefeld      |

### *für die Western Blot-Analyse*

|   |   |
|---|---|
| Anti-Fluorescein, Klon B13-DE1              | Roche Diagnostics GmbH,<br>Mannheim         |
| Anti-Maus Ig-POD, F <sub>ab</sub> fragments | Roche, Penzberg                             |
| ApoB-100, Maus IgG1, Klon 13                | BD Transduction Laboratories,<br>Heidelberg |

### *für die immunhistochemischen Untersuchungen*

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| Esel-Anti-Maus-Cy 3, Lotnummer 64515                                     | Dianova, Hamburg                  |
| Esel-Anti-Hase IgG (H+L) Cy 3, Lotnummer 0512017780                      | Chemicon International, Billerica |
| Esel-Anti-Maus-Cy 5, polyklonal, Lotnummer 62991                         | Dianova, Hamburg                  |
| Monoclonal Antibody anti-CD14, Klon RMO52                                | Beckman Coulter, Krefeld          |
| Monoclonal Antibody Anti-Human TCR PAN $\gamma/\delta$ ,<br>Klon IMMU510 | Beckman Coulter, Krefeld          |
| Monoclonal Antibody Anti-Human TCR PAN $\alpha/\beta$<br>Klon BMA 031    | Beckman Coulter, Krefeld          |

### ***Reagenzien und Chemikalien für immunhistochemische Untersuchungen***

|                             |                                       |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| BSA (Bovine Serum Albumin)  | Sigma Aldrich, Steinheim              |
| Glycerol pH 8,6             | Roth, Karlsruhe                       |
| NGS (Normo Goat Serum)      | Dako cytomation, Glostrup<br>Dänemark |
| TO-PRO-3 iodide (Alexa 647) | molecular probes, Karlsruhe           |

### **2.3 Zelllinien**

|  |  |
|--|--|
| human acute monocytic leukemia, MONO-MAC-6 | DSMZ (Deutsche Sammlung von<br>Mikroorganismen und Zellkulturen<br>GmbH), Braunschweig |
| human B cell leukemia, ROS-50              | DSMZ, Braunschweig   |
| human T cell leukemia, MOLT-14             | DSMZ, Braunschweig   |
| human T cell leukemia, MOLT-16             | DSMZ, Braunschweig   |

### **2.4 Verbrauchsmaterialien**

#### ***Kulturflaschen/-Platten***

|  |  |
|--|--|
| Kulturflaschen; 50 ml, 25 cm <sup>2</sup>                    | Geiner bio-one, Frickenhausen          |
| Rundboden-Wellplatte; Nunc-Immuno Plate,<br>Maxisorp Surface | NUNC, Brand Products,<br>Dänemark      |
| Tissue Culture Flasks, 50 ml, sterile, CELLSTAR              | Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen |
| Tissue Culture Plate, 96 W, Flat bottom with lid, sterile    | Geiner bio-one, Frickenhausen          |

#### ***Pipettenspitzen***

|  |  |
|--|--|
| Pipettenspitzen: - 10 ml   | FALCON Beston Dickinson,<br>Le Pont De Claix, Frankreich |
| - 1000 µl/ 200 µl/ 20µl  | GILSON, Villiers-le-Bel,<br>Frankreich                   |
| Pipettenspitzen: 10 µl /20 µl/ 200 µl/ 1000 µl<br>DIAMOND D200ST | GILSON, Villiers-le-Bel,<br>Frankreich                   |
| Plastik-Stabpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml FALCON                   | Beston Dickinson, Le Pont<br>Claix, Frankreich           |

### ***Sonstige Materialien***

|  |  |
|--|--|
| Citrat-Monovetten                                | SARSTEDT, Nümbrecht                                    |
| EDTA Monovetten 2,5 ml                           | SARSTEDT, Nümbrecht                                    |
| FACS-Probenröhrchen 5 ml Polysteren Round-Bottom | SARSTEDT, Nümbrecht                                    |
| FACS-Probenröhrchen 5 ml Polysteren Round-Bottom | BD Biosciences, Bedford, USA                           |
| Multifly-Kanülen mit Multi-Adapter, gelb         | SARSTEDT, Nümbrecht                                    |
| Objektträger SuperFrost / Deckglas (24 × 50 mm)  | R. Langenbrinck; Labor und<br>Medizintechnik; Teningen |
| Parafilm   | Pechiney Plastic Packaging,<br>Menasha, WI, USA        |
| Pasteurpipetten; 150 mm                          | Brand, Wertheim  |
| Petrischalen; 60 × 15 mm; FALCON, PRIMARIA™      | BD Biosciences,<br>Le Pont De Claix, Frankreich        |
| Petrischalen: 145/20 mm                          | Greiner Labortechnik,<br>Frickenhausen                 |
| Plastik-Röhrchen: 15 ml/ 50 ml; CELLSTAR         | Greiner bio-one, Frickenhausen                         |
| Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml             | Eppendorf, Hamburg                                     |
| S-Monovetten 9,0 ml/ 7,5 ml, Plasma, Li-Hep      | SARSTEDT, Nümbrecht                                    |
| Trockenblock                                     | Schleicher & Schuell, Dassel                           |

## 2.5 Isolation und Fluoreszenzmarkierung von Chylomikronen

### 2.5.1 Isolation der Chylomikronen aus Vollblut

Für die Isolation von Chylomikronen wurden Lipemische Plasmaprodukte aus der Blutspende des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin verwendet. Das Plasma wurde in Eppendorfgläser überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 45 min bei 14000 rpm (Mikro 220R, Hettich), 25 °C, Beschleunigung 9, Bremse 1. Bei Entnahme der Eppendorfgläser aus der Zentrifuge befand sich eine weiße, die Chylomikronen enthaltende Schicht auf der Plasmaoberfläche. Diese wurde vorsichtig abpipettiert, in frische Eppendorfgläser mit je 1 ml PBS (pH 7,4 ohne CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>) überführt und gemischt. Zur Aufreinigung der Chylomikronen wurde unter denselben Bedingungen erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt.

### 2.5.2 Markierung der Chylomikronen mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)

Zur Fluoreszenzmarkierung der Chylomikronen wurde FITC verwendet (Abb. 3).

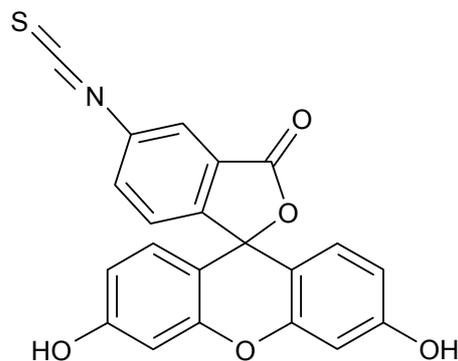


Abb. 3. Strukturformel von FITC

FITC ist eine fluoreszierende Verbindung mit einem Anregungsmaximum bei 494 nm und einem Emissionsmaximum bei 520 nm. Sie bindet über die Isothiocyanat-Gruppe an freie Amin-, Thiol-, Imidazol-, Tyrosyl und Carbonylgruppen und wird daher zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen verwendet. Der Farbstoff wurde in DMSO (10 mM; 3,9 mg/ml) gelöst und in einer Endkonzentration von 500 µM zu den aufgereinigten Chylomikronen gegeben. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Chylomikronen erneut dreimal mit PBS gewaschen wie unter 2.5.1 beschrieben.

### **2.5.3 Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die diskontinuierliche SDS-PAGE ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung denaturierter Proteine. Für die Untersuchungen der Apolipoproteine B-48 und B-100 wurde ein 7 % Acrylamid-Trenngel ohne Sammelgel verwendet. Dazu wurden 1,5 mm dicke Minigele in einem Vertikal-Minigelsystem (Bio-Rad) gegossen. Bei der Herstellung der Gele wurde darauf geachtet, dass APS und TEMED erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugefügt wurde. Das Trenngel wurde gegossen und der Kamm eingesetzt. Es polymerisierte innerhalb von 1-2 h aus. Nach der Polymerisierung wurde das Gel in der Gelkammer montiert und der SDS-Laufpuffer eingefüllt. Der Kamm wurde erst unter dem SDS-Laufpuffer entfernt.

Für die Auftrennung der Gesamt-Plasmaproteine wurde ein 12 %-Trenngel mit einem 5 %-Sammelgel verwendet. Zunächst wurde das 12 %-Trenngel gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das Wasser mit einem Papiertuch entfernt und das Sammelgel gegossen. Der Kamm wurde in das Sammelgel eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisierung des Gels wurde dieses in der Gelkammer montiert, mit Laufpuffer überschichtet und der Kamm entfernt.

Der  $4 \times$  SDS-Probenpuffer wurde so mit den Proben gemischt, dass er in den Proben in einfacher Konzentration vorlag. Danach wurde der Ansatz bei 98 °C für 10 min oder bei 50 °C für 15 min denaturiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (13.000 rpm, RT, Tischzentrifuge) entfernt. Die denaturierten Proben in Probenpuffer wurden bei -20 °C gelagert. Vor ihrer Verwendung wurden sie für 2 min im Wasserbad bei 50 °C aufgetaut und erneut anzentrifugiert. Der Molekulargewichtsstandard wurde vor dem Beladen des Gels bei 70 °C aufgetaut und anzentrifugiert. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden 10-40 µl der Proben pro Tasche geladen. Die beiden äußeren Taschen wurden mit je 2-5 µl des Molekulargewichtsstandards beladen.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA und einer Spannung von 200 V über eine Dauer von ca. 4 h. Das Ende der Elektrophorese wurde bei der Verwendung des 7 %-Trenngels durch die Höhe der zweiten Bande des Molekulargewichtsstandards (123 kDa) bestimmt. Die Färbung der Gele erfolgte für 30 min bei RT unter leichtem Schwenken in Coomassie-Färbelösung. Anschließend wurden die Gele über Nacht in Entfärber differenziert.

7 % Acrylamid-Trenngel:

|   |                              |
|---|------------------------------|
| 6,9 % Monoacrylamid/<br>0,18 % Bisacrylamid | 2,3 ml, 30 % Acrylamid-Mix   |
| 375 mM TrisHCl pH 8,8                       | 2,5 ml, 1.5 M TrisHCl pH 8,8 |
| 0,1 % SDS                                   | 0,1 ml, 10 % SDS             |
| 0,1 % APS                                   | 0,1 ml, 10 % APS             |
| 0,07 % TEMED                                | 0,007 ml TEMED               |
|   | 4,99 ml H <sub>2</sub> O     |

12 % Acrylamid-Trenngel:

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 12 % Monoacrylamid /<br>0,32 % Bisacrylamid | 4 ml, 30 % Acrylamid-Mix      |
| 375 mM Tris HCl pH 8,8                      | 2,5 ml, 1.5 M Tris HCl pH 8,8 |
| 0,1 % SDS                                   | 0,1 ml, 10 % SDS              |
| 0,1 % APS                                   | 0,1 ml, 10 % APS              |
| 0,004 % TEMED                               | 0,004 ml TEMED                |
|   | 3,29 ml H <sub>2</sub> O      |

5 % Acrylamid-Sammelgel:

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| 5 % Monoacrylamid /<br>0,13 % Bisacrylamid | 0,83 ml, 30 % Acrylamid-Mix    |
| 127 mM Tris HCl pH 6,8                     | 0,63 ml, 1.0 M Tris HCl pH 6,8 |
| 0,1 % SDS                                  | 0,05 ml, 10 % SDS              |
| 0,1 % APS                                  | 0,05 ml, 10 % APS              |
| 0,1 % TEMED                                | 0,005 ml TEMED                 |
|  | 3,43 ml H <sub>2</sub> O       |

Acrylamid-Mix: 30 % Monoacrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid  
(Rotiphorese Gel 30, Roth)

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Sammelgelpuffer: 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8

SDS-Probenpuffer: Roti-Load1 4 × konz., reduzierend (Roth)

10 × SDS-Laufpuffer: Rotiphorese 10 × SDS-PAGE (Roth)

Coomassie-Färbelösung:

0,1 % Coomassie Brillant Blue R20 0,1 ml Coomassie Brillant Blue R20

50 % Ethanol 50 ml Ethanol

10 % Essigsäure 10 ml Essigsäure

Entfärber:

12,5 % Methanol 250 ml Methanol

7,5 % Essigsäure 150 ml Essigsäure

1,6 l H<sub>2</sub>O

#### 2.5.4 Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse werden durch SDS-PAGE getrennte Proteine vom Gel auf eine Membran übertragen. Danach ist es möglich einzelne Proteine durch die Bindung spezifischer Antikörper auf der Membran nachzuweisen. Mit einem Chemilumineszenz-Reagenz kann die Antikörperbindung durch Schwärzung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden.

Zur Vorbereitung des Transfers wurden die Membran (PVDF, Immun-Blot, Bio-Rad) sowie zwei Stücke Blotting-Papier (Extra Thick Filter Paper, Bio-Rad) auf die Größe des Gels (5 × 8 cm<sup>2</sup>) zugeschnitten. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 20 min auf dem Schwenker in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran wurde zwischenzeitlich für 5 min mit Methanol benetzt und anschließend mit Transferpuffer getränkt. Die beiden Blotting-Papiere wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte mit einer Semi-Dry-Apparatur (Transblot SD Semi-Dry Electrophoretic Cell, Bio-Rad). Auf die Anode wurden ein getränktes Blotting-Papier, die Membran, das Gel und schließlich das zweite getränkte Blotting-Papier blasenfrei aufgelegt. Nach Aufsetzen der Kathode erfolgte der Transfer bei 50 mA Strombegrenzung und 20 V Spannungsbegrenzung für 4 h. Der Transfererfolg wurde durch die Abbildung des verwendeten vorgefärbten Markers auf der Membran überprüft.

Im Anschluss wurde die Membran über Nacht in Blockierungs-Lösung inkubiert und danach für 1 Stunde in der Antikörperlösung (1:250 oder 1:500-Verdünnung anti-Apo B-Antikörper bzw. 1:100-Verdünnung des anti-FITC-Antikörpers in frischer Blockierungs-Lösung) inkubiert. Es folgten fünf Waschschrte von je 2 min Dauer mit TBST. Alle Waschschrte und Inkubationen erfolgten bei RT und unter leichtem Schwenken. Nach Abschluss des Waschvorgangs wurde die Membran für 30 min mit dem Sekundär-Antikörper (POD- $\alpha$ -Ig-

Maus, Verdünnung 1:500 in frischer Blockierungslösung) inkubiert. Abermals wurde wie oben beschrieben gewaschen.

Für die Detektion wurde die Membran für 5 min in Detektionslösung inkubiert und anschließend blasenfrei in Folie eingeschlagen. Der anschließend aufgelegte Röntgenfilm (Kodak BioMax XAR Film) wurde für 5-60 Sekunden exponiert und dann entwickelt.

Um die bereits verwendete und mit Antikörpern inkubierte Membran erneut verwenden zu können wurde diese „gestrippt“. Dazu wurden die verwendeten Antikörper von der Membranoberfläche abgelöst, wodurch eine erneute Inkubation der bereits verwendeten Membran mit anderen Antikörpern möglich wurde. Hierzu wurde die Membran zunächst in einer Petrischale mit Stripping-Solution abgewaschen und unter Schwenken (mit Parafilm luftdicht verschlossen) für 30 min bei 70 °C im Wasserbad mit Stripping-Solution inkubiert. Es folgte ein zweiter Waschschrift mit Stripping-Solution. Zuletzt wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBST gewaschen und 1 h mit Blockierungs-Lösung inkubiert. Die Detektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

#### SDS-Transferpuffer:

|                  |                           |
|------------------|---------------------------|
| 0,58 % Tris-Base | 5,82 g Tris-Base          |
| 0,39 % Glycin    | 2,93 g Glycin             |
| 3,75 % SDS       | 3,75 ml, 10 % SDS         |
|                  | H <sub>2</sub> O (ad 1 l) |

#### TBS-Tween:

Verdünnen von 100 ml 10 × TBST (Lumi-Light<sup>Plus</sup> Western Blotting Kit) mit 900 ml doppelt destilliertem Wasser. Endkonzentration: 1 × TBST.

#### 1 % Blockierungslösung:

Lösen von 1 g Blocking Pulver (Lumi-Light<sup>Plus</sup> Western Blotting Kit) in 100 ml TBST unter 30 minütigem Rühren.

#### Detektionslösung:

Mischen von 1 ml LumiLight Stable Peroxid Solution mit 1 ml LumiLight Enhancer Solution (Lumi-Light<sup>Plus</sup> Western Blotting Kit).

Stripping-Solution:

|                           |                            |
|---------------------------|----------------------------|
| 2 % SDS                   | 10 ml, 10 % SDS            |
| 6,2 mM TrisHCl mit pH 6,8 | 3,1 ml 1 M TrisHCl, pH 6,8 |
| 0,7 % Mercaptoethanol     | 350 µl Mercaptoethanol     |
|                           | 36,55 ml H <sub>2</sub> O  |

### 2.5.5 Lipoproteinelektrophorese

Zur Quantifizierung der unterschiedlichen Lipoproteinfraktionen wurde ein halbautomatisches Elektrophoresegerät der Firma Sebia verwendet. Das Lipoproteinprofil wurde durch Elektrophorese auf Agarosegelen unter Verwendung eines Puffers mit pH 7,5 erstellt. Die nach Größe und Ladung getrennten Lipoproteine wurden im Anschluss an die Elektrophorese mit Sudanschwarz gefärbt und die überschüssige Färbelösung durch eine alkoholhaltige Lösung entfernt. Die Auswertung erfolgte visuell und densitometrisch. Es wurden Reagenzien, Materialien und Auswertungssoftware der Firma Sebia verwendet.

Zur Vorbereitung wurde das Gel aus der Verpackung entnommen und die überschüssige Flüssigkeit durch kurzes Auflegen eines dünnen Filterpapiers entfernt. Danach wurde es blasenfrei auf die Grundplatte des Gerätes gelegt. Dabei diente das zuvor auf das untere Drittel der Grundplatte pipettierte Wasser der Anhaftung des Gels.

Es wurden je 10 µl der zu untersuchenden Proben in den Applikator des Gerätes pipettiert. Dieser wurde anschließend zur Diffusion der Proben für 5 min in eine feuchte Kammer gestellt. Der Applikator wurde in die Apparatur eingehängt und die Trennung der Proteine nach dem Anbringen der Pufferschwämme an den Elektroden gestartet. Dazu wurde das Programm 7Lipo+Lp(a) und Lipo verwendet. Nach der Übertragung der Proben durch den Applikator auf das Gel und der elektrophoretischen Trennung wurde das Gel aus der Kammer genommen, in den Gelhalter eingespannt und auf der Färbeseite eingehängt. Der Färbvorgang wurde gemäß dem Programm 7Lipo+Lp(a) und Lipo durchgeführt. Nach Beendigung der Färbung wurde das Gel entnommen und die Rückseite mit 70 %-igem Ethanol gereinigt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe der zugehörigen Sebia-Software bei 570 nm.

|                        |                                     |
|------------------------|-------------------------------------|
| Färbelösung: 54 % EtOH | 120 ml EtOH (unvergällt)            |
| 0,65 % Sudanschwarz    | 1,45 ml konz. Sudanschwarz          |
|                        | 98,55 ml H <sub>2</sub> O           |
|                        | den Ansatz mindestens 30 min rühren |

Entfärbelösung: 55 % EtOH

110 ml EtOH (unvergällt)

H<sub>2</sub>O ad 200ml

Ansatz gut mischen

Waschlösung: 75 % EtOH

150 ml EtOH (unvergällt)

H<sub>2</sub>O ad 200ml

Ansatz gut mischen

## 2.6 Endozytose-Versuche mit PBMC und klonierten Zelllinien

### 2.6.1 Isolierung, Aktivierung und Kultivierung von PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) aus Vollblut

PBMC wurden aus den Buffy Coats gewonnen. Bei der Durchführung wurde darauf geachtet, dass Buffy Coat und Plasma vom gleichen Spender stammten. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 400 rpm, 20 °C, Bremse und Beschleunigung 1 zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit RPMI 1640 auf 25 ml aufgefüllt und gemischt. Diese 25 ml wurden dann vorsichtig über 15 ml LSM (*lymphocyte separation medium*) geschichtet. LSM ermöglicht die Trennung der PBMC von den übrigen Blutbestandteilen über einen Dichtegradienten. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 400 rpm, 10 °C, Bremse und Beschleunigung 1 wurden die PBMC, die sich als eine weiße Fraktion in der Mitte des Röhrchens konzentrierten, mit einer Pasteurpipette entnommen und in ein Röhrchen mit 10 ml RPMI 1640 überführt. Der Ansatz wurde ausgiebig gemischt. Die Zellsuspension wurde erneut für 10 min bei 400 rpm, 10 °C, Bremse 1 und Beschleunigung 9 zentrifugiert. Dann wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml RPMI 1640 resuspendiert. Dem Ansatz wurden 30 µl entnommen, mit denen die Zellkonzentration im Zell-Zählgerät bestimmt wurde. Die Menge an Zellkulturmedium in ml, die zur Herstellung einer Zellsuspension mit einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml benötigt wurde, wurde an Hand der Formel  $\frac{(A \times 5)}{2} \div 10$  (A = im Zellzählgerät ermittelte Zellkonzentration) berechnet. Zum Rest des Ansatzes wurden, bevor er abermals zentrifugiert wurde, weitere 5 ml RPMI 1640 gegeben. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die berechnete Menge an Zellkulturmedium ergänzt. Eine 96-Flachwellplatte wurde mit je 100 µl Zellkulturmedium/Well befüllt. Darauf wurden je 100 µl der hergestellten Zellsuspension gegeben. Dadurch wurde eine Endkonzentration

von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml erreicht. Die Zellen wurden für mehrere Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator inkubiert.

Zellkulturmedium für PBMC aus Vollblut:

|                                   |                                    |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| 90 % RPMI 1640                    | 90 ml RPMI 1640                    |
| 25 µg/ml Gentamycin               | 0,05 ml Gentamycin, 50 mg/ml       |
| 2 mM L-Glutamin                   | 1 ml L-Glutamin, 200 mM            |
| 10 % HAB Serum (hitzeinaktiviert) | 10 ml HAB Serum (hitzeinaktiviert) |

## 2.6.2 Kultivierung der Makrophagenzelllinie (MONO-MAC-6) sowie der Lymphozytenzelllinien (MOLT-14 und MOLT-16)

Die Kultur der verschiedenen Zelllinien erfolgte unter den in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Bedingungen. Alle Zellkulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

|                     | <b>MONO-MAC-6</b><br>Makrophagen/<br>Monozyten   | <b>Molt-14</b><br>γ/δ-positive T-<br>Lymphozyten   | <b>Molt-16</b><br>α/β-positive T-<br>Lymphozyten   |
|---------------------|--|--|--|
| Subkultur           | Zellen in einer Dichte von $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml aussäen<br><br>Auf $0,3-1,0 \times 10^6$ Zellen/ml halten<br><br>1:3 bis 1:5 alle 2-3 Tage splitten<br><br>Suspensionskultur in 50 ml Kulturflasche | Zellen in einer Dichte von $0,5-1 \times 10^6$ Zellen/ml aussäen<br><br>Auf $0,5-1,5 \times 10^6$ Zellen/ml halten<br><br>1:4 bis 1:5 zweimal pro Woche splitten<br><br>Suspensionskultur in 50 ml Kulturflasche | Zellen in einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml aussäen<br><br>Auf $0,5-1,5 \times 10^6$ Zellen/ml halten<br><br>1:2 bis 1:3 zweimal pro Woche splitten<br><br>Suspensionskultur in 50 ml Kulturflasche |
| Verdopplungszeit    | ca. 60 Stunden   | ca. 40-50 Stunden  | ca. 30 Stunden   |
| Zelldichte          | Max. Zelldichte ca. $1 \times 10^6$ Zellen/ml  | Max. Zelldichte ca. $2 \times 10^6$ Zellen/ml  | Max. Zelldichte ca. $2-2,5 \times 10^6$ Zellen/ml  |
| Oberflächenmerkmale | CD3 -, CD13 +, CD14 +, CD15 +, CD19 -, CD33 +, CD34 -, CD68 +, HLA-DR (+)  | CD2 +, CD3 +, CD4 -, CD5 +, CD6 -, CD7 +, CD8 -, CD13 -, CD19 -, CD34 (+), TCR α/β -, TCR γ/δ +  | CD2 +, CD3 +, CD4 (Klon S3.5) +, CD4 (Klon Leu-3a) -, CD5 +, CD6 +, CD7 +, CD8 -, CD13 -, CD19 -, CD34 -, TCR α/β +, TCR γ/δ -.  |

#### Zellkulturmedium für Mono-Mac-6:

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| 80-90 % RPMI 1640              | 80-90 ml RPMI 1640                        |
| 10-20 % FBS (hitzeinaktiviert) | 10-20 ml FBS (hitzeinaktiviert)           |
| 2 mM L-Glutamine               | 1 ml L-Glutamine, 200 mM                  |
| nicht-essentielle Aminosäuren  | 1 ml nicht-essentielle Aminosäuren, 100 × |
| 1 mM Natriumpyruvat            | 1 ml Natriumpyruvat, 100 mM               |
| 9 µg/ml humanes Insulin        | 225 µl humanes Insulin, 4 mg/ml           |
| 25 µg/ml Gentamycin            | 50 µl Gentamycin, 50 mg/ml                |

#### Zellkulturmedium für MOLT-14 und MOLT-16:

|                                |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 80-90 % RPMI 1640              | 80-90 ml RPMI 1640              |
| 10-20 % FBS (hitzeinaktiviert) | 10-20 ml FBS (hitzeinaktiviert) |
| 25 µg/ml Gentamycin            | 50 µl Gentamycin, 50 mg/ml      |

### 2.6.3 Einfrieren der Zellen

Zur Konservierung wurden die Zellen in Flüssigstickstoff eingefroren. Dazu wurden sie zunächst 10 min bei 400 rpm, 21 °C, Bremse und Beschleunigung 9 zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml des oben beschriebenen Zellkulturmediums resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen mit 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und es wurden 30 µl der Zellsuspension zur Zellkonzentrationsbestimmung im Zell-Zählgerät abgenommen. Nach der Zugabe von weiteren 5 ml Zellkulturmedium wurden die Zellen abermals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Während des letzten Zentrifugationsschrittes wurden der Einfrierautomat und das Einfriermedium vorbereitet. Alle vier Zelllinien wurden im gleichen Einfriermedium konserviert.

Die Zellen wurden durch die Zugabe von Einfriermedium auf eine Konzentration von  $7 \times 10^6$ /ml eingestellt und vereinigt. Je 0,5-1 ml der Zellsuspension wurde in je ein Kryogefäß pipettiert. Danach wurden sie sofort in den Einfrierautomaten überführt. Innerhalb von 20-30 min wurden die Zellen dort auf eine Temperatur von -140 °C gekühlt und anschließend in Flüssigstickstoff konserviert.

#### Einfriermedium:

|                             |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| 70 % Zellkulturmedium       | 70 ml Zellkulturmedium       |
| 20 % FBS (hitzeinaktiviert) | 20 ml FBS (hitzeinaktiviert) |
| 10 % DMSO                   | 10 ml DMSO                   |

#### **2.6.4 Inkubation der Zellen mit Chylomikronen zum Nachweis der Endozytoseaktivität**

Für Endozytoseversuche mit PBMC wurde die Zellkonzentration auf  $2 \times 10^6$ /ml eingestellt. Bei der Verwendung von klonierten Zelllinien wurde die Zelldichte auf  $0,8 \times 10^7$ /ml eingestellt. Bei einem Teil der Endozytoseversuche mit PBMC wurde zur Aktivierung der Zellen dem Medium IL2 (100 U/ml), Con A (5  $\mu$ g/ml) oder PHA (2,5  $\mu$ g/ml) zugesetzt. Je 100  $\mu$ l der Zellsuspension wurden pro Well auf eine 96-Flachwellplatte gegeben. Anschließend wurden FITC-markierte Chylomikronen (ca. 15-30  $\mu$ l/Well) zu den Zellen in die Flachwellplatte pipettiert. Die Zellen wurden für 4 Stunden im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) mit den Chylomikronen inkubiert. Anschließend wurden die Platten 10 min auf Eis gestellt und die Zellen abpipettiert. Nicht gebundene Chylomikronen wurden durch dreimaliges Waschen (1000 rpm, 3 min, 7 °C, Beschleunigung 9, Bremse 1) der Zellsuspension mit RPMI 1640 aus dem Ansatz entfernt.

In Kontrollversuchen wurden fluoreszenzmarkierte Polystyrenpartikel (*Microspheres*) anstelle der Chylomikronen eingesetzt. Die *Microspheres* (5  $\mu$ l) wurden zuvor dreimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen und wie die Chylomikronen für 45 min bei 14000 rpm, Bremse 1 und Beschleunigung 9 zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 1 ml PBS resuspendiert. 15-30  $\mu$ l dieser Suspension wurden für den Versuch eingesetzt.

#### **2.6.5 Untersuchung der Endozytoseaktivität durch FACS (*fluorescence activated cell scanning*)-Analyse**

Bei der Durchflußzytometrie passieren die Zellen einer Zellsuspension eine optische Messzelle. In die Mitte des Flusskanals wird ein Laserstrahl fokussiert, der durch die passierenden Zellen je nach Größe und Granulation verschieden stark abgelenkt wird. Gleichzeitig regt der Laserstrahl die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen an. Durch die Markierung mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern ist es möglich, einzelne Zellpopulationen zu analysieren.

Für die Untersuchung der PBMC wurden ein mit ECD-markierter anti-CD3-Antikörper zur Markierung der T-Lymphozyten, ein mit PE-, FITC- oder PC5-markierter anti-CD14-Antikörper zur Markierung der Monozyten und Makrophagen sowie ein PE-markierter anti-CD33-Antikörper eingesetzt. Die Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen zu der Zellsuspension gegeben: zu je 100  $\mu$ l Zellsuspension wurden 3  $\mu$ l FITC-markierter Antikörper, 3  $\mu$ l PE-markierter Antikörper, 1,5  $\mu$ l ECD-markierter Antikörper bzw. 1,5  $\mu$ l PC5-markierter Antikörper gegeben. Danach wurde der Ansatz gemischt und für 15 min im Dunkeln bei

Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Isotypenkontrolle mit IgG1-Antikörpern durchgeführt.

Für die Untersuchung der Zelllinien wurden PE-markierte Antikörper gerichtet gegen CD33, CD19 bzw. CD3 eingesetzt. Es wurden je 3 µl der Antikörper zu 100 µl Zellsuspension gegeben. Außerdem wurden APC-markierte Antikörper gerichtet gegen CD3, CD19 und CD33 verwendet.

Zur Ermittlung der Kompensations-Einstellungen des FACS-Geräts wurden die Zellen, die nicht mit Chylomikronen inkubiert wurden, mit den entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert.

### **2.6.6 Konfokale Mikroskopie**

Bei der konfokalen Mikroskopie wird ein Präparat mit einem Laserstrahl abgetastet. Dabei werden Fluoreszenzmoleküle im Lichtweg angeregt. Die Abbildung der Fluoreszenzsignale auf einer Ebene mit Lochblende (*pinhole*) ermöglicht es, Signalanteile aus anderen Ebenen auszublenden und nur die Signale, die aus der Fokusebene stammen, zu erfassen. Der Durchmesser der Blende bestimmt gemeinsam mit der numerischen Apertur des Mikroskopobjektivs die erfasste Schichtdicke. Die Aufzeichnung mehrerer optischer Schnitte in unterschiedlichen Fokusebenen ermöglicht eine dreidimensionale Rekonstruktion des Präparats.

Für die Untersuchung mit dem konfokalen Mikroskop wurden Zellen, die zuvor für vier Stunden mit Chylomikronen oder Microspheres inkubiert worden waren, verwendet. Die Zellen wurden 10 min auf Eis gestellt und anschließend von der 96-Wellplatte in FACS-Röhrchen pipettiert und dreimal mit RPMI 1640 (für 3 min bei 1000 rpm, 7 °C, Beschleunigung 9, Bremse 1) gewaschen.

Für die Fluoreszenzmarkierung wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet. Bei dem ersten Verfahren wurden PE-markierte Antikörper gerichtet gegen CD3, CD19 und CD33 sowie APC-markierte Antikörper mit derselben Spezifität verwendet. Die PE-markierten Antikörper wurden in einer Konzentration von 3:100 zugegeben, während die APC-markierten Antikörper in einer Konzentration von 5:100 zugegeben wurden. Die Zellen wurden 15 min mit den Antikörpern inkubiert und anschließend zweimal mit RPMI 1640 gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen zur Fixierung in 4 % Formalin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde, um eine zu hohe Zelldichte zu vermeiden, in unterschiedlichen Verhältnissen (von 1:2 bis 1:10) mit der Formalinlösung verdünnt. 100-200 µl der Suspension wurden mit Hilfe einer Zytocentrifuge (Cyto-Tek, Sakura Finetek) bei

1500 rpm innerhalb von 5 min auf eine definierte mit Filterpapier umgebene Stelle eines Superfrost-Objektträgers zentrifugiert. Dabei nahm das Filterpapier die Flüssigkeit weitestgehend auf, so dass im Zentrum des Objektträgers nur die Zellen zurückblieben. Diese wurden für 10 min unter dem Ventilator getrocknet. Anschließend wurde ein Tropfen des Eindeckmediums Vectashield mit oder ohne den Kernfarbstoff Dapi zu den Zellen gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Die Präparate wurden zur Aushärtung über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Bei dem zweiten Verfahren wurden die Zellen zunächst für 15 min mit 4 % Formalin fixiert. 100-200 µl der Zellsuspensionen wurden mit Hilfe der Zyto-Zentrifuge auf Objektträger übertragen. Diese wurden anschließend für 10 min in eine Küvette mit PBS gestellt und dann luftgetrocknet. Der Bereich des Objektträgers mit den anhaftenden Zellen wurde mit einem Fettstift markiert. Es folgte die Blockierung mit einer Lösung aus 5 % BSA und 5 % NGS in PBS für eine Stunde in der feuchten Kammer. Die Blockierungslösung wurde abgesaugt und die Primär-Antikörper zugegeben. Verwendet wurde ein monoklonaler anti-TCR PAN  $\gamma/\delta$ -Antikörper (Verdünnung 1:200 in PBS), ein monoklonaler anti-TCR PAN  $\alpha/\beta$ -Antikörper (Verdünnung 1:50 in PBS) und ein monoklonaler anti-CD14-Antikörper (Verdünnung 1:100 in PBS). Die Zellen wurden in der feuchten Kammer über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur mit den Antikörpern inkubiert. Die Antikörperlösungen wurden nach der Inkubation von den Objektträgern abgesaugt und die Präparate dreimal in einer Küvette mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärintikörper (Cy 3-markierten anti-Maus-Antikörper, Verdünnung 1:1000 in PBS) für eine Stunde in der feuchten Kammer. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Präparate erneut dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde für 10 min mit dem Kernfarbstoff (Alexa 647 markiertes TO-PRO-3iodine, Verdünnung 1:1000 in PBS) inkubiert. Die Färbelösung wurde entfernt und die Objektträger wurden dreimal für 10 min in PBS gewaschen. Es folgte ein zweiter 10-minütiger Fixierungsschritt mit 4 % Formalin und erneut zwei Waschschrirte mit PBS für je 10 min. Die Präparate wurden mit Glycerin (pH 8,6) eingedeckt.

### **2.6.7 Elektronenmikroskopie**

Für die Herstellung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen wie unter 2.6.4 beschrieben für 1, 2 oder 4 Stunden mit FITC-markierten Chylomikronen oder Microspheres inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension von den 96-Wellplatten pipettiert, vereinigt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen dreimal gewaschen. Das entstandene Pellet wurde vorsichtig mit Fixierlösung

(2,5 % Glutardialdehyd, 1,5 % Paraformaldehyd, 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,4) überschichtet und im Kühlschrank über Nacht inkubiert.

Die Proben wurden in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Es folgte die Nachfixierung und Kontrastierung für 1 h in Osmiumtetroxidlösung (0,5 % OsO<sub>4</sub> in 0,1 M Phosphatpuffer). Danach wurden die Zellen dreimal für je 15 min in 0,05 M Maleatpuffer, pH 5,2 gewaschen. Die verschiedenen Waschschrte erfolgten durch Zentrifugation für 5 min bei 2000 g. Der Ansatz wurde durch einen 200 nm-Filter filtriert und der Filter mit den Zellen für 1 h mit 1 % Uranylacetat in Maleatpuffer lichtgeschützt inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen in Maleatpuffer erfolgte die Dehydratation über eine Alkoholreihe (Ethanol 30 %, Ethanol 50 %, Ethanol 70 %, Ethanol 90 %, 2 × Ethanol 100 % jeweils 10 min). Der Alkohol wurde durch Propylenoxid-Lösungen mit aufsteigender Konzentration (10 min Ethanol/Propylenoxid 1:1, 2 × 10 min unverdünntes Propylenoxid) aus den Proben entfernt. Es folgte die Infiltration mit Epon (15 min Propylenoxid/Epon 1:1, 30 min Epon) im Exsikkator. Zuletzt wurden die Proben für 48 h im Trockenschrank ausgehärtet.

Nach der Einbettung wurden Ultradünnschnitte (70-80 nm) angefertigt (Reichert Ultracut E), auf Nickel-Gitter aufgezogen und mit Bleicitrat nachkontrastiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Zeiss-EM 902-Transmissionselektronenmikroskop.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Isolation und Fluoreszenzmarkierung von Chylomikronen**

Für die Durchführung von Phagozytoseversuchen wurden Chylomikronen aus Spenderplasma isoliert. Die Präparation der Chylomikronen erfolgte durch mehrere Zentrifugationsschritte. Nach Zentrifugation des Plasmas entstand eine trübe Schicht auf der Oberfläche, die als Chylomikronen-Fraktion angesprochen und durch wiederholtes Waschen mit PBS aufgereinigt wurde. Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Um die Chylomikronen durch FACS-Analyse und konfokale Mikroskopie detektieren zu können, wurden sie mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC, der unter den relevanten Bedingungen vor allem an freie Aminogruppen bindet, inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit PBS. Die Beurteilung des Reinigungseffektes erfolgte durch SDS-PAGE, Western-Blot-Analyse und Lipoprotein-elektrophorese.

Aufgrund der hohen molekularen Masse der relevanten Apolipoproteine wurde für die SDS-PAGE ein homogenes 7 %-Polyacrylamidgel verwendet (Abb. 4 A). Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte zunächst durch Färbung mit Coomassie-Blau. Als Folge der einzelnen Präparationsschritte waren eine Abnahme der Gesamtprotein-Menge sowie eine relative Anreicherung zweier Proteine im hochmolekularen Bereich festzustellen. In der Endpräparation war die untere der beiden entsprechenden Banden intensiver als die obere. Es wurde vermutet, dass es sich bei den beiden hochmolekularen Proteinen um das Apolipoprotein B-100 (513 kDa) der VLDL-, IDL- und LDL-Partikel sowie das Apolipoprotein B-48 (240 kDa) der Chylomikronen handelte.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde eine Western-Blot-Analyse mit einem gegen den gemeinsamen N-terminalen Teil von Apo B-100 und Apo B-48 gerichteten Antikörper durchgeführt (Abb. 4 B). Die Detektion mit diesem Antikörper ergab zwei Banden im hochmolekularen Bereich. Die relative Intensität der oberen Bande nahm als Folge der einzelnen Präparationsschritte ab, während die Intensität der unteren Bande zunahm. Aufgrund des Migrationsverhaltens und der Antikörperbindung konnten die beiden Banden als Apolipoprotein B-100 bzw. Apolipoprotein B-48 identifiziert werden. Die Abnahme der detektierten

Menge an Apo B-100 bei gleichzeitiger relativer Zunahme der Menge an Apo B-48 bestätigte eine Anreicherung der Chylomikronen durch das Präparationsverfahren.

Die FITC-Markierung wurde zunächst im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hierbei konnten die markierten Chylomikronen als gelb-grün fluoreszierende Partikel mit einer Größe von etwa 0,1-1µm dargestellt werden. Das Ergebnis wurde durch Western-Blot-Analyse mit einem anti-FITC-Antikörper verifiziert. Dazu wurde die für den Western-Blot mit anti-Apo B-Antikörper verwendete Membran durch Inkubation mit Stripping-Lösung und mehrere Waschschriffe von den gebundenen Antikörpern befreit und mit einem anti-FITC-Antikörper inkubiert (Abb. 4 C). Erwartungsgemäß wurden FITC-spezifische Signale bei allen Proben beobachtet, die nach der Inkubation mit FITC gewonnen worden waren. Während sich bei der ersten Probe nach Inkubation mit FITC ein komplexes Bandenmuster zeigte, traten bei der Endpräparation nur zwei prominente Banden auf. Der Vergleich des Bandenmusters ergab, dass es sich bei den verbleibenden Hauptbanden um Apolipoprotein B-100 und B-48 handelte. Dabei war wieder eine relative Anreicherung des Chylomikronen-spezifischen Apo B-48 zu beobachten.

Eine Abschätzung des Gesamtproteingehalts der einzelnen Proben, die nach den einzelnen Reinigungsschritten gewonnen wurden, erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. Dazu wurde ein diskontinuierliches Gel bestehend aus einem 5 %-Sammelgel und einem 12 %-Trenngel verwendet (Abb. 4 D). Es konnte eine deutliche Reduktion aller Plasmaproteine gezeigt werden. Besonders offensichtlich war dies bei Betrachtung der Albuminbande. Eine Darstellung von Apo B-100 und Apo B-48 ist mit diesem Gelsystem nicht möglich.

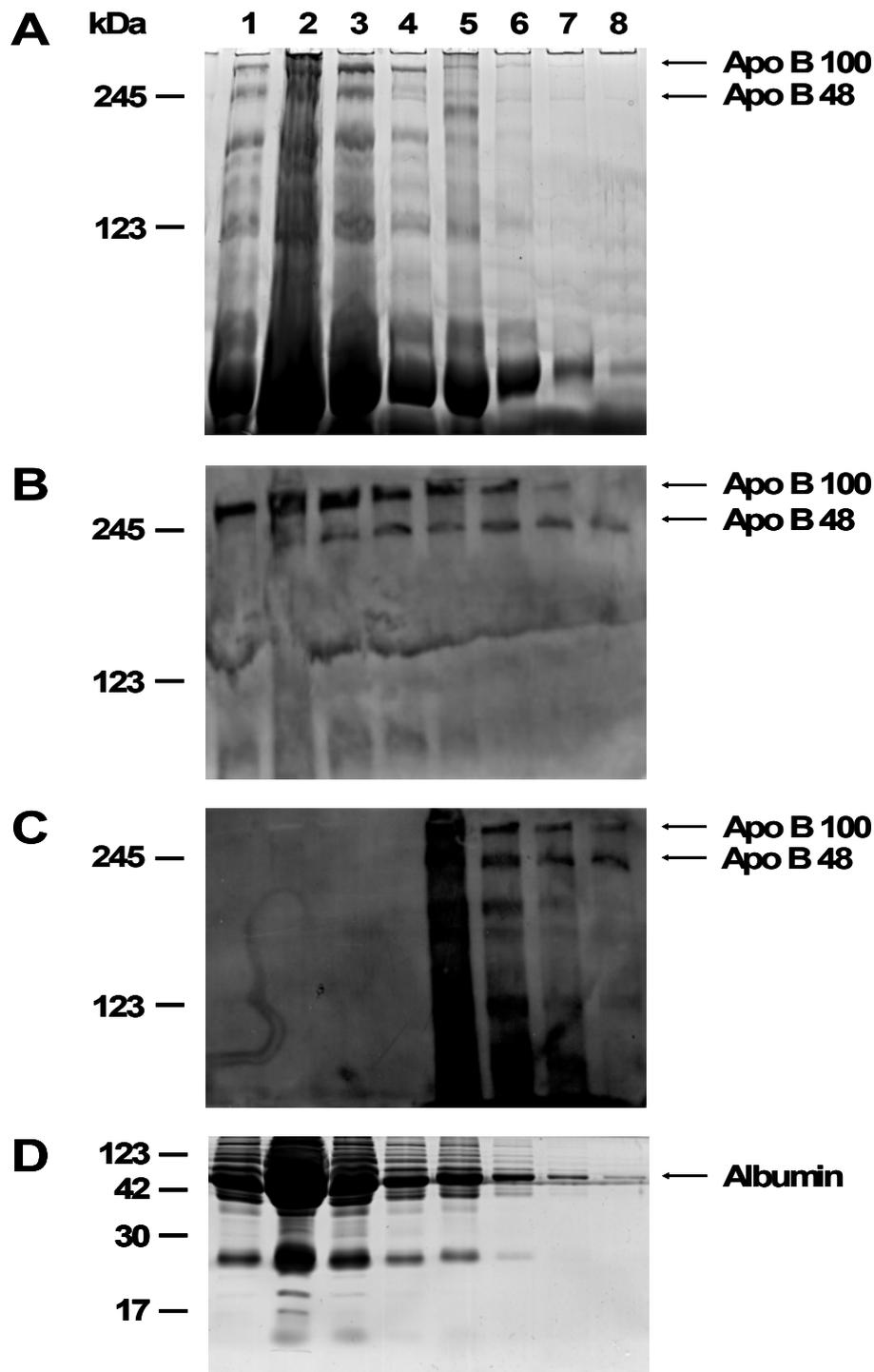


Abb. 4. Isolierung und Fluoreszenzmarkierung von Chylomikronen aus humanem Plasma. Nach Auftrennung der einzelnen Fraktionen in einem 7 %-Polyacrylamidgel erfolgte die Detektion der Proteine durch Coomassie-Färbung (A), Western-Blot mit einem anti-Apo B-Antikörper (B), und Western-Blot mit einem anti-FITC-Antikörper (C). Die Analyse des Gesamt-Proteingehalts erfolgte durch Auftrennung in einem 12 %-Polyacrylamidgel und Coomassie-Färbung (D). Spur 1: Plasma (Ausgangsmaterial), Verdünnung 1:10; Spur 2: CM-Fraktion nach dem ersten Waschschrift; Spur 3: CM-Fraktion nach dem zweiten Waschschrift; Spur 4: CM-Fraktion nach dem dritten Waschschrift; Spur 5: CM-Fraktion nach FITC-Konjugation; Spur 6: FITC-gefärbte CM-Fraktion nach dem ersten Waschschrift; Spur 7: FITC-gefärbte CM-Fraktion nach dem zweiten Waschschrift; Spur 8: FITC-gefärbte CM-Fraktion nach dem dritten Waschschrift.

Die weitere Charakterisierung und Quantifizierung der verschiedenen während der Präparation auftretenden Lipoproteinfraktionen erfolgte durch eine unter nativen Bedingungen durchgeführte Lipoproteinelektrophorese in einer Agarose-Matrix. Im Gegensatz zu den übrigen Lipoproteinen zeigen die Chylomikronen bei dieser Technik aufgrund ihrer Größe und ihres hohen Triacylglycerid-Anteils nur minimale elektrophoretische Mobilität. Die beobachtete Zunahme des prozentualen Anteils der Chylomikronen am Gesamt-Lipoproteingehalt und die Reduktion der übrigen Lipoproteinfraktionen bestätigte die Effektivität des Präparationsverfahrens (Abb. 5).

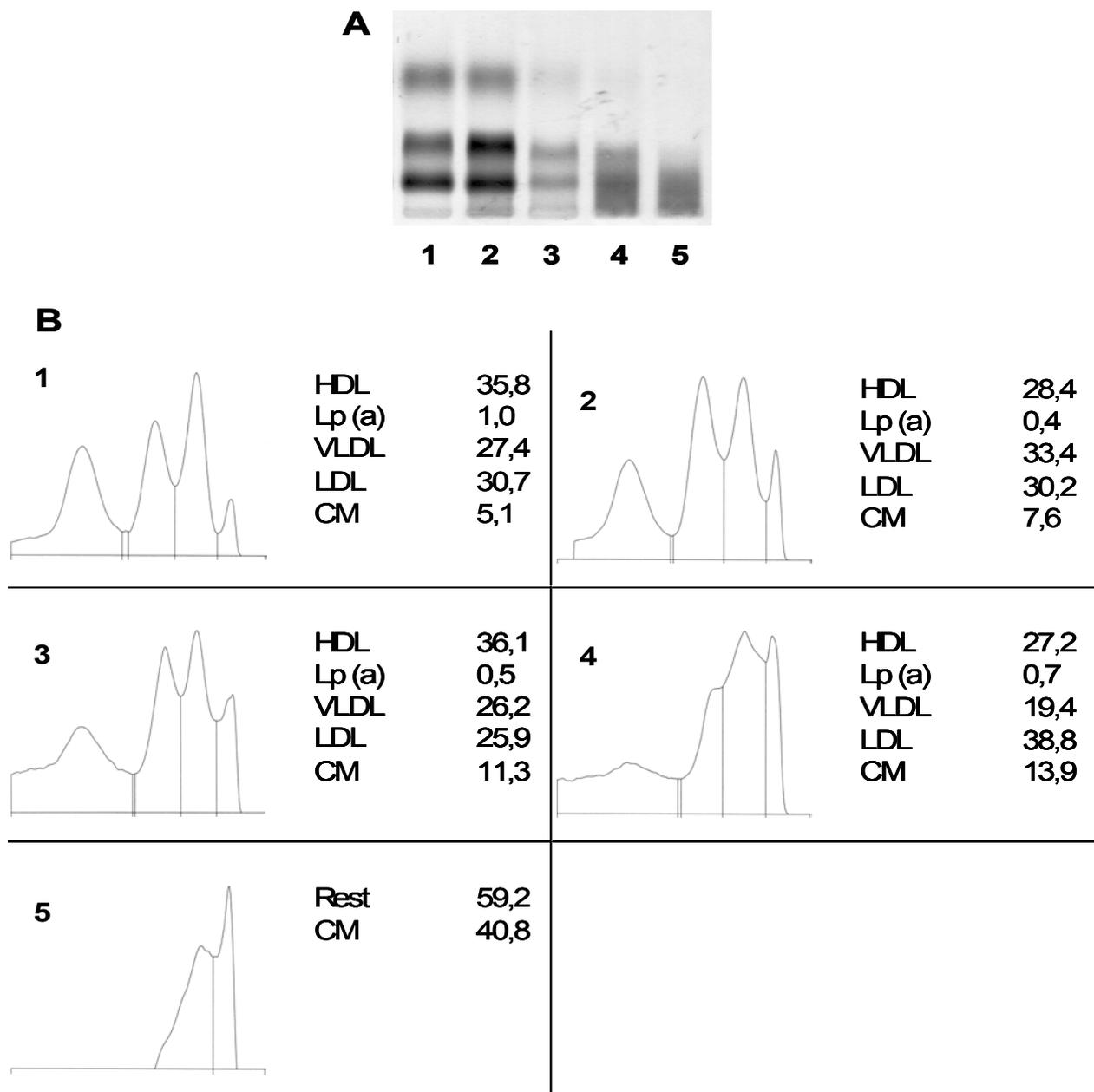


Abb. 5. Lipoproteinelektrophorese verschiedener Präparationsstufen bei der Isolation von Chylomikronen aus humanem Plasma. Teilabbildung A: Hydragel nach Sudanschwarz-Färbung; Spur 1: Plasma (Ausgangsmaterial); Spur 2: CM-Fraktion nach der ersten Zentrifugation; Spur 3: CM-Fraktion nach dem ersten Waschschrift; Spur 4: CM-Fraktion nach dem zweiten Waschschrift; Spur 5: CM-Fraktion nach dem dritten Waschschrift. Teilabbildung B: Elektropherogramme der Spuren 1-5 mit tabellarischer Darstellung der abgeleiteten prozentualen Anteile der einzelnen Lipoproteinfraktionen.

Der Einfluss unterschiedlicher Antikoagulanzen auf die Isolation der Chylomikronen wurde durch den Vergleich der Chylomikronen-Präparationen aus Citrat-, Heparin- und EDTA-Blut überprüft. Dazu wurden jeweils eine Plasmaprobe sowie eine Chylomikronen-Endpräparation durch Lipoproteinelektrophorese analysiert (Abb. 6). Der Anteil an Chylomikronen betrug unabhängig von den verwendeten Antikoagulantien in allen Präparationen ca. 70 %. Die übrigen Lipoproteinfraktionen wurden massiv reduziert. Da sowohl die ermittelten Lipoproteinanteile im Plasma als auch die Chylomikronen-Anteile der Endfraktionen der unterschiedlichen Präparationen nicht signifikant unterschiedlich waren, konnte kein Einfluss der verwendeten Antikoagulanzen auf die Chylomikronen-Isolation festgestellt werden.

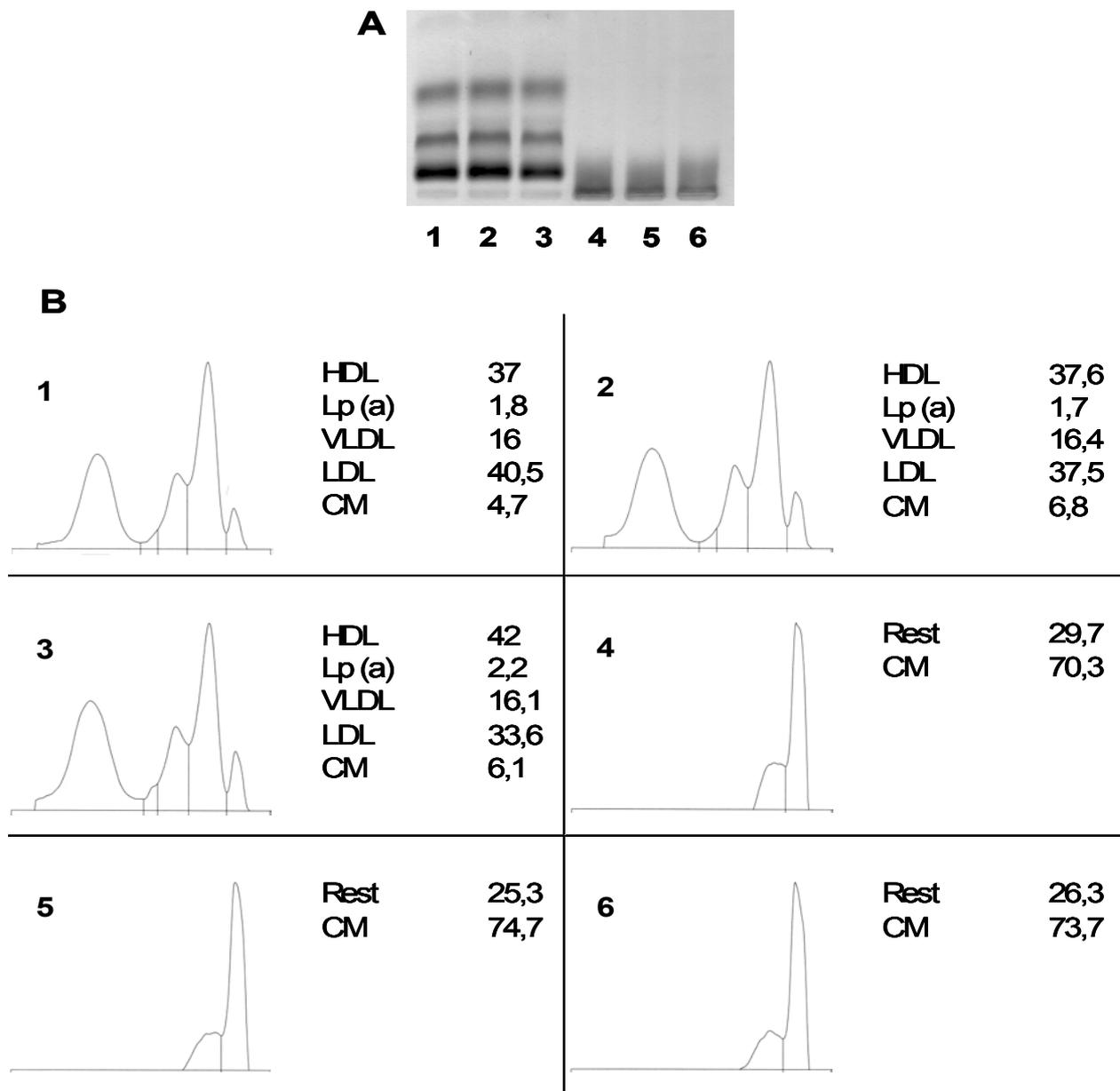


Abb. 6. Untersuchung des Effekts unterschiedlicher Antikoagulanzen auf die Chylomikronen-Isolation. Teilabbildung A: Hydrigel nach Sudanschwarz-Färbung; Spur 1: Plasma aus Citrat-Blut; Spur 2: Plasma aus Heparin-Blut; Spur 3: Plasma aus EDTA-Blut; Spur 4: CM-Fraktion aus Citrat-Blut; Spur 5: CM-Fraktion aus Heparin-Blut; Spur 6: CM-Fraktion aus EDTA-Blut. Teilabbildung B: Elektropherogramme der Spuren 1-6 mit tabellarischer Darstellung der abgeleiteten prozentualen Anteile der einzelnen Lipoproteinfraktionen.

### 3.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der Aufnahme von Chylomikronen durch Leukozyten

Um die Aufnahme von Chylomikronen durch Leukozyten zu untersuchen, wurden zunächst aus Vollblut isolierte PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) verwendet. Diese wurden auf einer Mikrotiterplatte ausgesät und für 4 Stunden mit FITC-markierten Chylomikronen inkubiert. Zur Unterscheidung einer spezifischen von einer unspezifischen Endozytoseaktivität, wurde parallel ein Phagozytose-Test mit fluoreszenzmarkierten Microspheres durchgeführt. Die Zellen wurden für die FACS-Analyse mit PE-markierten Antikörpern gegen charakteristische Oberflächenantigene der verschiedenen Zelltypen inkubiert. Verwendet wurden Antikörper gegen CD3, CD14, CD19 und CD33. Wegen der starken Überlappung der Emissionsspektren von PE und FITC (Abb. 7) wurden in den späteren Versuchen APC-markierte Antikörper verwendet.

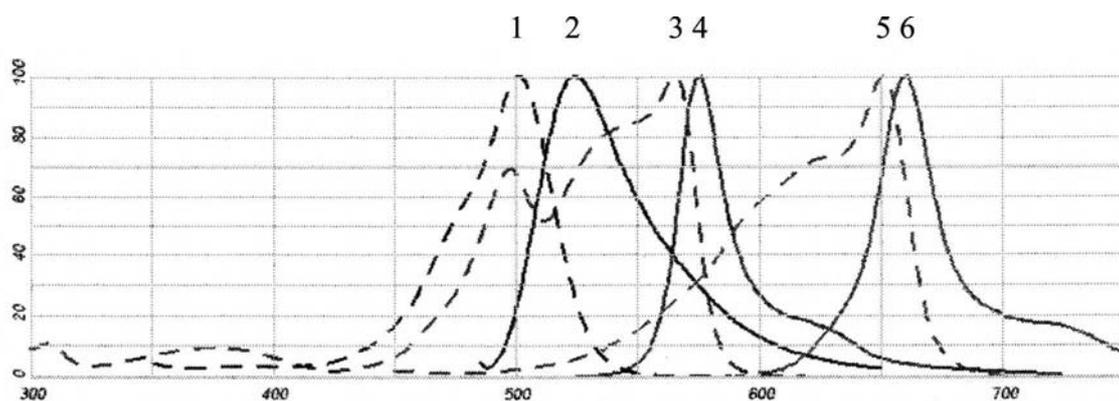


Abb. 7. Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ([www.probes.invitrogen.com/servlets/spectraviewer](http://www.probes.invitrogen.com/servlets/spectraviewer)): Fluorescein-Dextran: Anregung 1, Emission 2; R-PE (R-phycoerythrin): Anregung 3, Emission 4; APC (Allophycocyanin): Anregung 5, Emission 6.

Durch die FACS-Analyse konnte eine verstärkte FITC-Fluoreszenz der Makrophagen sowie der Lymphozyten nach Inkubation mit FITC-markierten Chylomikronen oder fluoreszenzmarkierten Microspheres gezeigt werden. Da die Ergebnisse nicht eindeutig und die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen schlecht zu differenzieren waren, wurden für die weiteren Versuche humane Tumor-Zelllinien verwendet. Dabei handelte es sich um die Makrophagenzelllinie Mono-Mac-6, die  $\gamma/\delta$ -positive T-Zelllinie MOLT-14 sowie die  $\alpha/\beta$ -positive T-Zelllinie MOLT-16.

Die Charakterisierung der Zellen im Vorwärts- (FSC = *forward scatter*) und Seitwärtsstreulicht (SSC = *sideways scatter*) zeigte, dass es sich um homogene Populationen handelte, die klar von toten Zellen und Zelldetritus unterschieden werden konnten (Abb. 8).

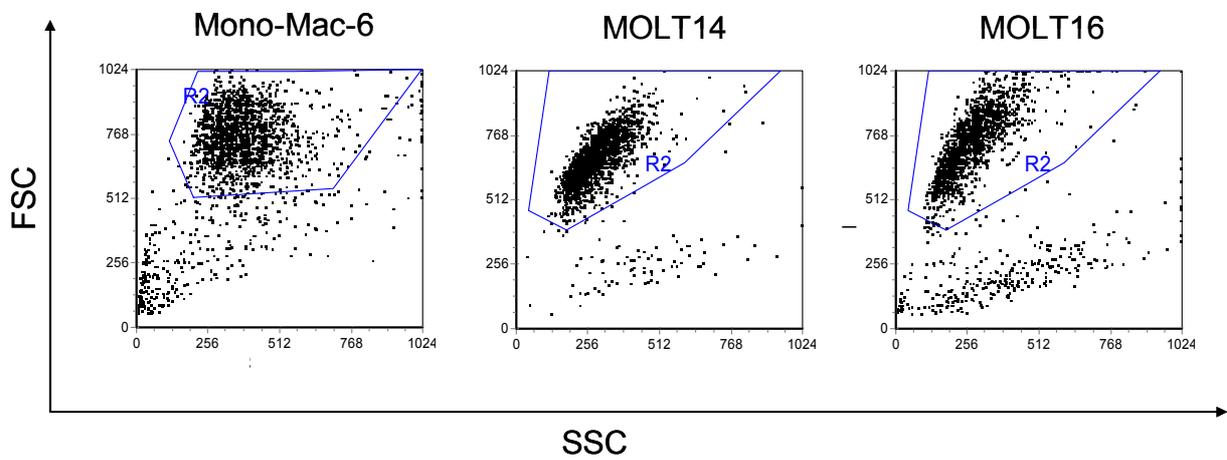


Abb. 8. Darstellung der verwendeten Zelllinien im *forwards-* (FSC) und *sideways scatter* (SSC).

Bei den Endozytose-Versuchen mit der Mono-Mac-6-Zelllinie waren annähernd alle Zellen CD33-positiv (Abb. 9). Nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Microspheres konnte eine Aufnahme der Partikel bei 78 % der CD33-positiven Zellen nachgewiesen werden. Die Intensität des Fluoreszenz-Signals war bei einem kleinen Teil der Zellen sehr hoch. Dies könnte durch die vermehrte Aufnahme der Partikel durch eine endozytotisch besonders aktive Population bedingt sein. Ein Anteil von 22 % wies hingegen keine Fluoreszenz-Markierung nach Inkubation mit Microspheres auf. Wurde die Inkubation statt mit Microspheres mit FITC-markierten Chylomikronen durchgeführt, so zeigte sich eine homogene Population FITC-markierter Zellen (99 % der CD33-positiven Zellen).

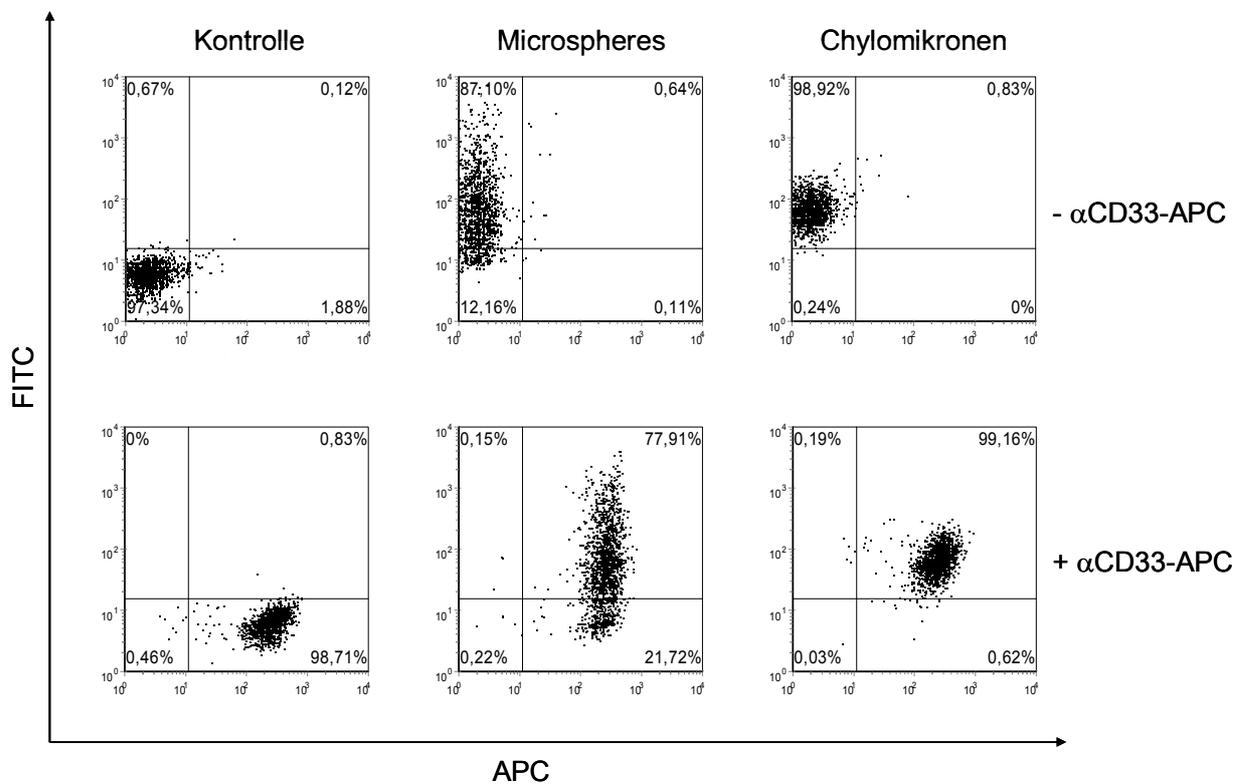


Abb. 9. Untersuchung der Endozytose von Chylomikronen bzw. Microspheres durch Zellen der Mono-Mac-6-Zelllinie mittels FACS-Analyse. Untersucht wurden vorselektierte Zellen im FITC- (FL1, Ordinate) und APC- (FL4, Abszisse) Kanal; obere Reihe: ungefärbte Zellen; untere Reihe: Zellen nach Färbung mit APC-markiertem anti-CD33-Antikörper; Spalte 1: Zellen ohne Zugabe von Partikeln; Spalte 2: Zellen nach Inkubation mit Microspheres; Spalte 3: Zellen nach Inkubation mit FITC-markierten Chylomikronen.

Fast alle MOLT-14-Zellen konnten durch den verwendeten anti-CD3-Antikörper markiert werden (Abb. 10). Nach Inkubation mit Microspheres konnten zwei klar getrennte Populationen unterschieden werden. Anscheinend war eine Endozytose-aktive Population (62 %) zur Aufnahme der Microspheres fähig, wohingegen eine Endozytose-inaktive Population (37 %) keine Aufnahme der angebotenen Partikel zeigte. Die Inkubation mit FITC-markierten Chylomikronen führte auch bei dieser Zelllinie zu einer FITC-Markierung annähernd aller Zellen (97 %).

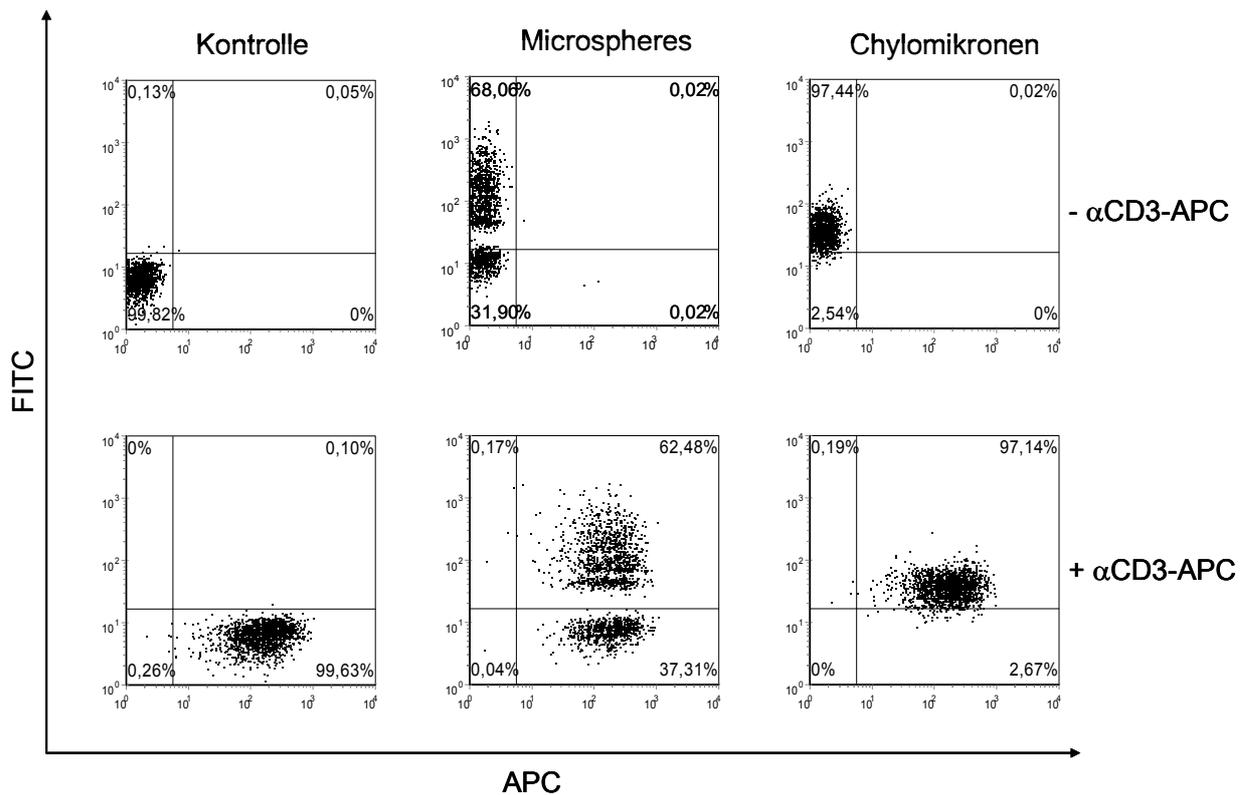


Abb. 10. Untersuchung der Endozytose von Chylomikronen bzw. Microspheres durch Zellen der MOLT-14-Zelllinie mittels FACS-Analyse. Obere Reihe: ungefärbte Zellen; untere Reihe: Zellen nach Färbung mit APC-markiertem anti-CD3-Antikörper: Spalte 1: Zellen ohne Partikel-Zugabe; Spalte 2: Zellen nach Inkubation mit Microspheres, Spalte 3: Zellen nach Inkubation mit FITC-markierten Chylomikronen.

Eine ebenfalls weitestgehend vollständige Markierung der Zellen mit dem anti-CD3-Antikörper wurde bei der Untersuchung der MOLT-16-Zellen beobachtet (Abb. 11). Dabei traten zwei Populationen mit unterschiedlich starker CD3-Expression auf. Ähnlich wie bei der zuvor untersuchten MOLT-14-Zelllinie waren auch hier nach Inkubation mit Microspheres zwei klar getrennte Populationen nachweisbar. Allerdings war die Endozytose-aktive Population kleiner (21 %). Die Endozytose-inaktive Population bestand aus 78 % der Zellpopulation. Nach Inkubation mit Chylomikronen zeigten auch annähernd 100 % der MOLT-16-Zellen eine Fluoreszenzmarkierung. Das Auftreten der beiden Populationen mit unterschiedlich starker CD3-Expression konnte auch nach den Inkubationen mit markierten Microspheres bzw. Chylomikronen nachgewiesen werden.

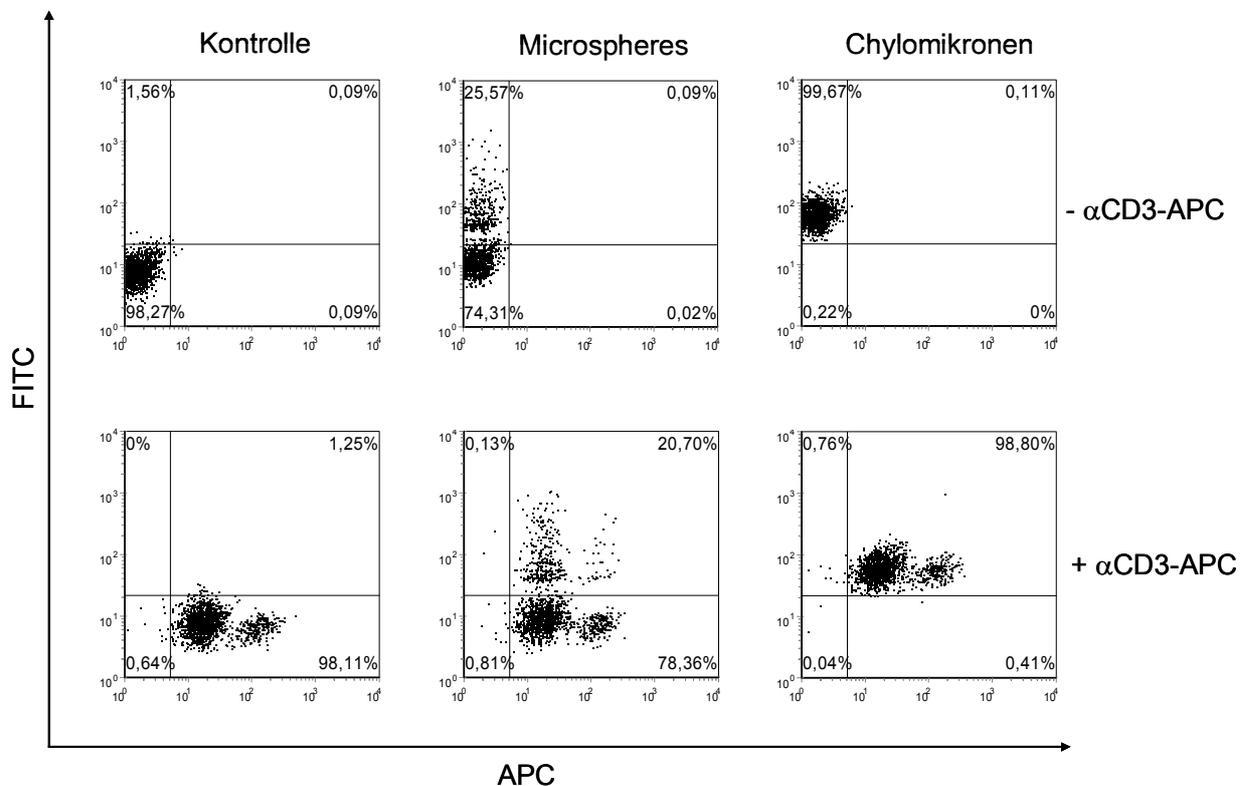


Abb. 11. Untersuchung der Endozytose von Chylomikronen bzw. Microspheres durch Zellen der MOLT-16-Zelllinie mittels FACS-Analyse. Obere Reihe: ungefärbte Zellen; untere Reihe: Zellen nach Färbung mit APC-markiertem anti-CD3-Antikörper; Spalte 1: Zellen ohne Partikel-Zugabe; Spalte 2: Zellen nach Inkubation mit Microspheres; Spalte 3: Zellen nach Inkubation mit FITC-markierten Chylomikronen.

### **3.3 Mikroskopische Untersuchung der Aufnahme von Chylomikronen durch Leukozyten**

Für die Untersuchung durch konfokale Mikroskopie wurden die Zellen wie für die FACS-Analyse für vier Stunden mit Microspheres oder FITC-markierten Chylomikronen inkubiert. Zur Darstellung der Zellmembranen wurden die Zellen mit Primär-Antikörpern gegen CD14, TCR PAN  $\gamma/\delta$  bzw. TCR PAN  $\alpha/\beta$  inkubiert. Es folgte die Zugabe eines sekundären Cy 3-markierten anti-Maus-Antikörpers. Außerdem wurde ein Alexa 647-markierter Kernfarbstoff (TO-PRO-3iodine) zugegeben.

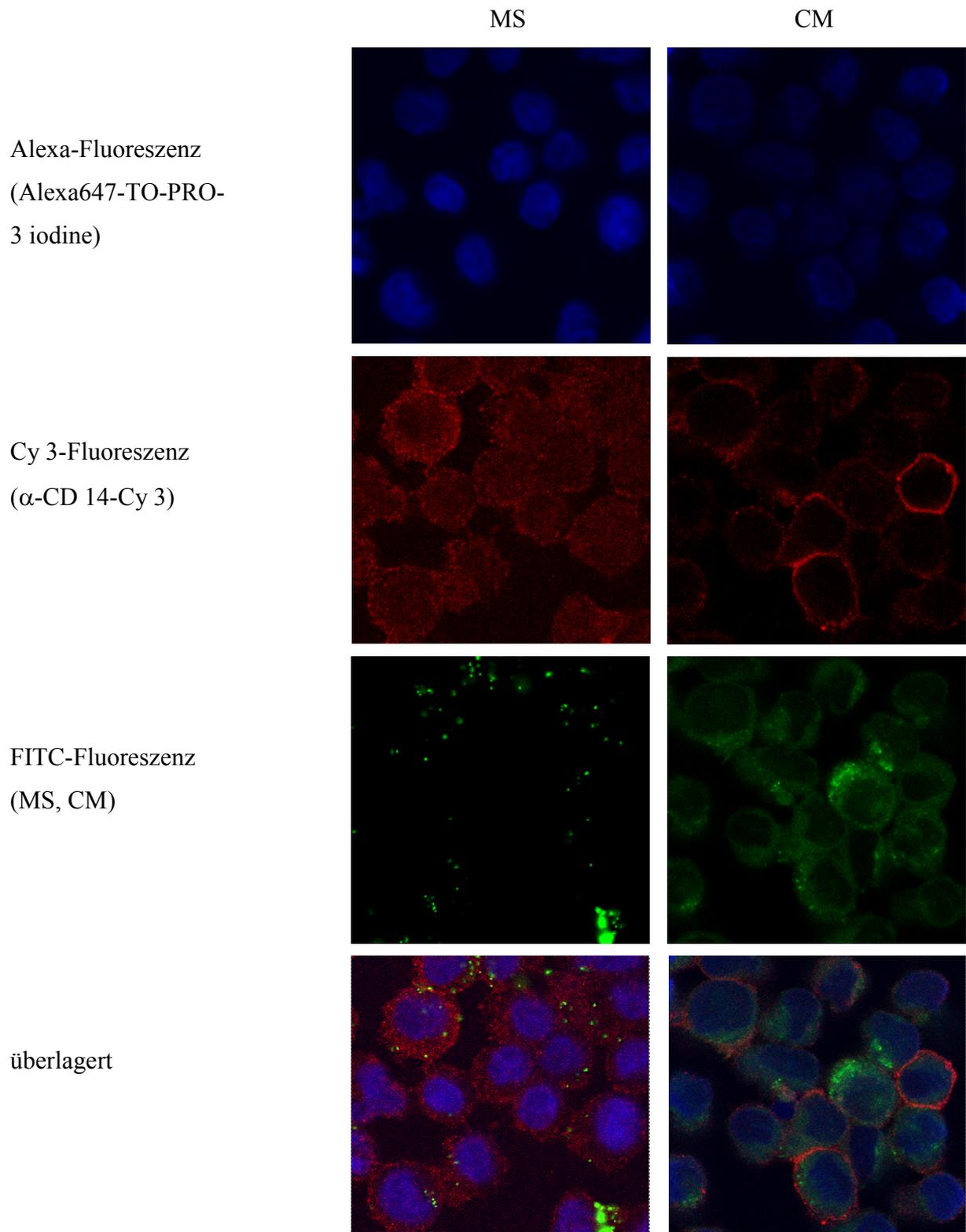


Abb. 12. Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Microspheres (MS) und FITC-markierten Chylomikronen (CM) in Mono-Mac-6-Zellen durch konfokale Mikroskopie. Die Darstellung der Zellmembran und der Kerne erfolgte durch Gegenfärbung mit anti-CD14-Cy3 bzw. Alexa 647-TO-PRO-3 iodine.

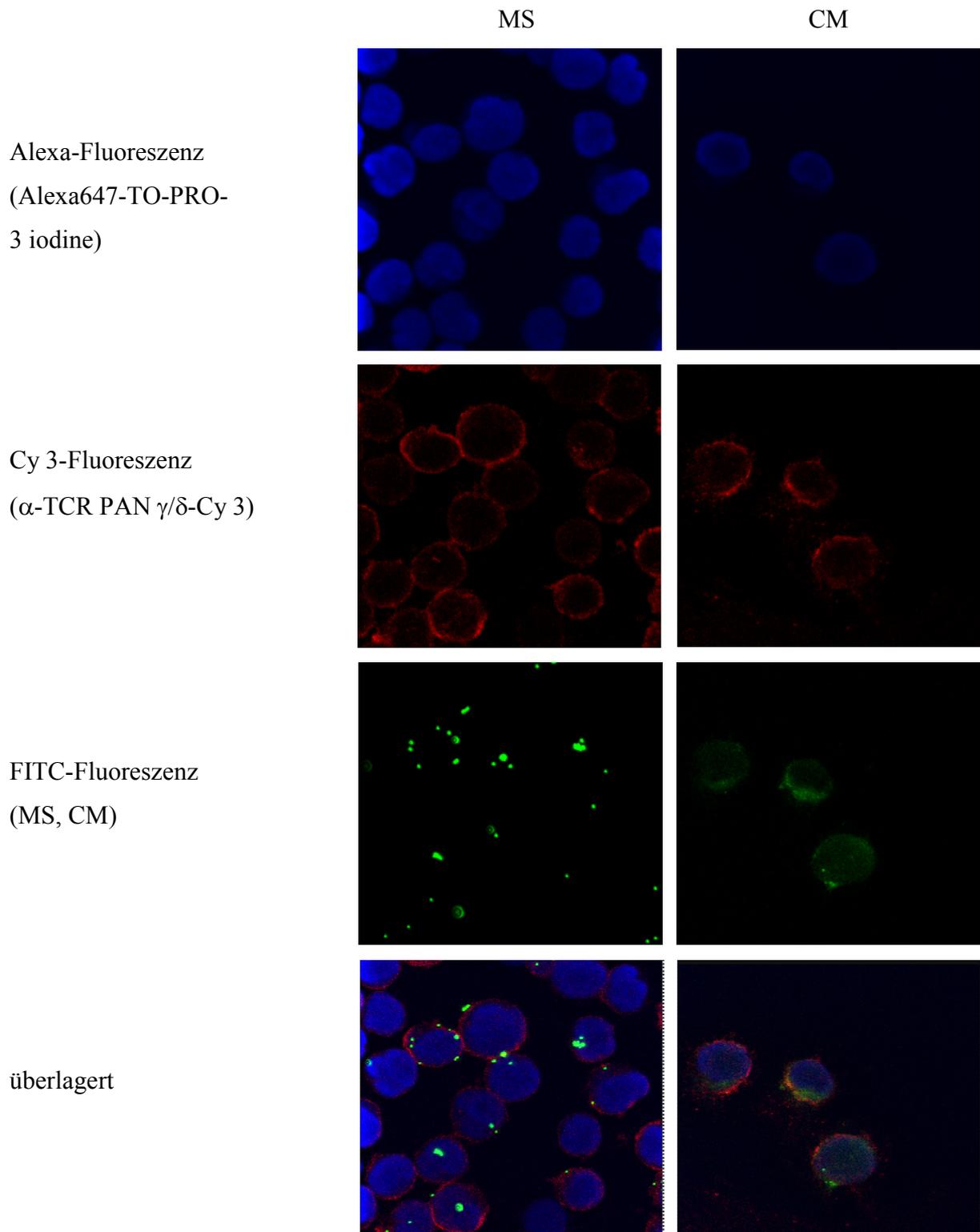


Abb. 13. Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Microspheres (MS) und FITC-markierten Chylomikronen (CM) in MOLT-14-Zellen durch konfokale Mikroskopie. Die Darstellung der Zellmembran und der Kerne erfolgte durch Gegenfärbung mit anti-TCR PAN  $\gamma/\delta$ -Cy3 bzw. Alexa 647-TO-PRO-3 iodine.

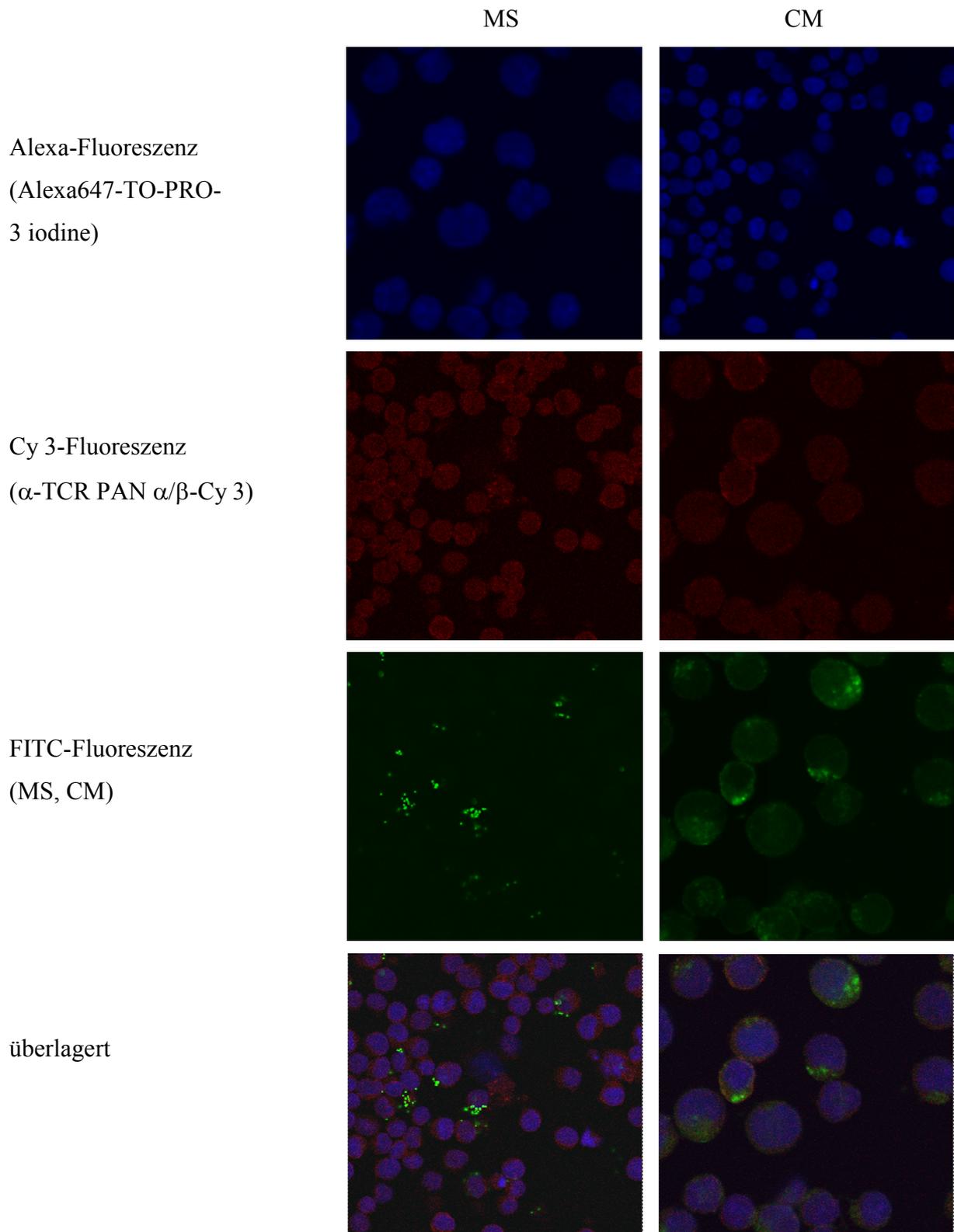


Abb. 14. Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Microspheres (MS) und FITC-markierten Chylomikronen (CM) in MOLT-16-Zellen durch konfokale Mikroskopie. Die Darstellung der Zellmembran und der Kerne erfolgte durch Gegenfärbung mit anti-TCR PAN  $\alpha/\beta$ -Cy3 bzw. Alexa 647-TO-PRO-3 iodine.

Die Untersuchung der Makrophagen-Zelllinie Mono-Mac-6 mit dem anti-CD14-Antikörper (Abb. 12) ergab erwartungsgemäß eine Markierung der Zellmembran. Während die Microspheres bei ca. 35 % der Zellen in Assoziation mit der Zellmembran sowie im Zytoplasma lokalisiert werden konnten, führte die Inkubation mit FITC-markierten Chylomikronen bei nahezu allen Zellen zu einer inhomogenen FITC-Fluoreszenz im Zytoplasma. Außerdem wurden nach der Inkubation mit Chylomikronen runde, stärker FITC-markierte Partikel (bei ca. 30% der Zellen) im Zytoplasma beobachtet. Bei diesen Partikeln handelte es sich wahrscheinlich um größere noch weitgehend intakte Chylomikronen.

Für die Untersuchung der  $\gamma/\delta$ -positiven MOLT-14-Zellen wurde der anti-TCR PAN  $\gamma/\delta$ -Antikörper verwendet (Abb. 13). Durch Betrachtung der Kernebene konnte die Internalisierung eines Teils der zugegebenen Microspheres in die Zellen (ca. 30 % der betrachteten Zellen) gezeigt werden. Die übrigen Partikel waren an den Oberflächen der Zellen lokalisiert. Die Inkubation mit Chylomikronen führte auch hier zu einer inhomogenen FITC-Fluoreszenz des Zytoplasmas nahezu aller Zellen.

Bei den  $\alpha/\beta$ -positiven Zellen (MOLT-16) erfolgte die Membranmarkierung mit einem anti-TCR PAN  $\alpha/\beta$ -Antikörper (Abb. 14). Nach Inkubation mit Microspheres erschienen diese in Assoziation mit der Außenseite der Zellmembran oder frei in der Umgebung der Zellen. Im Gegensatz dazu konnte nach Inkubation mit den FITC-markierten Chylomikronen auch hier eine inhomogene FITC-Markierung des Zytoplasmas mit granulären Strukturen gesehen werden.

Um die Zellstrukturen sowie die intrazelluläre Lokalisation der Chylomikronen bzw. Microspheres mit hoher Auflösung darstellen zu können, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Zellen der Mono-Mac-6 und MOLT-14-Zelllinie wurden dazu für 1, 2 oder 4 h mit Chylomikronen oder Microspheres inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert, mit Glutardialdehyd/Paraformaldehyd fixiert und mit Osmiumtetroxid nachfixiert. Nach Kontrastierung mit Uranylacetat erfolgte die Einbettung in Kunstharz und die Herstellung von Ultradünnschnitten.

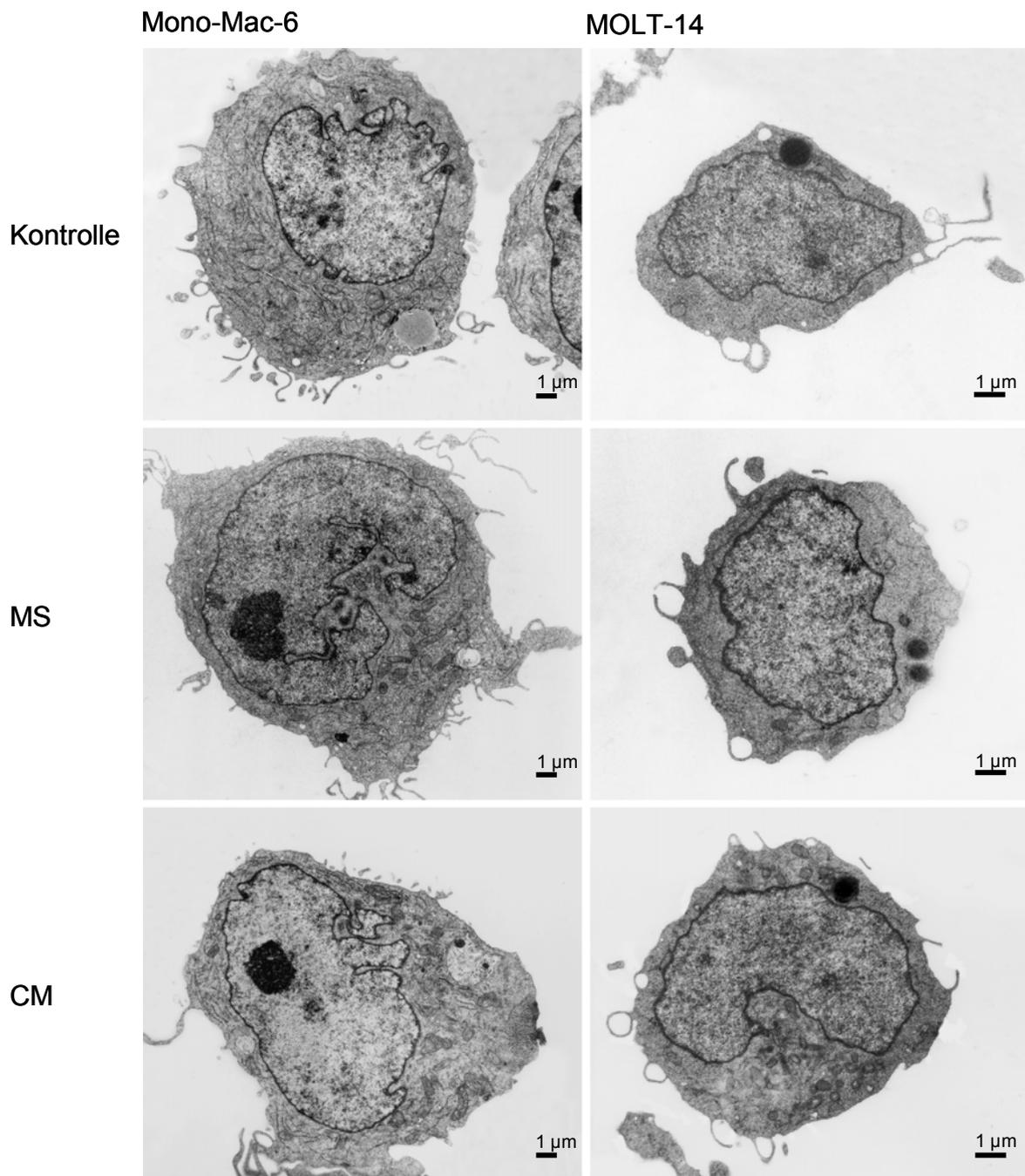


Abb. 15.: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen der Mono-Mac-6-Linie und der MOLT-14-Linie nach einstündiger Inkubation mit Microspheres (MS) und Chylomikronen (CM).

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen ergab keinen wesentlichen Unterschied zwischen den mit Microspheres bzw. Chylomikronen inkubierten Zellen und entsprechenden Kontrollzellen (Abb. 15). In allen Zellen waren in gleichem Maße Fetttröpfchen und vesikuläre Strukturen nachweisbar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Isolation von Chylomikronen

Für die Trennung der einzelnen Lipoproteinfraktionen stehen unterschiedliche Verfahren, die die spezifischen physikalischen Eigenschaften dieser Partikel nutzen, zur Verfügung. Das gängigste Trennverfahren ist die Ultrazentrifugation von aus EDTA-Blut gewonnenem Plasma (Bregeron et al. 1996; Zilversmit & Shea 1989). In manchen Studien wird zusätzlich ein NaCl-Dichtegradient eingesetzt (Karpe & Hamsten 1994; Palmer et al. 2005). Durch die Ultrazentrifugation wird ein hoher Reinheitsgrad der einzelnen Lipoproteinfraktionen erreicht. Alternativ ist der Einsatz einer Tischzentrifuge möglich. Die Aufreinigung erfolgt hier durch mehrere bei hohen Geschwindigkeiten und langer Laufzeit durchgeführte Zentrifugationsschritte. Die Chylomikronen werden nach der Zentrifugation von der Plasmaoberfläche abgenommen und mehrmals mit einer Salzlösung gewaschen (Glickman & Kirsch 1973; Gianturco et al. 1988; Ji et al. 1995). Durch Anwendung dieses Verfahrens kann ein mit der Ultrazentrifugation vergleichbares Ergebnis erzielt werden. Die Gelfiltration ist ebenfalls ein Verfahren zur Lipoprotein-Isolation aus Plasma. (Glickman & Kirsch 1973; Kalab & Martin 1968; Hussain et al. 1989; Kotite et al. 1995). Auch durch dieses Verfahren werden mit der Ultrazentrifugation vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Da im Rahmen dieser Arbeit die Isolierung der Chylomikronen mit geringem apparativem Aufwand erfolgen sollte, wurde für die Präparation eine Tischzentrifuge verwendet. Der Reinigungseffekt der angewandten Methode konnte durch die Untersuchung der einzelnen Aufreinigungsschritte durch SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung und durch Western-Blot-Analyse mit einem anti-Apo B-Antikörper gezeigt werden. In den Endpräparationen war zwar noch LDL-spezifisches Apo B-100 durch Western-Blot nachweisbar, jedoch konnte der relative Anteil durch das Präparationsverfahren stark verringert werden. Im Gegensatz dazu wurde das Chylomikronen-spezifische Apo B-48 durch die Präparation angereichert. Eine Delipidierung mit Ethanol-Diethylether, Methanol oder Diethylether, wie sie für die Western-Blot-Analyse von Lipoproteinen beschrieben wurde (Bregeron et al. 1996; Kotite et al. 1995; Karpe & Hamsten. 1994; Jackson & Williams 2004), erwies sich als nicht erforderlich.

Um den Präparationserfolg unter nativen Bedingungen zu untersuchen, wurde zusätzlich eine Lipoproteinelektrophorese durchgeführt, die ebenfalls die Anreicherung der Chylomikronen durch die Aufreinigungsschritte bestätigte.

In den meisten bisherigen Arbeiten wurde für die Isolation von Chylomikronen EDTA-Blut verwendet (Karpe & Hamsten 1994). Bei Verwendung von EDTA muss eine Strukturveränderung der Chylomikronen befürchtet werden. Jedoch zeigte die Untersuchung von Chylomikronen-Präparationen aus unterschiedlich antikoaguliertem Blut durch Lipoproteinelektrophorese zumindest keinen Einfluss der getesteten Gerinnungsinhibitoren (Citrat, EDTA, Heparin) auf die quantitative Ausbeute.

## 4.2 Fluoreszenzmarkierung isolierter Chylomikronen

Zur Markierung einzelner Lipoproteinfraktionen sind unterschiedliche Verfahren beschrieben. Neben der radioaktiven Markierung von Triacylglyceriden (Niu et al. 2004) wurden zur Fluoreszenzmarkierung von VLDL, LDL oder Chylomikronen Carbocyanine eingesetzt (Ji et al. 1995; Barak & Webb 1981). In Vorversuchen zu der durchgeführten Studie wurden unterschiedliche Methoden zur Fluoreszenzmarkierung isolierter Chylomikronen getestet. Zunächst wurde eine Markierung der Chylomikronen in Anlehnung an Barak und Webb, (1981) mit dem Carbocyanin 3,3'-Dioctadecylindocarbocyanin-Jodid (DiI[3]) getestet. Im Originalprotokoll werden dazu die LDL delipidiert und zur Rekonstitution mit Kartoffelstärke versetzt. Der Ansatz wird in Flüssigstickstoff eingefroren und bei  $-20\text{ °C}$  mit Heptan inkubiert. Nach zwei Zentrifugationsschritten wird das Pellet bei  $-20\text{ °C}$  für mehrere Stunden mit DiI[3] in Heptan inkubiert. Anschließend wird der Ansatz mit einem Stickstoffstrom getrocknet. Nach der Zugabe eines wässrigen Puffers wird der Ansatz für 41 Stunden bei kontinuierlichem Schütteln inkubiert und danach zentrifugiert. Der Überstand enthält die DiI[3]-gefärbten, rekonstituierten LDL. In der vorliegenden Arbeit wurde, um die Struktur der Chylomikronen zu erhalten, auf diese Zwischenschritte verzichtet. Die isolierten Chylomikronen wurden, wie bei Palmer et al. (2005) für DiIC<sub>18</sub>(3) beschrieben, lediglich über Nacht mit DiI[3] inkubiert. In der anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung konnte keine Einlagerung des Farbstoffes in die Chylomikronen festgestellt werden. Aus diesem Ergebnis wurde geschlossen, dass dieser lipophile Farbstoff ohne Delipidierung und Rekonstitution nicht zur Färbung von Chylomikronen geeignet ist.

Für die Etablierung eines Verfahrens, bei dem die native Struktur der Chylomikronen weitgehend erhalten bleibt, wurde eine Markierung mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)

angewandt. Dieser hydrophile Fluoreszenzfarbstoff bindet kovalent an freie Amin-, Thiol-, Imidazol-, Tyrosyl- und Carbonylgruppen und wird zum Beispiel zur Herstellung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern verwendet. Für die Markierung wurden die isolierten Chylomikronen über Nacht in einem wässrigen Puffer mit FITC inkubiert und mehrmals gewaschen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten die markierten Chylomikronen als gelb-grün fluoreszierende Partikel mit einer Größe von etwa 0,1-1µm dargestellt werden. Durch die Western-Blot-Analyse mit einem anti-FITC-Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass der verwendete Fluoreszenzfarbstoff an das Apo B-48 der Chylomikronen bindet. Allerdings ist anzunehmen, dass neben der Bindung an Apolipoproteine die Markierung zu einem wesentlichen Teil durch Bindung von FITC an die freien Aminogruppen des Phosphatidylethanolamins der äußeren Lipidschicht der Chylomikronen erfolgt.

Eine Markierung von Lipiden mit FITC wurde auch von Struck und Pagano (1980) im Rahmen von Untersuchungen zum Lipidaustausch zwischen Vesikeln und Fibroblasten durchgeführt. Dazu wurden Fluoreszenzfarbstoffe, unter anderem FITC, kovalent an synthetische Lipide gebunden. Durch eine Behandlung dieser künstlich hergestellten fluoreszierenden Lipide im Ultraschallbad wurde ihr Zusammenschluss zu Vesikeln herbeigeführt. Hamster-Fibroblasten wurden anschließend mit diesen Vesikeln inkubiert und der Austausch von fluoreszierenden Lipiden zwischen den Vesikeln und den Zellen untersucht. In derselben Studie wurde festgestellt, dass bestimmte Fluoreszenzmarkierungen einen Austausch von Lipiden zwischen den Vesikeln und den untersuchten Zellen verhindern. Es wurde vermutet, dass eine Veränderung am polaren Kopf der Lipide deren Transport beeinflussen könnte. Ein Einfluss der Fluoreszenzmarkierung auf die Aufnahme der Chylomikronen konnte im Rahmen der durchgeführten Studie nicht eruiert werden.

### **4.3 Endozytoseversuche mit Chylomikronen**

Zunächst wurden Phagozytoseversuche mit frisch isolierten PBMC durchgeführt. Da eine differenzierte Betrachtung einzelner Zellpopulationen der PBMC durch FACS-Analyse nur eingeschränkt möglich war, wurden für die weiteren Untersuchungen klonierte Zelllinien verwendet. Es wurden die humane  $\gamma/\delta$ -positive T-Zelllinie MOLT-14 sowie die  $\alpha/\beta$ -positive T-Zelllinie MOLT-16 verwendet. Außerdem wurde die Makrophagen-Zelllinie Mono-Mac-6 untersucht.

Die Inkubationsdauer der Zellen mit den Chylomikronen bzw. Microspheres orientierte sich an einer Studie von Tanaka (2004), die den Gehalt von Chylomikronenrestkörpern im Blut untersuchte. Beschrieben wurde eine kontinuierliche Zunahme der Chylomikronenrestkörper im Blut in den ersten 4 Stunden nach Fettbelastung. Danach war die Anzahl der Chylomikronenrestkörper rückläufig. In einem vorläufigen Experiment zu der vorliegenden Arbeit wurde eine Kinetik für die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Chylomikronen durch die Makrophagen-Zelllinie THP1 durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Aufnahme von Chylomikronen bereits nach einer Inkubationszeit von 30 min weitgehend abgeschlossen ist. Daher wurde bei den Phagozytoseversuchen eine Inkubationszeit von maximal 4 h gewählt.

Um eine unspezifische Aufnahme durch Phagozytose von einer rezeptor-vermittelten Endozytose abzugrenzen wurden Zellen parallel für 4 Stunden mit fluoreszenzmarkierten Microspheres inkubiert. Die Größe der Microspheres orientierte sich an der Größe der Chylomikronen und betrug 0,2  $\mu\text{m}$ .

Neben der quantitativen Bestimmung der Partikelaufnahme durch die FACS-Analyse wurden Versuche zur Lokalisation der Chylomikronen und Microspheres durch konfokale Mikroskopie und Elektronenmikroskopie durchgeführt. Bei Verwendung der für die FACS-Analyse eingesetzten direkt markierten Antikörper (PE und APC) reichte die Signalstärke für die konfokale Mikroskopie nicht aus. Daher wurde eine indirekte Immunfluoreszenztechnik mit einem unmarkierten primären Antikörper und einem Cy 3-markierten sekundären Antikörper verwendet. Hierdurch wurde eine wesentlich stärkere Fluoreszenzintensität erreicht. Der zusätzliche Einsatz eines Kernfarbstoffes ermöglichte die Identifizierung des für die Lokalisation endozytierter Partikel relevanten zytoplasmatischen Kompartiments.

Sowohl durch FACS-Analyse als auch durch konfokale Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass die für den Endozytose-Test verwendeten fluoreszenzmarkierten Microspheres in Mono-Mac-6-Zellen sowie in geringerem Umfang in Zellen der  $\gamma/\delta$ -T-Zelllinie (MOLT-14) aufgenommen werden. Die verwendete  $\alpha/\beta$ -T-Zelllinie (MOLT-16) zeigte nach Zugabe von Microspheres bei der FACS-Analyse eine Markierung von 21 % der Zellen. Eine Internalisierung der Microspheres konnte jedoch durch konfokale Mikroskopie nicht nachgewiesen werden.

Da die verwendeten Kunststoffpartikel keine Oberflächenstruktur aufweisen, die durch spezifische Rezeptoren erkannt werden, ist von einer unspezifischen Aufnahme der Partikel durch Phagozytose auszugehen. Die Aufnahme der Partikel in Zellen der Mono-Mac-6-

Zelllinie ist aufgrund der bekannten unspezifischen Phagozytoseaktivität von Makrophagen zu erwarten. Der Nachweis einer phagozytotischen Aufnahme von Microspheres durch  $\gamma/\delta$ -T-Zellen stimmt mit neueren Daten (Brandes et al. 2005), die eine Phagozytoseaktivität und Antigenpräsentation dieser T-Lymphozyten annehmen lassen, überein. Die geringe Anzahl von aufgenommenen Microspheres pro Zelle (5-10) könnte eine Folge der geringen Größe (0,2  $\mu\text{m}$ ) der Partikel sein, die nur eine atypische Phagozytose zulässt. Typischerweise werden zur Beobachtung von Phagozytosevorgängen Microspheres mit einer Größe von 0,6-2  $\mu\text{m}$  verwendet (Al-Mohanna & Hallett 1990; Shirato et al. 1989; Muller & Schuber 1986). Die allenfalls geringe Aufnahme der Microspheres in die  $\alpha/\beta$ -T-Zellen stimmt mit der Ansicht überein, dass  $\alpha/\beta$ -T-Zellen phagozytotisch inaktiv sind (Brandes et al. 2005).

Nach Inkubation mit FITC-markierten Chylomikronen war in der durchgeführten FACS-Analyse bei allen getesteten Zelllinien (Mono-Mac-6, MOLT-14 und MOLT-16) eine FITC-Fluoreszenz nachweisbar. Die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie bestätigten dies. Bei allen drei Zelllinien konnte nach der Inkubation mit markierten Chylomikronen eine zum Teil granuläre FITC-Fluoreszenz des Zytoplasmas nachgewiesen werden.

Da die MOLT-16-Zellen zwar Chylomikronen, nicht jedoch Microspheres internalisieren konnten, ist von einem spezifischen rezeptorvermittelten Aufnahmemechanismus der Chylomikronen, möglicherweise über den Apo B-48 Rezeptor, auszugehen. Die beobachtete granuläre FITC-Markierung könnte in Endozytosevesikel aufgenommene Chylomikronen darstellen. Alternativ oder zusätzlich könnten diese granulären Strukturen Lipidtröpfchen sein, in denen sowohl endogene Fette als auch FITC-markierte Fette aus den Chylomikronen eingelagert wurden. Eine Bindung der Chylomikronen an die Außenseite der Zellmembran gefolgt von einer durch die Lipoprotein-Lipase induzierte Lipolyse und Aufnahme der Spaltprodukte, ist ebenfalls denkbar. Die Zusammenlagerung der auf diese Weise aufgenommenen externen sowie der endogenen Lipidbestandteile könnten zu einer Bildung von Fetttröpfchen im Zytoplasma führen. Allerdings ist unklar, ob bei einem derartigen Mechanismus die Fluoreszenzmarkierung erhalten bliebe.

Mit dem Ziel der genaueren Lokalisation aufgenommener Partikel und detaillierten Darstellung der Zellstrukturen wurden zusätzlich elektronenmikroskopische Aufnahmen der Mono-Mac-6- und der Molt-14-Zellen angefertigt. Bei der Auswertung konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den mit Chylomikronen bzw. Microspheres inkubierten Zellen und entsprechenden Kontrollzellen festgestellt werden. Somit konnten die Ergebnisse

der FACS-Analyse und der konfokalen Mikroskopie durch die Elektronenmikroskopie nicht bestätigt werden.

Es ist möglich, dass zwar Chylomikronen bzw. Microspheres aufgenommen wurden, jedoch im Anschnitt nicht getroffen wurden. Durch die konfokale Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass sich etwa 7-10 Partikel in einer Zelle befinden. Da bei der Elektronenmikroskopie Schnittdicken von 60-80 nm verwendet wurden und der Durchmesser einer Zelle ca. 14-16  $\mu\text{m}$  für Mono-Mac-6-Zellen und 8-10  $\mu\text{m}$  für MOLT-14-Zellen beträgt, ist es denkbar, dass keine Chylomikronen bzw. Microspheres in den angefertigten Schnitten getroffen wurden. Bei den verwendeten Microspheres handelt es sich zusätzlich um Polystyren-Partikel, die bei der Präparation der Proben für die Elektronenmikroskopie aufgelöst werden. Auch ist unklar, in wieweit die Chylomikronen nach der Fixierung gegen die Auflösung durch die verwendeten organischen Solventien geschützt sind. Die vermutlich nach dem Auflösen zurückbleibenden leeren Vesikel könnten wahrscheinlich nicht von physiologisch in den Zellen vorhandenen Membraneinstülpungen oder präparationsbedingten Artefakten unterschieden werden.

In allen Zellen waren unabhängig von der vorherigen Inkubation mit Chylomikronen Fetttröpfchen im Zytoplasma nachweisbar. Da bei der Elektronenmikroskopie die Fluoreszenzmarkierung der Chylomikronen nicht genutzt werden konnte, war eine Unterscheidung zwischen endogenen und mit den Chylomikronen aufgenommenen Fetten nicht möglich. Eine Aussage, ob es sich bei den beobachteten vesikulären Strukturen um Residuen von Endozytosevesikeln handelt, war ebenfalls nicht eindeutig möglich. Auch ist zu erwarten, dass die vermutete rezeptorvermittelte Endozytose der Chylomikronen nicht zu einer Ausbildung charakteristischer Phagolysosomenstrukturen führt.

#### **4.4 Mögliche physiologische Bedeutung der Endozytose von Chylomikronen durch Zellen des Immunsystems**

Chylomikronen sind ein wesentliches Transportmittel für mit der Nahrung aufgenommene Fette. Die Ergebnisse der Arbeit bestätigen die Möglichkeit einer spezifischen Aufnahme von Chylomikronen durch Zellen des Immunsystems. Vor allem die beobachtete Aufnahme von Chylomikronen durch Zellen einer  $\gamma/\delta$ -T-Zelllinie ist bemerkenswert und lässt die Existenz eines noch wenig verstandenen Mechanismus des Immunsystems unter Beteiligung dieser Zellen vermuten. Bei der Bewertung der Ergebnisse muss allerdings bedacht werden, dass klonierte Zelllinien verwendet wurden, die nicht zwangsläufig das Verhalten der relevanten

Zellen des Immunsystems widerspiegeln. Im Rahmen weiterführender Studien müssten Versuche mit frisch isolierten Leukozyten durchgeführt werden. Um eine zuverlässigere Untersuchung einzelner Zellpopulationen zu ermöglichen, wäre eine Trennung durch Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung (*Fluorescence-activated cell sorting*) oder magnetische Sortierung möglich. Um die Frage zu klären, ob die Aufnahme von Chylomikronen durch Zellen des Immunsystems eine Rolle bei der Toleranzentwicklung gegen Nahrungsbestandteile spielt, könnte die Aufnahme von Chylomikronen in T-Zellen gesunder Probanden im Vergleich zu Allergikern untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Als Chylomikronen wird eine Hauptfraktion der Lipoproteine bezeichnet, die durch geringe Dichte, große Partikeldurchmesser und einen hohen Triglycerid-Anteil charakterisiert ist. Die Bildung der Chylomikronen erfolgt in der Darmschleimhaut. Die Hauptfunktion dieser Lipoproteine ist der Transport von Nahrungslipiden über die Lymph- und Blutbahn zu verschiedenen Geweben. In wie weit eine Aufnahme von Chylomikronen durch Zellen des Immunsystems erfolgt und ob ein derartiger Vorgang wichtig für die Funktion des Immunsystems ist, wurde bisher wenig untersucht. Daher wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, eine Endozytose von Chylomikronen durch Leukozyten zu beobachten. Die Isolierung der Chylomikronen aus humanem Plasma erfolgte durch mehrere Zentrifugations- und Waschschrte. Die Identität der Chylomikronen wurde durch Elektrophorese unter nativen Bedingungen in einer Agarose-Matrix sowie durch Nachweis des spezifischen Apolipoproteins B-48 durch Western-Blot Analyse bestätigt. Eine Fluoreszenzmarkierung der Chylomikronen wurde durch Konjugation mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) erreicht. An Apolipoproteine gebundenes FITC wurde durch Western-Blot-Analyse mit einem anti-FITC-Antikörper nachgewiesen. Für die Durchführung von Endozytoseversuchen wurden Zellen einer Makrophagenzelllinie (Mono-Mac-6) einer  $\alpha/\beta$ -T-Zellrezeptor-positiven (MOLT 16) und einer  $\gamma/\delta$ -T-Zellrezeptor-positiven Zelllinie (MOLT 14) verwendet. Nach Inkubation mit FITC-markierten Chylomikronen wurde mit allen drei Zelllinien eine Fluoreszenz der Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen. Durch konfokale Mikroskopie wurden zytoplasmatische, teilweise granuläre fluoreszierende Strukturen beobachtet. Ein elektronenmikroskopischer Nachweis endozytierter Chylomikronen war nicht möglich.

## Summary

Chylomicrones are one main group of lipoproteins characterized by low density, enormous particle diameter and a high portion of triacylglycerid. Chylomicrones are formed in the intestinal mucosa. Their main function is to transport alimentary lipids via the lymph- and bloodstream to various tissues. Whether chylomicrones are absorbed by cells of the immune system and what importance such a process has for the function of the immune system has not yet been tested extensively.

For the presented paper a method to monitor the endocytosis of chylomicrones was developed. Multiple zentrifugation- and washing-steps were used to isolate the chylomicrones from human plasma. Conjugation with fluorescein-isothiocyanat (FITC) accomplishes a labelling of chylomicrones with fluorescence. Electrophoreses under natural conditions in an agarose-matrix as well as detection of the specific apolipoprotein B-48 in a western-blot were applied in order to confirm the identity of chylomicrones. FITC attached to apolipoproteins was detected by means of western-blot-analysis with anti-FITC-antibody.

In processing the endocytosis-experiments three cell lines were made use of: A macrophage cell line (Mono-Mac-6), a  $\alpha/\beta$ -T-cell receptor positive (MOLT 16) and a  $\gamma/\delta$ -T-cell receptor positive cell line. After incubation with FITC-marked chylomicrones flow cytometry verified fluorescence in all three cell lines. Convocal microscopy even made visible zytoplasmatic, in parts granular fluorescing structures. Endozytosised chylomicrones though could not be verified by electron microscopy.

## 6 Literaturverzeichnis

Al-Mohanna FA, Hallett MB. Actin polymerization in neutrophils is triggered without a requirement for a rise in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>. *Biochem J*. 1990 Mar 15; 266(3): 669-74.

Anant S, Davidson NO. Abstract Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing. *Curr Opin Lipidol*. 2001 Apr; 12(2):159-65.

Barak LS, Webb WW. Fluorescent low density lipoprotein for observation of dynamics of individual receptor complexes on cultured human fibroblasts. *J Cell Biol*. 1981 Sep; 90(3):595-604.

Black DD. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Sep; 293(3):G519-24.

Brandes M, Willmann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gamma delta T Cells. *Science*. 2005 Jul 8;309(5732):264-8. Epub 2005 Jun 2.

Brown ML, Ramprasad MP, Umeda PK, Tanaka A, Kobayashi Y, Watanabe T, Shimoyamada H, Kuo WL, Li R, Song R, Bradley WA, Gianturco SH. A macrophage receptor for apolipoprotein B48: cloning, expression, and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 Jun 20; 97(13):7488-93.

Brown ML, Yui K, Smith JD, LeBoeuf RC, Weng W, Umeda PK, Li R, Song R, Gianturco SH, Bradley WA. The murine macrophage apoB-48 receptor gene (Apob-48r): homology to the human receptor. *J Lipid Res*. 2002 Aug; 43(8):1181-91.

De Deckere EA, Verplanke CJ, Blonk CG, Van Nielen WG. Effects of type and amount of dietary Fat on rabbit and rat lymphocyte proliferation in vitro. *J Nutr*. 1988 Jan; 118(1):11-8.

De Pascale C, Avella M, Perona JS, Ruiz-Gutierrez V, Wheeler-Jones CP, Botham KM. Fatty acid composition of chylomicron remnant-like particles influences their uptake and induction of lipid accumulation in macrophages. *FEBS J.* 2006 Dec; 273(24): 5632-40.

De Sanctis JB, Blanca I, Bianco NE. Expression of different lipoprotein receptors in natural killer cells and their effect on natural killer proliferative and cytotoxic activity. *Immunology.* 1995 Nov; 86(3):399-407.

Dorfman SE, Wang S, Vega-Lopez S, Jauhiainen M, Lichtenstein AH. Dietary fatty acids and cholesterol differentially modulate HDL cholesterol metabolism in Golden-Syrian hamsters. *J Nutr.* 2005 Mar; 135(3):492-8.

Dugué-Pujol S, Rousset X, Pastier D, Quang NT, Pautre V, Chambaz J, Chabert M, Kalopissis AD. Human apolipoprotein A-II associates with triglyceride-rich lipoproteins in plasma and impairs their catabolism. *J Lipid Res.* 2006 Dec;47(12):2631-9.

Elsegood CL, Mamo JC. An investigation by electron microscopy of chylomicron remnant uptake by human monocyte-derived macrophages. *Atherosclerosis.* 2006 Oct; 188(2):251-9.

Forti N, Diament J. High-density lipoproteins: metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic intervention aspects. *Arq Bras Cardiol.* 2006 Nov;87(5):671-9.

Gianturco SH, Lin AH, Hwang SL, Young J, Brown SA, Via DP, Bradley WA. Distinct murine macrophage receptor pathway for human triglyceride-rich lipoproteins. *J Clin Invest.* 1988 Nov; 82(5):1633-43.

Glickman RM, Kilgore A, Khorana J. Chylomicron apoprotein localization within rat intestinal epithelium: studies of normal and impaired lipid absorption. *J Lipid Res.* 1978 Feb; 19(2):260-8.

Glickman RM, Kirsch K, Isselbacher KJ. Fat absorption during inhibition of protein synthesis: studies of lymph chylomicrons. *J Clin Invest.* 1972 Feb; 51(2):356-63.

Glickman RM, Kirsch K. Lymph chylomicron formation during the inhibition of protein synthesis. Studies of chylomicron apoproteins. *J Clin Invest.* 1973 Nov; 52(11):2910-20.

Gu X, Lawrence R, Krieger M. Dissociation of the high density lipoprotein and low density lipoprotein binding activities of murine scavenger receptor class B type I (mSR-BI) using retrovirus library-based activity dissection. *J Biol Chem.* 2000;275(13):9120-30.

Haraguchi G, Kobayashi Y, Brown ML, Tanaka A, Isobe M, Gianturco SH, Bradley WA. PPAR(alpha) and PPAR(gamma) activators suppress the monocyte-macrophage apoB-48 receptor. *J Lipid Res.* 2003 Jun;44(6):1224-31.

Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. *EMBO J.* 2006 Apr 5; 25(7):1419-25.

Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Fainaru M, Brecht WJ, Lindquist PA. Chylomicron-chylomicron remnant clearance by liver and bone marrow in rabbits. Factors that modify tissue-specific uptake. *J Biol Chem.* 1989 Jun 5;264(16):9571-82.

Jackson KG, Williams CM. Apolipoprotein B-48: comparison of fasting concentrations measured in normolipidaemic individuals using SDS-PAGE, immunoblotting and ELISA. *Atherosclerosis.* 2004 Oct; 176(2):207-17.

Ji ZS, Sanan DA, Mahley RW. Intravenous heparinase inhibits remnant lipoprotein clearance from the plasma and uptake by the liver: in vivo role of heparan sulfate proteoglycans. *J Lipid Res.* 1995 Mar;36(3):583-92.

Ji ZS, Dichek HL, Miranda RD, Mahley RW. Heparan sulfate proteoglycans participate in hepatic lipase and apolipoprotein E-mediated binding and uptake of plasma lipoproteins, including high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1997 Dec 12;272(50):31285-92.

Kalab M, Martin WG. Gel filtration of native and modified pig serum lipoproteins. *J Chromatogr.* 1968 Jun 4; 35(2):230-3.

Karpe F, Hamsten A. Determination of apolipoproteins B-48 and B-100 in triglyceride-rich lipoproteins by analytical SDS-PAGE. *J Lipid Res.* 1994 Jul; 35(7):1311-7.

Knight BL. ATP binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux. *Biochemical Society Transactions* 2004; 32(1): 124-127.

Kotite L, Bergeron N, Havel RJ. Quantification of apolipoproteins B-100, B-48, and E in human triglyceride-rich lipoproteins. *J Lipid Res.* 1995 Apr; 36(4):890-900.

Lichtenstein AH. Thematic review series: patient-oriented research. Dietary fat, carbohydrate, and protein: effects on plasma lipoprotein patterns. *J Lipid Res.* 2006 Aug; 47(8):1661-7.

Lippi G, Guidi G. Lipoprotein(a): from ancestral benefit to modern pathogen? *QJM.* 2000 Feb; 93(2):75-84.

Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res.* 1999 Jan; 40(1):1-16.

Miura S, Imaeda H, Shiozaki H, Ohkubo N, Tashiro H, Serizawa H, Tsuchiya M, Tso P. Increased proliferative response of lymphocytes from intestinal lymph during long chain fatty acid absorption. *Immunology.* 1993 Jan; 78(1):142-6.

Muller CD, Schuber F. Fluorometric determination of polystyrene latex: application to the measurement of phagosomes and phagocytosis. *Anal Biochem.* 1986 Jan; 152(1): 167-76.

Napolitano M, Bravo E. Evidence of dual pathways for lipid uptake during chylomicron remnant-like particle processing by human macrophages. *J Vasc Res.* 2006; 43(4):355-66.

Napolitano M, Bravo E. Lipid metabolism and TNF-alpha secretion in response to dietary sterols in human monocyte derived macrophages. *Eur J Clin Invest.* 2005 Aug; 35(8):482-90.

Niu YG, Hauton D, Evans RD. Utilization of triacylglycerol-rich lipoproteins by the working rat heart: routes of uptake and metabolic fates. *J Physiol.* 2004 Jul 1;558(Pt 1):225-37.

Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM*. 2005 Dec; 98(12):845-56.

Palmer AM, Nova E, Anil E, Jackson K, Bateman P, Wolstencroft E, Williams CM, Yaqoob P. Differential uptake of subfractions of triglyceride-rich lipoproteins by THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*. 2005 Jun; 180(2):233-44.

Schaefer EJ, Eisenberg S, Levy RI. Lipoprotein apoprotein metabolism. *J Lipid Res*. 1978 Aug;19(6):667-87.

Shirato S, Murphy CG, Bloom E, Franse-Carman L, Maglio MT, Polansky JR, Alvarado JA. Kinetics of phagocytosis in trabecular meshwork cells. Flow cytometry and morphometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989 Dec; 30(12): 2499-511.

Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*. 2006 Jul; 37(7):1923-32.

Struck DK, Pagano RE. Insertion of fluorescent phospholipids into the plasma membrane of a mammalian cell. *J Biol Chem*. 1980 Jun 10; 255(11):5404-10.

Tanaka A. Postprandial hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2004;11(6):322-9.

Thomson ABR. Intestinal aspects of lipid absorption: in review - includes glossary. *Nutrition Today*, 1989; 24(4): 16-20.

Zilversmit DB, Shea TM. Quantitation of apoB-48 and apoB-100 by gel scanning or radioiodination. *J Lipid Res*. 1989 Oct;30(10):1639-46.

**Erklärung :**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.