Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik I,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. H. Greten

# Untersuchung des Einflusses von Rezeptor-assoziiertem Protein auf die Lipoproteinlipase-vermittelte Lipoproteinaufnahme *in vivo*

# Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Ines Jüttner
aus Nordenham

Hamburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am:
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Sprecher:
Referent:
Koreferent:

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit gewidmet

# *Inhaltsverzeichnis*

**A EINLEITUNG**

1. Einführung ... 1
2. Physiologie der Lipoproteine ... 1
   2.1. Stoffwechsel der exogenen Lipide ... 1
   2.2. Stoffwechsel der endogenen Lipoproteine ... 2
      2.2.1. Scavenger pathway ... 4
      2.2.2. Reverser Cholesterintransport zur Leber ... 5
3. Lipoproteine ... 6
4. LPL ... 6
5. Lipoprotein- Rezeptoren ... 7
   5.1. Allgemeiner Aufbau ... 7
   5.2. LDL-R ... 9
   5.3. VLDL-R ... 10
   5.4. LDL-R-Related-Protein ... 11
   5.5. gp330/ Megalin ... 12
6. RAP ... 13
7. Proteoglykane ... 13
8. Klinischer Aspekt: Familiäre kombinierte Hyperlipidämie und Arteriosklerose ... 14
9. Ziel der Arbeit ... 14

**B MATERIAL UND METHODEN**

1. Allgemeine Materialien ... 16
   1.1. Chemikalien ... 16
   1.2. Enzyme und Proteine ... 17
   1.3. Verbrauchsmaterialien ... 17
   1.4. Geräte ... 17
2. Allgemeine Arbeitsmethoden ... 18
   2.1. Sterilisation ... 18
   2.2. Pufferherstellung ... 18
      2.2.1. BPB-Puffer ... 18
      2.2.2. J´s-Puffer ... 18
      2.2.3. MOPS-SDS-Laufpuffer 20-fach ... 18
      2.2.4. Herstellung der LB-Platten bzw. des Mediums ... 19
      2.2.5. Lysispuffer zum Verdau der Schwanzbiopsie ... 19
      2.2.6. SDS Probenpuffer 4-fach ... 19

2.2.7. Solubisationspuffer ... 19
2.2.8. TBE-Puffer ... 20
2.2.9. TE-Puffer ... 20
3. Tiere ... 20
3.1. Tierhaltung ... 20
3.2. Mauslinien ... 20
3.2.1. LDL-R-KO ... 20
3.2.2. LPL2/McK–N–LPL ... 20
3.3. Genotypisierung von Mauslinien ... 21
3.3.1. Entnahme des Biopsats ... 21
3.3.2. Tail Tip-Verdau ... 21
3.3.3. DNA–Extraktion ... 21
3.3.4. Mck-N-LPL-PCR ... 22
3.3.5. Gelelektrophorese ... 22
4. Lipoproteinprofil-Erstellung ... 23
4.1. Blutentnahme ... 23
4.2. Lipoproteinzentrifugation ... 23
4.3. TG- und Cholesterol-Assay ... 23
5. Herstellung von RAP ... 24
5.1. Bakterienkultur ... 24
5.2. Aufbrechen der Bakterien ... 24
5.3. Reinigung ... 25
5.4. Elution ... 25
5.5. Dialyse ... 25
6. SDS–Polyacrylamid-Elektrophorese ... 25
6.1. Vorbereitung der SDS-Proben ... 25
6.2. Färbung nach Coomassie ... 26
6.2.1. Fixierung ... 26
6.2.2. Färbung ... 26
6.2.3. Entfärbung ... 26
7. Proteinbestimmung nach Bradford ... 27
8. Durchführung der metabolischen Lipoprotein-Studie ... 27
8.1. Radioaktive Markierung der Chylomikronen ... 27
8.2. Versuchsablauf ... 28
8.3. Messung der Radioaktivität vor der Extraktion ... 28
8.4. Lipidextraktion ... 29
8.5. Messung der Radioaktivität nach der Extraktion ... 29

**C ERGEBNISSE**

1. RAP-Produktion ..... 30
2. Lipoproteinprofil von LDL-R-KO Mäusen nach RAP-Injektion ..... 31
3. Metabolische Studie mit RAP (30 min Laufzeit) ..... 32
   - 3.1. Plasma-Turnover von Chylomikronen ..... 32
   - 3.2. Chylomikronenaufnahme in Organe ..... 35
4. Metabolische Studie mit RAP (10 min Laufzeit) ..... 36
   - 4.1. Plasmaturnover von Chylomikronen ..... 36
   - 4.2. Chylomikronenaufnahme in Organe ..... 38
   - 4.3. Cholesteroletheraufnahme in Organe ..... 40

**D DISKUSSION**

1. RAP-Produktion ..... 42
2. Lipoproteinprofil nach RAP ..... 42
3. Metabolische Studien mit RAP ..... 43
   - 3.1. 30 min Studie ..... 43
   - 3.2. 10 min Studie ..... 45

**E ZUSAMMENFASSUNG** ..... 46

**F LITERATURVERZEICHNIS** ..... 47

**G VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN** ..... 51

# Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|---|---|
| apo | Apoprotein |
| AS | Aminosäuren |
| cpm | counts per minute (Zählimpulse pro Minute) |
| EDTA | Ethylendiamin-Tetraessigsäure |
| gp | Glykoprotein |
| $^{3}$H-CE | $^{3}$H-Cholesterolether |
| HDL | High density lipoprotein |
| HSPG | Heparansulfat-Proteoglykane |
| IDL | Intermediate density lipoprotein |
| $^{125}$J-TC | $^{125}$Jod-Tyramin-Zellubiose |
| LDL | Low density lipoprotein |
| LDL-R | LDL-Rezeptor |
| LDL-R-KO | LDL-R knockout |
| LPL | Lipoproteinlipase |
| LRP | LDL-R-Related-Protein |
| Mck-N-LPL | Muskelexpression transgener, inaktiver LPL |
| NaCl | Natriumchlorid |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| RAP | Rezeptor-assoziiertes Protein |
| SR | Scavenger-Rezeptor |
| SDS | Sodiumdodecyl-Sulfat |
| TG | Triglyzeride |
| VLDL | Very low-density lipoprotein |

# A Einleitung

## 1. Einführung

Lipide sind im lebenden Organismus unerlässlich. Sie sind entscheidend an der Ausbildung zellulärer Membranen beteiligt. Sie bilden auch den Ausgangspunkt für eine Vielzahl von Hormonen und Vitaminen. Der Organismus deckt große Teile seines Energiebedarfs durch Fette. Fette erbringen bei ihrer Verbrennung die höchste Energieausbeute: Ein Gramm Fett liefert 39,6 kJ.

Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaft müssen Lipide im Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit mit Hilfe von „Lösungsvermittlern“, wie z. B. Apoproteine oder Albumine, transportiert werden. Bei Fettstoffwechselstörungen kann es zu prämaturer Artheriosklerose und koronarer Herzkrankheit kommen. Mutationen des zentralen Enzyms der plasmatischen Triglyzeridhydrolyse, der Lipoproteinlipase (LPL), können zu Fettstoffwechselstörungen führen.

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist es, die physiologischen Mechanismen der LPL-vermittelten Lipoproteinaufnahme in den Muskel weiter zu untersuchen. Hierzu soll mutierte inaktive LPL im Muskel transgener Mäuse (Mck-N-LPL) exprimiert und der Stoffwechsel bestimmter Lipoproteine unter Beeinflussung von Rezeptor-assoziiertem Protein (RAP) charakterisiert werden.

## 2. Physiologie der Lipoproteine

Der Stoffwechsel der Lipoproteine erfolgt über einen exogenen und einen endogen Weg (Abbildung 1).

### 2.1. Stoffwechsel der exogenen Lipide

Die Magenlipase spaltet die kurz- und mittelkettigen Triglyzeride (TG). Der Hauptteil der Nahrungsfette wird jedoch im Duodenum durch die Pankreaslipase gespalten.

Die TG werden durch Gallensäuren aus der makroskopisch unlöslichen Form der Fettpartikel in die dispergierbare Form der Micellen gebracht. Gallensalze, wie die Taucholsäure, stellen amphiphatische Verbindungen dar, die in der Leber aus Cholesterin synthetisiert, in der Gallenblase gespeichert und nach einer fetthaltigen Nahrung an den Dünndarm abgegeben werden. Die Gallensäuren werden über den enterohepatischen Kreislauf aus dem terminalen Ileum zurück in die Leber transportiert. Durch diese Micellenbildung ist es der wasserlöslichen Pankreaslipase des Darms möglich, die TG in 2-Monoglyzeride, freie Fettsäuren und Glycerin umzuwandeln. Diese Abbauprodukte werden von der Darmschleimhaut aufgenommen. Sie diffundieren in die Epithelzellen und werden am endoplasmatischen Retikulum wieder reverstert. Darüber hinaus erfolgt die TG-Synthese auch aus α-Glycerophosphat aus der Glykolyse und aus freien Fettsäuren. Die Veresterung von Cholesterin durch die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase findet in der Mucosazelle statt. Zuerst werden die Stoffe durch das Triacyltransfer-Protein zum Golgi-Apparat

transportiert. Dann lagern sich das Cholesterinester, die TG sowie die Phospholipide zusammen. Durch Assoziation an die Apolipoproteine (apo) B-48, A-I und A-IV entstehen nun die Chylomikronen, die als Sekretgranula über die Exozytose aus den Enterozyten in das lymphatische System und über den Ductus thoracicus in die Arteria subclavia und damit in den Blutstrom gelangen.

Im Blutstrom bekommen die Chylomikronen die von „high density lipoprotein“ ($HDL_2$) bereitgestellten apo-CII, -CIII und -E im Austausch gegen apo-AI und AIV. Die Chylomikronen gelangen von hier als Energielieferant zum Fettgewebe, zum Skelettmuskel, zum Milchdrüsengewebe und zum Herzen. Die LPL wird durch apo-CII aktiviert, das sich auf der Oberfläche der Chylomikronen befindet. Sie hydrolysiert TG zu freien Fettsäuren und Glycerin. Die Fettsäuren werden in das Fettgewebe aufgenommen und durch die Thiokinase in Acyl-CoA überführt. Anschließend kann das Acyl-CoA zur Triacylglycerin-Biosynthese verwendet und gespeichert werden. Im Muskelgewebe entsteht durch Oxidierung der Fettsäuren Energie. Die Chylomikronen enthalten nun hauptsächlich Cholesterin und die apo-E und apo-B48. Sie werden in dieser TG-armen und apo-E-reichen Form als „remnants“ bezeichnet und gelangen mit dem Blutstrom zur Leber. Die Assoziation der „remnants" mit apo-E erhöht dabei wesentlich die Affinität zum „low density lipoprotein“-Rezeptor (LDL-R) der Leber. Nach der Hydrolyse verbleibt LPL an den Chylomikronen-Remnants, so dass diese Partikel auch über das LDL-R-Releated-Protein (LRP) mittels Endocytose-vermittelter Aufnahme in die Leber gelangen können (Beisiegel *et al.* 1991). Vermutlich existieren noch weitere hepatische Lipoprotein-Rezeptoren.

In den Hepatozyten unterliegen die Komponenten der Chylomikronenreste einem lysosomalen Abbau. Die auf den Partikeln verbliebenen exogen zugeführten TG sowie Oberflächenlipide und Cholesterinester werden in den intrazellulären Pools zwischengespeichert.

## 2.2. Stoffwechsel der endogenen Lipoproteine

Der endogene Stoffwechselweg ist für die Versorgung des Körpers mit Cholesterin und TG während der Nahrungskarenz verantwortlich.

In der Leber entstehen die TG-reichen „very-low-density-lipoprotein"-Partikel (VLDL). Zunächst wird die apo-B100 Komponente an den Ribosomen synthetisiert und gelangt dann zum endoplasmatischen Retikulum. Das mikrosomale Triacylglycerid-Transferprotein lädt die Lipide, TG und Cholesterinester auf das apo-B. Im Golgi-Apparat findet dann noch eine Modifizierung der Proteinkomponenten und der Einbau der Phospholipide (besonders des Phophatidycholins) statt.

Die VLDL-Partikel gelangen über die Endothelfenster der Lebersinusoide in die Blutbahn. VLDL bestehen neben Lipiden und apo-B100 aus kleinen Mengen apo-E und apo-CII, deren Anteil noch durch HDL angereichert wird. Im Austausch gegen freies Cholesterin werden Phospholipide über

das Phospholipid-Transferprotein auf HDL übertragen. Als weitere Komponente wurde auch apo-AV in der VLDL- und HDL-Fraktion nachgewiesen. Apo-AV hat eine senkende Wirkung auf den Plasma-TG-Spiegel (Pennacchio *et al.* 2001). Besteht ein hoher TG-Bedarf, entstehen große VLDL-Partikel. Umgekehrt entstehen bei geringem Bedarf kleinere VLDL-Partikel. Daraus resultiert eine unterschiedliche Affinität zu Lipasen und Rezeptoren und dementsprechend eine längere oder kürzere Verweildauer im Blut. Aktiviert durch apo-CII hydrolysiert die LPL ca. 90% der TG in den VLDL. Dagegen wirkt apo-CIII hemmend auf die LPL.

Aus VLDL-Partikel entstehen VLDL-Remnants oder „intermediate density lipoprotein" (IDL). Vermittelt durch apo-E interagieren diese cholesterinreichen Partikel mit dem LDL-R auf den Hepatozyten und werden so aus der Blutbahn entfernt. Allerdings können sie auch direkt auf jeder Delipidierungsstufe katabolisiert werden. Die Enthüllung der Bindungsdomäne von apo-E erfordert die vorherige Hydrolyse, begleitet vom Verlust des apo-C-Proteins. Ein Teil der VLDL-Remnants bzw. der IDL wird zu LDL. Dabei verlieren VLDL-Remnants ihren apo-E-Anteil und nehmen Cholesterinester über die Aktivität des Cholesterinester-Transferproteins aus HDL auf.

LDL transportiert mehr als 2/3 des Cholesterins im Plasma. Apo-B100 vermittelt die Aufnahme der LDL über den LDL-R. Den größten Anteil des LDL-Katabolismus leistet die Leber. Bezogen auf das Organgewicht ist der Gehalt an LDL-R in Nebennierenrinde, Gonaden und Leber am höchsten.

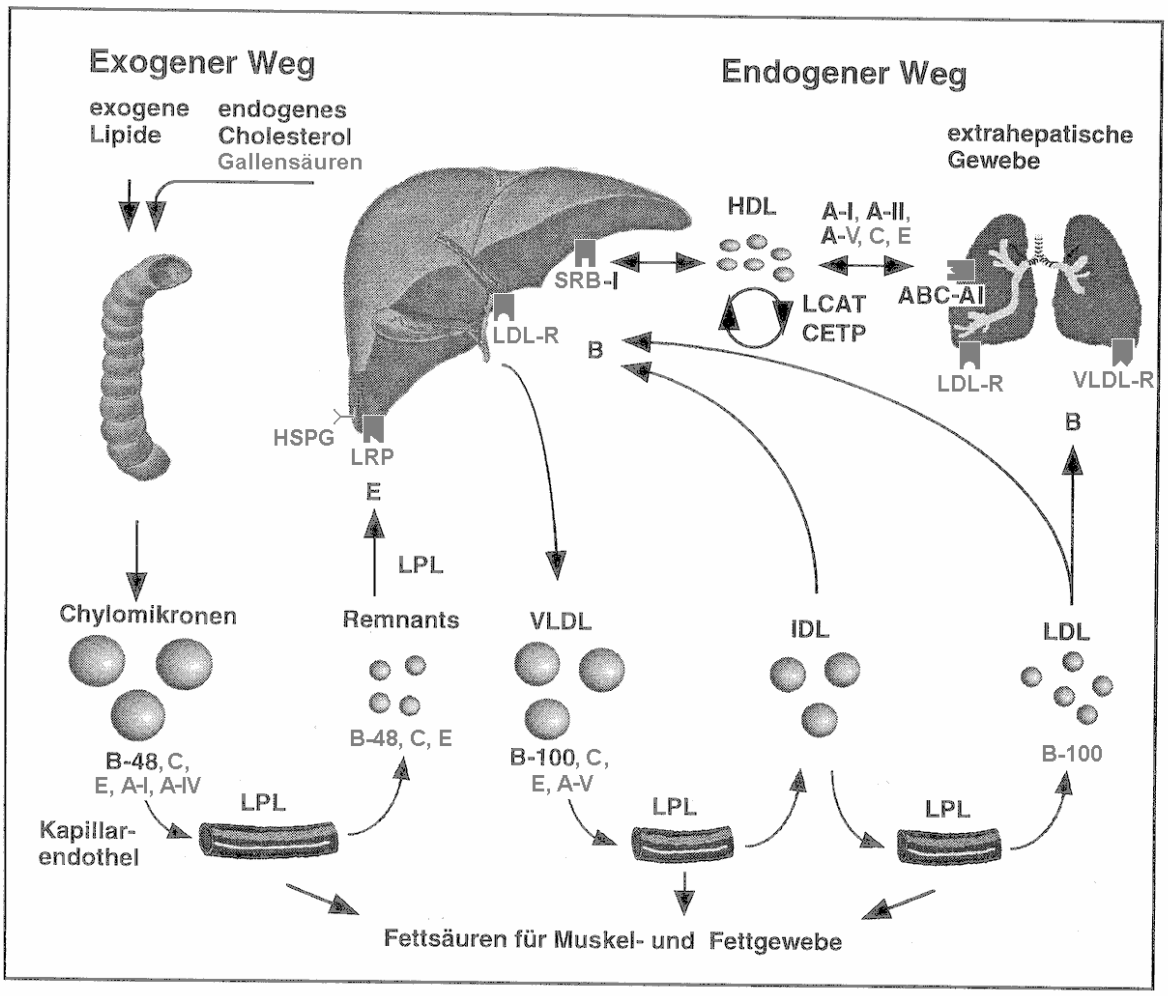



***Abbildung 1: Exogener und endogener Plasmalipidstoffwechsel.*** *TG-reiche Lipoproteine, endogenes Cholesterol und Gallensäuren werden über Chylomikronen in die Peripherie transportiert und hier durch die Lipoproteinlipase (LPL) gespalten. Die entstehenden Chylomikronen-Remnants enthalten eine hohe Konzentration an Cholesterinestern. Ebenso entstehen über das endogene System aus triglyzerid-reichen very-low-density-lipoprotein Partikeln (VLDL) über die LPL-Hydrolyse intermediate-density-lipoprotein Partikel (IDL) und schließlich low-density-lipoprotein Partikel (LDL). Der Abbau der Lipoproteine geschieht durch rezeptorvermittelte Endozytose: LDL-R, VLDL-R, LRP und HSPG. Durch den reversen Cholesterintransport von der Peripherie zur Leber können Cholesterine eliminiert werden. Massgeblich an diesem Prozess sind das high-density-lipoprotein (HDL), die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT) und das Cholesterinester-Transferprotein (CETP) beteiligt.*

2.2.1. Scavenger pathway

Ist die Bindungsfähigkeit an den LDL-R durch chemische oder enzymatische Modifizierung verloren gegangen bzw. ist die LDL-R vermittelte Aufnahme gesättigt, werden die LDL-Partikel von der Gruppe der Scavenger-Rezeptoren (SR) aufgenommen, die auf den Zellen des Retikulohistiozytären Systems (RHS: Makrophagen, Kupffer-Sternzellen) exprimiert werden. Die Kapazität der SR steht im linearen Zusammenhang mit der LDL-Konzentration. Weil durch Aufnahme azetylierter und oxidierter LDL die Makrophagen zu Schaumzellen transformieren

können, wird diskutiert, ob der SR eine Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose spielt. Schaumzellen sind der Beginn der Entwicklung atheromatöser Plaques. Da kein Feedback-Mechanismus für den zellulären Cholesteringehalt besteht, gelangt das Cholesterin ungebremst in die Zelle.

Jedoch erkennen die SR nicht nur modifizierte LDL, sondern auch modifizierte Proteine bis hin zu oxidativ veränderten Erythrozyten, so dass sie auch eine Schutzfunktion im Organismus erfüllen.

### 2.2.2. Reverser Cholesterintransport zur Leber

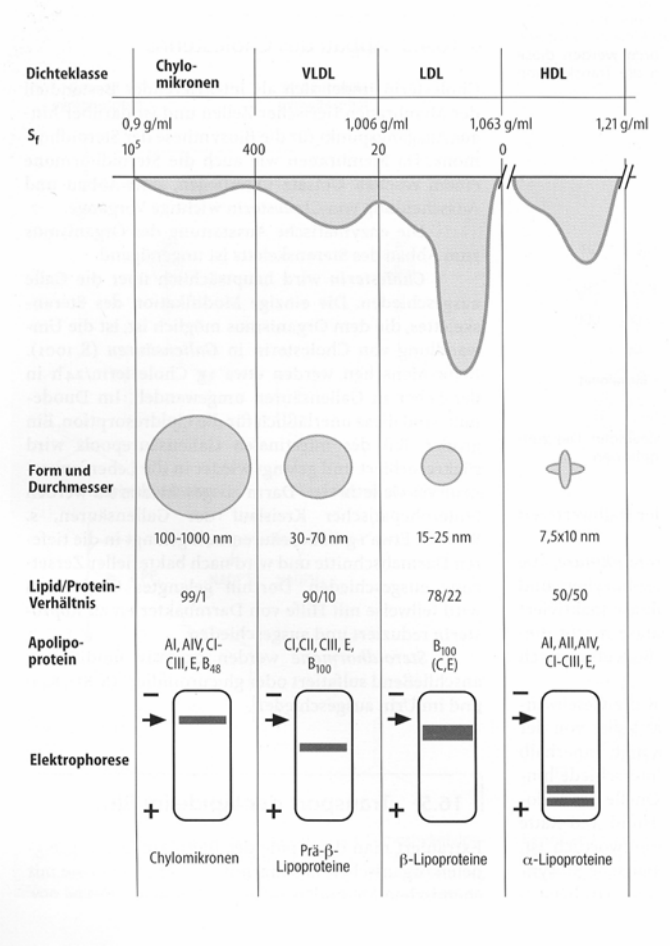
Die Leber ist neben der Haut das einzige Organ, das Cholesterin direkt oder über den Umbau zu Gallensäuren eliminieren kann. Die Bedeutung der HDL besteht dabei in der Fähigkeit, freies Cholesterin aus peripheren Zellen aufzunehmen und somit atheroprotektiv zu wirken (Glomset, 1968). In der Leber werden die Vorstufen der Lipoproteine mit hoher Dichte synthetisiert. Diese Vorstufen bestehen vor allem aus apo-AI, aber auch aus apo-AII und apo-E.

Es gibt drei Subpopulationen $HDL_{1-3}$, die je nach Lipid/Proteinverhältnis unterschieden werden. In den HDL erfolgt die Veresterung von freiem Cholesterin über die Lezithin-Cholesterol-Acyltransferase, wobei apo-AI als Cofaktor fungiert (Fielding *et al.* 1972). Diese Cholesterinester werden unter Vermittlung des Cholesterinester-Transferproteins auf apo-B enthaltende Lipoproteine übertragen und letztlich über LDL zur Leber transportiert (Cholesterinester-Recycling). Weiterhin wird Cholesterinester durch die HDL-Partikel direkt zur Leber gebracht und über den SR-BI selektiv die Cholesterinester-Aufnahme ohne Apolipoprotein-Aufnahme vermittelt (Rigotti *et al.* 1997).

Der ATP-binding cassette transporter 1 (ABC-A1) ist an der Bildung reifer HDL und dem Efflux zellulärer Lipide in der Form beteiligt, dass er aufgenommene HDL und lipidarme Partikel vom Golgiapparat zur Plasmamembran transportiert und so eine Lipidierung vermittelt (Rogler *et al.*1995). Auf diese Weise könnte der in Leber- und peripheren Zellen exprimierte Transporter den Cholesterinabtransport regulieren (Langmann *et al.* 1999).

## 3. Lipoproteine

Lipoproteine unterscheiden sich in Dichte, Form, Zusammensetzung und in elektrophoretischen Eigenschaften (Havel *et al.* 1955) (Abbildung 2).




Ergänzung (Gew.-%)

| | Chylo-M. | VLDL | LDL | HDL |
|---|---|---|---|---|
| Protein | 2 | 10 | 23 | 55 |
| Phospholipide | 9 | 18 | 20 | 24 |
| freies Cholesterin | 1 | 7 | 8 | 2 |
| Cholesterylester | 3 | 12 | 37 | 15 |
| TG | 85 | 50 | 10 | 4 |

***Abb. 2:*** **Zusammensetzung der einzelnen Lipoproteine.**

## 4. LPL

Die Genfamilie der neutralen Lipasen wird von der LPL, der Hepatischen Lipase und der Pankreatischen Lipase gebildet (Kirchgessner *et al.* 1989, Kirchgessner *et al.* 1987). Die LPL liegt als nicht kovalent gebundenes aktives Homodimer vor.

Das Protein setzt sich aus zwei Domänen zusammen. Der größere aminoterminale Bereich enthält das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade und der Bindungsstelle für den Cofaktor Apo CII (Havel *et al.* 1973, LaRosa *et al.* 1970). Eine Proteindomäne, die durch Disulfidbindung eine geschlossene Oberflächenschleife („loop") bildet, verdeckt das aktive Zentrum der LPL und blockiert den freien Substrat-Zugang (Dugi *et al.* 1992). Der carboxyterminale Bereich dient als Bindungsstelle für die Lipoproteinrezeptoren und Lipide. Sowohl die aminoterminale als auch die

carboxyterminale Domäne tragen zur Heparinbindung des Proteins bei (Davis *et al.* 1992; Dichek *et al.* 1993).

Als zentrales Enzym der TG-Hydrolyse aus Chylomikronen und VLDL stellt die LPL den Organen freigesetzte Fettsäuren als Energiequelle zur Verfügung (Merkel *et al.* 2002a). Außerdem werden Apolipoproteine und Phospholipide für die Bildung von Lipoproteinen hoher Dichte freigesetzt. Bereits in den 80er Jahren wurde vermutet, dass LPL für die Energieverteilung limitierend wirkt und ihre Gewebeverteilung von Bedeutung für die Entwicklung der Adipositas ist: Gatekeeper-Hypothese (Greenwood 1984, Greenwood 1985).

Die Synthese und Sezernierung der LPL erfolgt in Parenchymzellen vieler Gewebe, vorwiegend in Herz, Lunge, Muskel und Fettgewebe (Semenkovich *et al.* 1989). An der Endotheloberfläche der Blutgefäße bindet die LPL über ionische Wechselwirkungen an Heparansulfat Proteoglykanen (HSPG), wobei eventuell ein Teil der LPL nach der Lipolyse nicht am Kapillarendothel bleibt (Saxena *et al.* 1991). LPL vermittelt vermutlich eine Bindung zwischen HSPG und Lipoproteinen (Olivecrona u. Olivecrona 1995). Daher könnten sich Lipoproteine in Rezeptornähe konzentrieren und so eine apo-E oder apo-B vermittelte Aufnahme initiieren (Mulder *et al.* 1993).

Auf Grundlage von *in vitro* gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, dass LPL die Aufnahme von Chylomikronen-Remnants in Hepatozyten und andere Zellen vermittelt (Beisiegel u. St Clair 1996, Felts *et al.* 1975).

Merkel *et al.* etablierten ein transgenes Mausmodell, das transgene inaktive und aktive LPL im Muskel nebeneinander enthielt. Diese Tiere hatten zusätzlich zur normalen Maus (m)-LPL eine muskelspezifische, 2 bis 2,5-fache Überexpression mutierter inaktiver humaner (h) LPL-Dimere ($^{156}$Asp zu Asn) mit normaler Proteoglykan-Bindung. Es konnte dabei erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass eine Verstärkung der plasmatischen TG-Hydrolyse sowie eine Organaufnahme ganzer Lipoproteinpartikel von inaktiver LPL in Anwesenheit von aktiver LPL vermittelt werden kann (Merkel *et al.* 1998). Die Studie zeigte eine Erhöhung der Muskelaufnahme von TG (1,7x), apo-B (1,8x) und Cholesterolestern (2,5x). Weiter Experimente zeigten, dass die selektive Cholesterolesteraufnahme von inaktiver LPL allein vermittelt werden kann (Merkel *et al.* 2002b).

## 5. Lipoprotein- Rezeptoren

### 5.1. Allgemeiner Aufbau

Lipoproteinrezeptoren sind Plasmamembranrezeptoren, über die eine spezifische Bindung und Aufnahme der jeweiligen Lipoproteine stattfindet. Bereits in den 70er Jahren beschrieben Goldstein und Brown den LDL-R (Brown u. Goldstein 1986). Dieser Lipoproteinrezeptor stellt den Prototyp der LDL-R-Genfamilie dar. Weiter zugehörig sind der VLDL-R (Takahashi *et al.* 1995), das LRP (Herz *et al.* 1992) sowie das Glykoprotein (gp) 330/ Megalin (Saito *et al.* 1994) und zwei

gehirnspezifische Rezeptoren. Allen Mitgliedern der LDL-R-Genfamilie ist dabei gemein, dass sie strukturell aus den folgenden fünf Domänen aufgebaut sind (Abbildung 3):

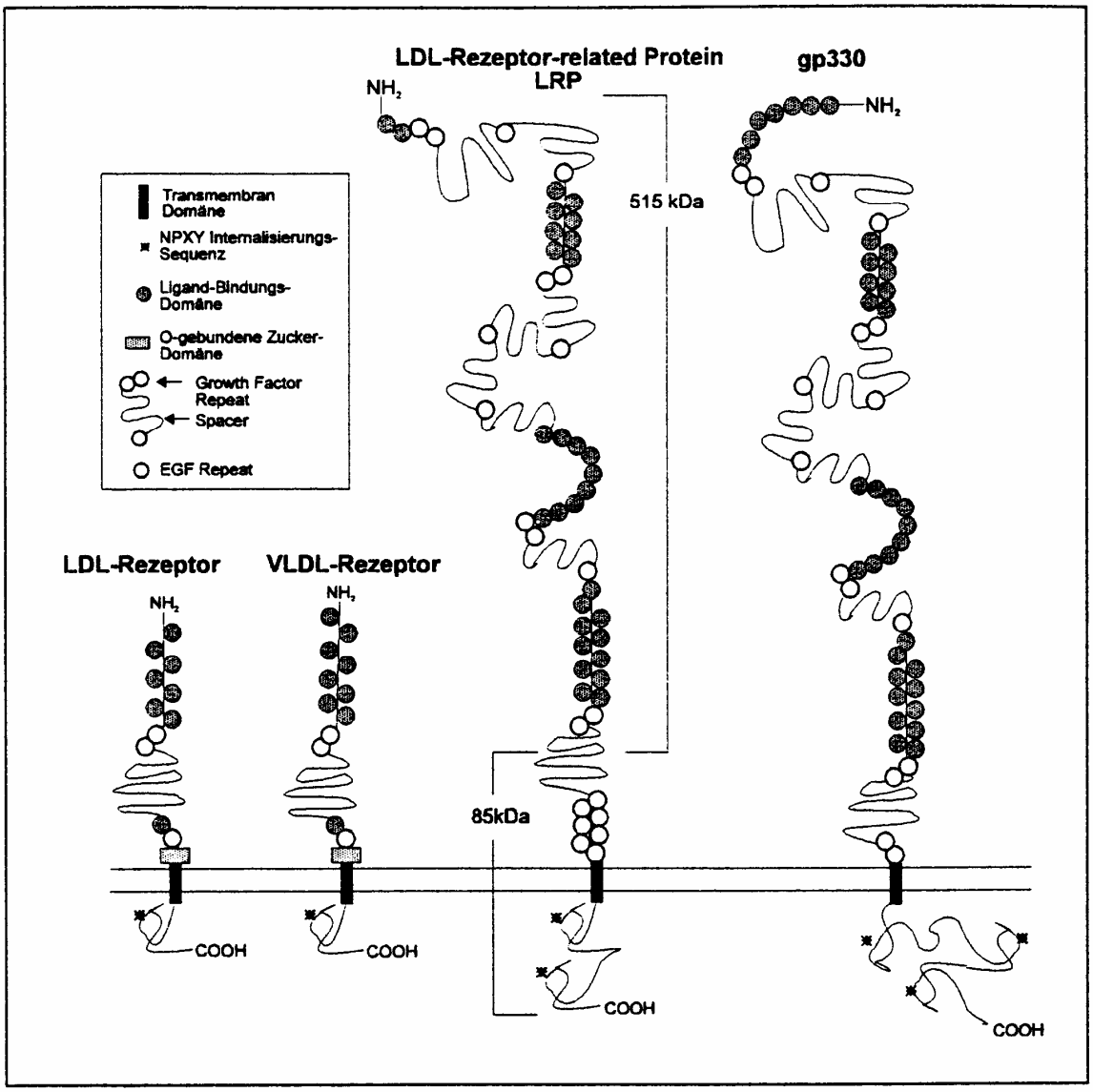



**Abb. 3: Aufbau der Rezeptoren der LDL-R-Familie.** *Die LDL-R Familie besteht aus 5 Domänen: Das aminoterminale Ende ist die ligandenbindende Domäne. Die zweite Domäne enthält drei cysteinreiche Repeats und weist eine große Homologie zur Vorstufe des epidermal growth factor (EGF Präkursor) auf. Die folgende Domäne besteht aus o-glykosidisch gebundenen Kohlenhydraten an den 18 Threonin- bzw. Serinresten. Anschließend kommt die membrandurchspannende Domäne aus 22 AS. Das carboxyterminale Ende ist für die Verankerung des Rezeptors in den sogenannten „coated pits" verantwortlich und macht die fünfte Domäne aus (Schwandt et al. 2000).*

Domäne I

Das aminoterminale Ende besteht aus einer für die verschiedenen Mitglieder der LDL-R-Familie variablen Wiederholung von 40 Aminosäuren (AS). Hier liegt die konservierte Sequenz aus jeweils

sechs Cysteinen, die durch intramolekulare Disulfidbrücken verbunden sind. Zwischen diesen cysteinreichen Sequenzen befinden sich negativ geladene AS-Reste mit der hochkonservierten Ser-Asp-Glu Sequenz (SDE). Die gesamte Struktur wird auch als „complement type repeat" bezeichnet (Stanley *et al.* 1985), weil sie homolog in einigen Komplementfaktoren existiert. An der ersten Domäne erfolgt die Ligandenbindung.

Domäne II

Die zweite Domäne weist eine große Homologie zum Vorläufermolekül des epidermalen Wachstumsfaktors „epidermal growth factor“ (EGF-Präkursor) auf, (Gray *et al.* 1983). Eine Verbindungsregion trennt diese sogenannten „growth factor repeats", die aus jeweils fünf Wiederholungen der AS-Sequenz Tyr-Trp-Thr-Asp (YWTD) bestehen. In dieser Domäne – „EGF-precursor homology domain" - erfolgt nach Endozytose die intrazelluläre, säureabhängige Dissoziation des Liganden vom LDL-R (Davis *et al.* 1987).

Domäne III

Die dritte Domäne des Rezeptors liegt ebenfalls extrazellulär. Sie enthält 18 Serin- bzw. Threonin-Reste, die o-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate tragen („o-linked sugar domain").

Domäne IV

Hier befindet sich die membrandurchspannende Domäne aus 22 hydrophoben AS, die den extrazellulären mit dem zytosolischen Bereich verbindet (Yamamoto *et al.* 1984).

Domäne V

Die intrazelluläre, carboxyterminale Domäne enthält eine bestimmte Signalsequenz, Asp-Pro-Val-Tyr (NPXY), anhand derer der Rezeptor in bestimmten Membranbereichen verankert wird. Die Sequenz ist auch am Rezeptorreycling beteiligt.

## 5.2. LDL-R

Der ubiquitär auf den Zellen vorkommende LDL-R wird als Vorläuferprotein synthetisiert und innerhalb des Golgiapparates zum funktionsfähigen Rezeptor modifiziert (Schneider *et al.* 1982, Cummings *et al.* 1983). Nach dem Transport zur Zelloberfläche konzentrieren sich die LDL-R in bestimmten, mit dem Protein Clarithin umsäumten Bereichen der Plasmamembran, den sogenannten „Clarithin-Stachelsaumgrübchen" (Anderson *et al.* 1976).

Das aminoterminale Ende besteht aus sieben homologen Segmenten mit jeweils 40 AS, die reich an Cystein und negativ geladenen AS sind. Hier wird die Bindung von apo-B100 und apo-E vermittelt. Apo-E Moleküle zeigen eine hohe Affinität zur Wiederholung 5 der Ligandenbindungsdomäne (Innerarity u. Mahley, 1978). Apo-B100 wird eine Bindung durch die Wiederholung 3-7 vermittelt. Eine chemische Modifizierung der Lysin- bzw. Arginin-Reste, z.B. durch Acetylierung (Mahley *et al.* 1980), aber auch negativ geladene Moleküle, z.B. Heparin

(Weisgraber u. Rall, 1987) oder positiv geladene Moleküle wie Proteamin (Brown *et al.* 1978) können die Interaktion beider Apolipoproteine hemmen.

Der LDL-R ist wichtig für die Aufnahme von Chylomikronen-Remnants. Das wurde sowohl in Tiermodellen (Jaeckle *et al.* 1992; Choi and Cooper, 1993) als auch beim Menschen (Everson *et al.* 1991) gezeigt. Es konnte eine verlangsamte Aufnahme von Chylomikronen-Remnants in die Maus durch Applikation von Antikörpern gegen den LDL-R gezeigt werden (Choi *et al.* 1991). Diese Beobachtung wurde an LDL-R-KO-Mäusen bestätigt (Ishibashi *et al.* 1994).

Ishibashi konnte zeigen, dass apo-B48 als Marker des Chylomikronenstoffwechsels in apo-E defizienten Mäusen stärker ansteigt als in LDL-R-defizienten Mäusen. Daraus könnte geschlossen werden, dass die Chylomikronen-Clearance durch andere Rezeptoren, vermutlich durch LRP, erfolgt (Ishibashi *et al.* 1994).

Folgende Liganden binden an den LDL-R:

-apo-B100
-apo-E
-RAP

### 5.3. VLDL-R

1992 wurde die c-DNA, die den VLDL-R kodiert, aus einem Kaninchenherz kloniert. Dieser 118 kDa Rezeptor verfügt über eine zusätzliche Domäne, so dass der VLDL-R acht Wiederholungen der cysteinreichen AS anstelle der sieben Wiederholungen des LDL-R enthält (Takahashi *et al.* 1992). Die Charakterisierung des humanen VLDL-R-Gens, das auf dem Chromosomen 9 lokalisiert ist, zeigt, dass dieser Rezeptor nahezu identisch mit dem humanen LDL-R ist. Jedoch findet man im VLDL-R-Gen in der 5´ untranslierten Region ein polymorphes Triplet der Sequenz CCG. Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der beschriebenen Sequenz und sporadischem Alzheimer in einem japanischen Kollektiv diskutiert (Okuizumi *et al.* 1995). Im Huhn konnte eine mutante Form des VLDL-R beschrieben werden, die zur frühzeitigen Arteriosklerose und zu Sterilität führt.

Der VLDL-R ist zwischen den einzelnen Spezies hochkonserviert. Es bestehen Homologien bis zu 97% beim Kaninchen und beim humanen Rezeptor. Im Kaninchen wie auch im Menschen wird der VLDL-R hauptsächlich in Herz, Muskel und Fettgewebe exprimiert. In der Leber werden nur Spuren dieses Rezeptors gefunden, so dass eine signifikante Beteiligung an der Lipoprotein-Remnants-Clearance eher unwahrscheinlich ist. Der Rezeptor scheint hauptsächlich für die Versorgung von peripheren Zellen mit Fettsäuren verantwortlich zu sein, weil VLDL-R negative Mäuse eine reduzierte Fettgewebemasse und einen reduzierten Body-Mass-Index aufweisen (Frykmann *et al.* 1995). Zahlreiche Liganden binden an den VLDL-R:

- LPL
- VLDL
- apo-E
- RAP
- apo-B48
- Thrombospondin 1
- Urokinase-Typ 1
- Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ-1 Komplex

### 5.4. LDL-R-Related-Protein

Ende der 80er Jahre gelang die Klonierung des LRP, das in seiner molekularen Form dem LDL-R sehr ähnelt (Herz *et al.* 1988). Parallel dazu wurde der $\alpha_2$-Makroglobulin-Rezeptor durch Vergleiche der jeweiligen c-DNA als LRP erkannt (Kristensen *et al.* 1990; Strickland *et al.* 1990). Die $\alpha_2$-Makroglobulin-Rezeptor/LRP-Expression erfolgt hauptsächlich in den Leberparenchym-Zellen, aber auch in Neuronalzellen des Gehirns und in den Syncytiotrophoblasten der Plazenta (Jensen *et al.* 1988).

LRP wird als Einzelstrang von 600 kDa synthetisiert und im Golgiapparat in zwei Untereinheiten von 515 und 85 kDa gespalten (Herz *et al.* 1990). Das kleinere Fragment enthält den zytoplasmatischen und den die Membran durchspannenden Bereich, der extrazellulär mit dem 515 kDa Fragment nicht kovalent assoziert ist. Der zytoplasmatische Bereich (100 AS) ist doppelt so lang wie der des LDL-R (50 AS) und enthält zwei „NPXY"-Sequenzen, die den Rezeptor zu den „Stachelsaumgrübchen" dirigieren (Chen *et al.* 1990).

Die Zugehörigkeit zur LDL-R-Gen-Familie zeigt sich auch im Vorhandensein von 31 „complement type repeats" für die Ligandenbindung. Sie sind durch mehrere Spacerregionen, die eine „YWTD"-Sequenz beinhalten, voneinander getrennt. Außerdem enthält LRP auch 22 Wiederholungen des Wachstumfaktors. Abweichend von der Struktur des LDL-R werden die charakteristischen o-glykosidisch gebundenen Zuckerreste durch 6 „epidermal growth factor“-ähnliche Wiederholungen ersetzt (Krieger u. Herz 1994).

Das LRP stellt einen wichtigen Rezeptor im Lipoproteinstoffwechsel dar. Er bindet an mehrere Proteine und braucht RAP als Chaperone und Escortprotein für die Aktivität in Leber und Gehirn (Willnow *et al.* 1994). RAP ist an der Zelloberfläche mit LRP assoziiert (Strickland *et al.* 1991) und hemmt dessen Ligandenbindung (Willnow *et al.* 1994; Herz *et al.* 1991).

Möglicherweise wird die Aufnahme von apo-E (Ji *et al.* 1993), LPL und der hepatischen Lipase (Eisenbeg *et al.* 1992) in die Zelle über LRP vermittelt, nachdem vorher die Bindung an die HSPG der Zelloberfläche erfolgte.

Neben dem LDL-R ist LRP ist ein wichtiger Rezeptor für die Chylomikronen-Remnants-Aufnahme in die Leber. Chylomikronen-Remnants akkumulieren in LDL-R negativen Mäusen, die darüber hinaus durch Anwesenheit von RAP kein voll funktionstüchtiges LRP besitzen (Willnow *et al.* 1994). Eine leberspezifische LRP-Knockout-Maus wurde entwickelt, in der es zur Anreicherung von Chylomikronen-Remnants kam. LRP negative Mausmodelle konnten zunächst nicht erzeugt werden, da LRP sehr wichtige Entwicklungsfunktionen wahrnimmt und die Embryonen sonst sterben würden (Herz *et al.* 1992). Ein pathogenetischer Zusammenhang zwischen LRP und der Genese von Arteriosklerose wird diskutiert, weil die Expression des LRP während der Differenzierung von Monozyten und Makrophagen induziert wird (Watanabe *et al.* 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Makrophagen von frühen und fortgeschrittenen Läsionen und auch glatte Muskelzellen LRP exprimieren (Luoma *et al.* 1994; Lupu *et al.* 1994).

Neben den Lipoproteinen bindet LRP zahlreiche andere Liganden:

- apo-E
- apo-B100
- apo-B48
- LPL
- Hepatische Lipase
- Gewebe-Plaminogen-Aktivator
- Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
- Urokinase
- Vitellogenin
- Saponine
- humane Schwangerschaftsprotein-Protease-Komplexe
- Gewebe-Faktor-Stoffwechsel-Inhibitor
- Thrombospondin-1
- Laktoferrin
- Pseudomonas-Exotoxin A
- humane Rhinoviren

### 5.5. gp330/ Megalin

1982 wurde das gp 330 als Heymann´s Nephritis Antigen für das hauptverantwortliche Antigen bei der Entstehung einer idiopathischen membranösen Glomerulonephritis beim Menschen beschrieben (Kerjaschki u. Farquhar, 1982). Mit ca. 600 kDa ist dieser Rezeptor der größte Vertreter der LDL-R-Gen–Familie, zu der gp 330/Megalin aufgrund seiner Strukturhomologie zu LRP gezählt wird. Der Größe wegen wurde auch der Name Megalin vorgeschlagen. Trotz des weitgehend überlappenden Ligandenspektrums zu LRP ist die Gewebsverteilung deutlich unterschiedlich. Der

Rezeptor wird im proximalen Tubulus der Niere, an den Ependymzellen (Lundgren *et al.* 1997) und in zahlreichen anderen Organen exprimiert.

## 6. RAP

RAP wurde zunächst als Komponente, die mit $\alpha_2$ MR/LRP interagiert, aus menschlicher Plazenta isoliert (Kristensen *et al.* 1990). Das heparinbindende Protein wird auch als 39 kDa Protein bezeichnet und hat nach Abspaltung einer Signalfrequenz eine Länge von 323 AS.

Normalerweise findet man RAP hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Komplex. Nur ein geringer Prozentsatz ist auf der Zelloberfläche oder in den Endosomen lokalisiert. RAP fungiert als Chaperon des LRP bei der Biosynthese, als Escortprotein während des Sekretionsstoffwechsels und als kurzzeitiger Modulator der LRP-Aktivität (Willnow *et al.* 1995). Es konnte beobachtet werden, dass RAP die Ligandenbindung von $\alpha_2$-Makroglobulin an LRP hemmt (Moestrup und. Gliemann 1991). Herz *et al.* stellten außerdem eine durch RAP gehemmte Ligandenbindung für β-VLDL, assoziiert mit apo-E, fest (Herz *et al.* 1991). In fortführenden Studien konnte gezeigt werden, dass RAP die Bindung vieler bekannter Liganden an LRP *in vitro* und *in vivo* hemmt. Außerdem wirkt es inhibierend auf die übrigen Mitglieder der LDL-R-Gen-Familie: gp 330/Megalin (Moestrup *et al.* 1993; Orlando *et al.* 1994), VLDL-R (Battey *et al.* 1994; Simonsen *et al.* 1994) und LDL-R (Medh *et al.* 1996, Medh *et al.* 1995).

Das amino- sowie das carboxyterminale Fragment des RAP binden an unterschiedliche Seiten des LRP-Rezeptors. Das carboxyterminale RAP-Fragment und das LPL-Fragment konkurrieren um die Ligandenbindungsdomäne des LRP (Nykjaer *et al.* 1994).

Es konnte weiter eine verminderte LRP-Expression in Leber und Gehirn in homozygot RAP-defizienten Mäusen gezeigt werden. Ist die Maus zusätzlich noch LDL-R negativ, akkumulieren Lipoprotein-Remnants im Plasma (Willnow *et al.* 1994).

Die beschriebenen Eigenschaften von RAP zeigen seine Eignung zur Aufklärung der LPL-vermittelten Lipoproteinrezeptor-Nutzung.

## 7. Proteoglykane

Die Proteoglykane befinden sich als anionische polymere Strukturen auf der extracellulären Matrix. Aufgebaut sind sie aus einem Kernprotein und vier Klassen einer unterschiedlichen Anzahl von Glykoaminoglykanen. Es handelt sich dabei um die Chondroitinsulfat-, die Dermatansulfat-, die Keratansulfat- und die Heparansulfat-Proteoglykane. Die Kernproteine der HSPG bestehen hauptsächlich aus Syndecan, Perlecan und Glypican. Die HSPG stehen im direkten Kontakt mit dem Blutkreislauf (Yanagishita u. Hascall, 1992), weil die ungefähr $4x10^6$ großen HSPG Moleküle

auf einem einzelnen Hepatozyten soweit aus dem Disse´schen Raum hervorragen. *In vivo* konnte durch Applikation von Heparansulfat-spaltenden Enzymen ebenfalls eine Inhibition der Aufnahme von Chylomikronen-Remnants in die Leber gezeigt werden.

## 8. Klinischer Aspekt: Familiäre kombinierte Hyperlipidämie und Arteriosklerose

Bisher wurden im LPL-Gen über 100 Mutationen gefunden, die ursächlich für Veränderungen der LPL-Aktivität sind (Goldberg u. Merkel 2001, Merkel *et al.* 2002a). Sie treten teilweise in einer Heterozygotenfrequenz von 3 bis 7 % auf (Benlian *et al.* 1996). Die Lipoproteinlipase-Defizienz ist als Ursache der Chylomikronämie bekannt. Diese seltene genetische Erkrankung ($1:10^6$ Homozygote) zeigt das klinische Bild der Typ I Hyperlipidämie nach Frederickson (Fredrickson *et al.* 1978). Die Patienten haben fehlende oder sehr niedrige LPL-Aktivität im Postheparinplasma und im Fettgewebe. Die hepatische Lipase und apo-C als Cofaktor der LPL sind normal. Zur Definition des Chylomikronämiesyndroms gehören neben TG-Werten von über 1000 mg/dl auch das Auftreten von eruptiven Xanthomen, Lipaemia retinalis und rezidivierenden Pankreatitieden.

Obligat Heterozygote haben erniedrigte LPL-Aktivität. Kommen dazu noch Faktoren wie Fettsucht oder Hyperinsulinämie, kann eine familiär kombinierte Hyperlipidämie entstehen, die mit einem erhöhten Risiko für vorzeitige koronare Herzkrankheit assoziiert ist (Brunzell 1995).

Die LPL wird aufgrund ihrer TG-senkenden Eigenschaften als anti-atherogenes Enzym eingeschätzt. Jedoch fungiert die LPL auch als Bindeglied zwischen den HSPG und den TG-reichen Lipoproteinen. Auf diese Weise könnte die LPL die Retention von Lipoproteinen in der Arterienwand und somit die Atherogenese fördern (Olivecrona u. Olivecrona 1995, Saxena u. Goldberg 1994).

## 9. Ziel der Arbeit

Klinische Studien haben gezeigt, dass Mutationen im Bereich des LPL-Gens an der Entstehung von Dyslipoproteinämien und der prämaturen Arteriosklerose mitbeteiligt sind (Merkel *et al.* 2002a). Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Funktion der LPL im Fettstoffwechsel durchgeführt.

Um die Rolle der LPL bei der Lipoproteinaufnahme weiter aufzuklären, wurde bereits in früheren Arbeiten ein Mausmodell mit transgener Expression inaktiver LPL im Muskel (Mck-N-LPL) etabliert (Merkel *et al.* 1998). Diese Tiere haben neben der normalen Maus(m)-LPL eine transgene muskelspezifische, 2 bis 2,5fache Überexpression mutierter, inaktiver humaner (h)-LPL-Dimere ($^{156}$Asp zu Asn) mit physiologischer Proteoglykanbindung. Die metabolischen Studien mit VLDL zeigten eine Erhöhung der Muskelaufnahme von TG (1,7x), apo-B (1,8x) und Cholesterolestern

(2,5x). Damit wurde erstmals gezeigt, dass die inaktive LPL sowohl ganze Lipoproteinpartikel als auch selektiv Cholesterolester in den Muskel transportieren kann (Merkel *et al.* 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Mechanismus der LPL-vermittelten Lipoproteinaufnahme *in vivo* weiter aufzuklären. Dabei wurde auf Grundlage von *in vitro* Studien postuliert, dass sowohl Rezeptoren als auch Proteoglykane an diesem Prozess beteiligt sein könnten.

Um die LPL-vermittelte nicht-enzymatische Lipidaufnahme hinsichtlich einer möglichen Rezeptorbeteiligung klären zu können, wurde der potente Lipoprotein-Rezeptor-Inhibitor RAP in normale und transgene Mäuse injiziert, um die Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel untersuchen zu können.

Eine Aufklärung der nichtenzymatischen Funktion der LPL soll dazu dienen, pathophysiologische Mechanismen von Dyslipoproteinämien wie z.B. der Familiär kombinierten Hyperlipidämie und der prämaturen Arteriosklerose besser zu verstehen. Dies ist die Voraussetzung für Früherkennung, Prävention und eine mögliche Therapie dieser schweren Erkrankungen.

# B Material und Methoden

## 1. Allgemeine Materialien

### 1.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Qualität verwendet. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Sigma Chemie, Taufkirchen, oder von Merck, Darmstadt, bezogen.

| | |
|---|---|
| Agarose | Gibco |
| Ampicillin | Behringer |
| Bromphenolblau | Merck |
| Cholesterolstandard | Sigma |
| Coomassie G250 Lösung Stock | Merck |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma |
| Dithioreitol (DTT) | Sigma |
| Eisessig | Merck |
| Ether | Chinosol |
| Ethidiumbromid | Sigma |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma |
| Glycerin | Roth |
| Heptan | Sigma |
| Histoacryl-Gewebskleber | Braun / Aesculab |
| Imidazol | Sigma |
| Isopropylthio-β-D-Galaktoside (IPTG) | Bio Tech Trade |
| Isopropanol | Merck |
| Kaliumbromid | Merck |
| LB-Agar Tablets | Sigma |
| Mercaptoethanol | Gibco |
| Methanol | Merck |
| 3-(N-Morpholino)Propansulfansäure (MOPS) | Sigma |
| Natronlauge | Merck |
| Ponceau S | Serva |
| Salzsäure | Merck |
| Schwefelsäure | Merck |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Sigma |
| Szintillationsflüssigkeit | Packard |
| Trans-1,2-Diamnocyclohexan-NNN; Tetraessigsäure (CDTA) | Sigma |
| Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris) | Sigma |
| TG-Standard | Sigma |

## 1.2. Enzyme und Proteine

| | |
|---|---|
| Bradford Reagenz | Biorad |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Merck |
| 100 bp DNA-Ladder | Invitrogen |
| E. coli Bakterien (BL 21 DL-3) | Promega |
| Enzymatischer Farbtest für Cholesterol 1489437 | Sigma |
| Enzymatischer Farbtest für TG 701912 | Boehringer |
| Oligonukleotide | Roche |
| Proteinase K | Roche |
| Rainbow Marker | Biorad |
| Taq DNA Polymerase | Gibco |

## 1.3. Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|---|
| Ausstreichösen | Elcay |
| Beta Counter-Röhrchen (Szintillationsröhrchen) | Sarstedt |
| Dialyse-Schlauch | Serva |
| Falcon Tubes | Falcon |
| Gamma Counter Röhrchen | Nunc |
| Heparinisierte Hämatokritkapillaren | Hirschmann |
| Mikrotiterplatten | Nunc |
| NI-NTA Agarose | Qiagen |
| NI-NTA Sepharose Säule | Qiagen |
| Nu Page Gel | Invitrogen |
| PCR-Röhrchen | Merck |
| Pipettenspitzen | Sarstedt |
| Reagenzgläser | Assistent |
| Zentrifugationsröhrchen | Beckmann |

## 1.4. Geräte

| | |
|---|---|
| Betacounter | Packard |
| Certomat TC 2 (Schüttler) | Biotech International |
| Elektrophoresekammer | Biorad |
| Feinwaage | Biorad |
| Gammacounter | Packard |
| Hamilton-Spritze | Hamilton |
| Heizblock Thermostat 5320 | Eppendorf |
| Laborzentrifuge Universal 16 R | Hettich |
| Mikrotiterplatten Lesegerät MRX 2 | Dynex Technologies |
| Mikrowelle | Moulinex |

| | |
|---|---|
| Multipipette | Eppendorf |
| PCR- Thermocycler TP 48 | Biometra |
| Sonifizierungsstab | Bandelin Sonopuls |
| Spektralphotometer | Perkin-Elmar |
| Utraturrax T 25 basic | IKA |
| Ultrazentrifuge mit Swing out Rotor SW 41 | Beckmann |
| Wärmeinkubator | Edmund Bühler |
| Zentrifuge-L7-55 mit LP-42 Ti Rotor | Beckmann |

## 2. Allgemeine Arbeitsmethoden

### 2.1. Sterilisation

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden in einem Autoklaven in feuchter Hitze bei 121°C und 2 bar für 30 Minuten sterilisiert. Lösungen mit hitzeempfindlichen Substanzen wurden mit einem 0,2 µm Filter sterilisiert.

### 2.2. Pufferherstellung

#### 2.2.1. BPB-Puffer

- 500 µl 10% Bromphenolblau
- 6 ml Glycerol
- 13,5 ml Aqua dest

#### 2.2.2. J´s-Puffer

Alle PCR Reaktionen sind mit der folgenden Stammlösung durchgeführt worden: 11% DMSO, 19 mM $NHSO_4$, 76,0 mM Tris pH 8,8; 7,6 mM $MgCl_2$, 11 mM DTT, 193 mg/ml BSA, 23 mM dNTP

- 5,68 ml Dimethylsulfoxid
- 0,945 ml 1M $(NH_4)_2SO_4$
- 3,8 ml 1M Tris pH 8,8 380 µl 1M $MgCl_2$
- 570 µl 1M DTT
- 9.65 ml BSA(1mg/ml)
- 115 µl dNTP

Die Reagenzien wurden gemischt und mit gefiltertem Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt.

#### 2.2.3. MOPS-SDS-Laufpuffer 20-fach

- 104,6 g MOPS
- 60,6 g Tris Base
- 10,0 g SDS
- 3,0 g EDTA

auf 500 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Der pH-Wert des 1-fach Puffers lag bei 7,3.

2.2.4. Herstellung der LB-Platten bzw. des Mediums

Platten für 1000 ml:

- 20 LB Agartabletten
- 10 ml 1M Magnesiumsulfat
- 10 ml 1M Tris pH 7,4-7,5

auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und autoklaviert. Nach leichtem Abkühlen der Lösung wurde 1 ml des 100 mg/ml Ampicillinstocks dazugegeben. Jetzt wurden die Platten durch Gießen der warmen Flüssigkeit in die Petrischalen hergestellt.

Medium für 1000 ml:

- 20 LB Broth Medium 10 ml 1M Magnesiumsulfat
- 10 ml 1M Tris pH 7,4-7,5

auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert. Wie oben beschrieben Ampicillin dazugegeben.

2.2.5. Lysispuffer zum Verdau der Schwanzbiopsie

Für eine 2-fach Konzentration wurden 480 g 8M Harnstoff langsam in ca. 150-200 ml Aqua dest. auf einer Heizplatte unter Rühren gelöst. Anschließend wurden nacheinander hinzugegeben:

- 33 ml 30% Sarkolysis
- 200 ml 1M Tris-Cl pH 8,0
- 80 ml 5M NaCl
- 40 ml 0,5 M CDTA pH 8,0.

Anschließend auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

2.2.6. SDS Probenpuffer 4-fach

- 4,00 g Saccharose
- 0,682 g Tris Base
- 0,666 g Tris HCl
- 0,800 g SDS
- 0,006 g EDTA
- 0,75 ml einer 1% serva Blue G250 Lösung (brillantblau)
- 0,25 einer 1% Phenol Rot Lösung

auf 10 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

2.2.7. Solubisationspuffer

Für 100 ml Puffer wurden 6 M Guaniniumchlorid (57,32 g) und 50 mM Tris HCl (0,605 g) in Aqua dest. gelöst und mit NaOH auf pH 8 eingestellt. Hinzu kommt 100 µl 1 M DTT (3,09 g DTT in 20 ml 0,01 M Sodiumacetat, pH 5 gelöst und durch Filtration sterilisiert). Der Puffer kann bei –20°C eingefroren werden.

2.2.8. TBE-Puffer

Für 10-fach konzentrierten Puffer wurden 108 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 in einem Liter Aqua dest. aufgelöst.

2.2.9. TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 7,6 und 1 mM EDTA pH 8,0 in 50 ml Aqua dest aufgelöst.

# 3. Tiere

## 3.1. Tierhaltung

Die verwendeten Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser und normaler Nagerdiät. Da die Tiere fast ausschließlich in der Dunkelphase fressen, wurde die zirkadiane Rhythmik durch Anpassung der Hell-/Dunkelphasen mittels Licht-Zeitschaltuhr aufrecht erhalten. Die Mäuse wurden in pathogenarmen Tierräumen gehalten und waren bezüglich des Maus-Hepatitis-Virus negativ.

Alle Tierversuche wurden von der Behörde für Umwelt und Gesundheit genehmigt bzw. bei dieser angezeigt (Aktenzeichen 20/99 und UKE-VTH Aktenzeichen A65, A66 und Org 163).

## 3.2. Mauslinien

Alle verwendeten Mausstämme lagen mit einem gemischten genetischen Hintergrund vor (CBA x C57Bl/6). Da somit keine Inzuchtstämme als Kontrollen verwendet werden konnten, wurden alle Experimente mit Geschwisterkontrollen durchgeführt, das heißt aus jeder Paarung entstanden im Durchschnitt alle zu untersuchenden Genotypen. Dies ist ein international akzeptiertes Vorgehen für metabolische Studien. Dennoch wurden alle Kreuzungsschritte - soweit möglich - mit dem Inzuchtstamm C57B1/6J durchgeführt, um schrittweise einen weitestgehend homogenen genetischen Hintergrund zu schaffen.

Die Experimente wurden ausschließlich an männlichen Tieren im Alter von 9-12 Wochen durchgeführt.

3.2.1. LDL-R-KO

Die homozygoten LDL-R-KO Mäuse wurden vom Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine U.S.A. bezogen.

3.2.2. LPL2/McK–N–LPL

Die an der Rockefeller University, New York, U.S.A., etablierte Mauslinie wurde in die Versuchstierhaltung der Universitätsklinik Eppendorf in Hamburg eingeführt. Diese Tiere besitzen ein Transgen, das enzymatisch inaktive LPL im Muskel exprimiert. Ein humanes LPL–Minigen wurde zur Herstellung des DNA–Konstruktes für die Mikroinjektion zielgerichtet mutiert. Es enthält die cDNA, Intron 3 und etwa 500 Basenpaare (bp) 3' genomische DNA. Eine Mutation führt zu dem Ersetzen der zweiten Aminosäure der katalytischen Triade der LPL ($^{156}$ASP durch ASN). $^{156}$ASP ist die einzige Aminosäure des katalytischen Zentrums der LPL, die bisher bei

Patienten mit Chylomikronämie mutiert gefunden worden ist (Ma *et al.* 1992). *In vitro* Untersuchungen ergaben, dass $^{156}$N-LPL ($^{156}$Asn-LPL) enzymatisch inaktiv ist, aber eine normale Heparin- und Lipidbindung hat (Emmerich *et al.* 1992, Krapp *et al.* 1995). Als Promotor wurde der Muskel-Kreatin–Kinase-Promotor eingesetzt, der eine organspezifische Expression des Transgens in Herz - und Skelettmuskel garantiert (Johnson *et al.* 1989).

Im Postheparinplasma wurde die $^{156}$N-LPL-Proteinmasse mittels humaner LPL Dimer-spezifischen ELISA als mehr als doppelt so hoch wie die Lipoproteinmasse des Wildtyps ermittelt (Merkel *et al.* 1998). Ohne Heparingabe wurden im Nüchternplasma sehr niedrige LPL-Proteinmassen für $^{156}$N-LPL sowie die Wildtyp-LPL ermittelt. Daher weiß man, dass nahezu 98% der plasmatischen LPL durch Heparininjektion aus der Proteoglykanbindung gelöst werden können.

Mäuse mit muskelspezifischer transgener Expression von katalytisch inaktiver LPL (Mck-N-LPL) wurden mit C57Bl/6 Mäusen gekreuzt.

## 3.3. Genotypisierung von Mauslinien

Prinzipiell erfolgt die Genotypisierung der Mäuse durch DNA–Gewinn und Reinigung aus einer Schwanzspitzenbiopsie, anschließender PCR und Analyse der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektophorese.

### 3.3.1. Entnahme des Biopsats

Zunächst wurde ein größeres abdeckbares Gefäß vorbereitet, in dem ein mit Ether getränkter Zellstoff lag. Zur Narkotisierung blieb die Maus solange in dem Gefäß, bis sie bei niedriger und tiefer Frequenz regelmäßig atmete. Ihr wurden dann 5mm der Schwanzspitze mittels Skalpell entnommen. Die Wunde wurde mit Histoacryl-Gewebekleber versorgt. Um die Maus für weitere Versuche identifizierbar zu machen, wurde sie mit einer Ohrlochzange nach dem labortypischen Schema markiert.

### 3.3.2. Tail Tip-Verdau

Um die DNA aus den Zellen zu lösen, wurde die Zellmembran durch einen Lysispuffer zerstört und die Proteine durch Proteinase K verdaut. Die Schwanzbiopsie, 400 µl 1-fach Lysispuffer und 50 µl 10 mg/ml Proteinase wurden in ein Eppendorf-Tube gegeben und über Nacht bei 55° C im Heizblock verdaut.

### 3.3.3. DNA –Extraktion

Phenol und Chloroform wurden im Verhältnis 1:1 vermischt und 400 µl davon unter die wäßrige Phase in die Eppendorf-Tubes pipettiert. So konnten die Proteine von den Nucleinsäuren getrennt werden, fielen aus und wurden dann abzentrifugiert. Nach Vortexen und fünf minütigem Abzentrifugieren bei 13.000 rpm wurde die obere Phase abgenommen und in ein neues Tube mit 1000 µl Ethanol überführt. Die genomische DNA fiel nach mehrmaligem Schütteln aus. Sie wurde nun in ein Tube mit 200 µl 1fach TE-Puffer mittels Hämatokritkapillare überführt und löste sich

dort nach 30 Minuten Stehenlassen wieder. Die genomische DNA ist bei 4° C mehrere Wochen stabil.

### 3.3.4. Mck-N-LPL-PCR

Zur Identifizierung des Transgens wurde eine 2-Primer-PCR mit einem Upstream-Primer Muskel-Kreatinin-Kinase-1 (5´-CAC AGG GGC TGC CCC CGG GTG ACA TCA AG-3´) zusammen mit einem Downstream-Primer 1977/2 (5´-CCTGTT ACC GTC CAG CCA TGG ATC ACC-3´) verwendet. Für das Mck-N-LPL-Gen wurden 477 bp erwartet. Je 1µl der Muskel-Kreatinin-Kinase-1 und 1977/2-Primer (10 pmol/µl) wurden auf 17,75 µl J´s Puffer gegeben und 0,25 µl Taq Polymerase und 4µl der genomischen DNA aus der Schwanzspitze hinzugefügt. Die Proben wurden nun für 30 Sekunden erhitzt, so dass sich der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge zerlegen konnte. Daraufhin erfolgte die Hybridisierung der Primer und die komplementäre Synthese der DNA in jeweils 35 Zyklen a` 40 Sekunden bei 94° C, 1 Minute bei 60° C und 3 Minuten bei 72° C. Als Marker wurde ein 100 bp DNA-Fragmente verwendet. Bis zur Aufarbeitung in der Gelelektrophorese wurde das PCR-Produkt bei 4° C gelagert.

### 3.3.5. Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde ein 1,5 %-iges Agarosegel verwendet. Agarose ist ein pflanzliches Polysaccharid, das im Gel netzähnliche Strukturen bildet, in dem die DNA-Fragmente ihrer Größe nach wandern. Es wurde 100 ml 1xTBE-Puffer zu 1,5 g Agarosepulver gegeben und 2 Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden 5 µl des toxischen Ethidiumbromids dazu gegeben. Das ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der die doppelsträngigen DNA-Fragmente vor der Isolierung aus dem Gel sichtbar macht. Das Gel wurde dann in eine zusammengesetzte Vorrichtung aus einem 20-Zahn-Kamm und passendem Schlitten luftblasenfrei gegossen.

War das Gel hart geworden, zog man vorsichtig den Kamm heraus, ohne die dabei entstandenen Taschen zu beschädigen. Nun wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und mit TBE Puffer Lösung aufgefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Alle PCR-Proben wurden nun mit 3 µl Bromphenolblau-Puffer (BPB) versehen und gemischt. Die Taschen wurden jeweils mit 13 µl der Probe beladen. Die erste Tasche wurde mit einem 100 bp DNA-Ladder Marker geladen, der im Verhältnis 1:10 mit BPB Puffer verdünnt war. Die folgenden Taschen wurden mit den PCR-Proben bestückt. Das Gel lief für mindestens eine Stunde bei 120 Volt und wurde anschließend unter UV-Licht fotografiert.

## 4. Lipoproteinprofil-Erstellung

Zur Bestimmung des TG- und Cholesterolgehalts wurde einzelnen Mäusen Blut abgenommen, durch sequenzielle Ultrazentrifugation in einzelne Fraktionen aufgetrennt und anschließend nach dem TG- und Cholesterol-Assayverfahren bearbeitet.

### 4.1. Blutentnahme

Den Mäusen sollte im nüchternen Zustand Blut abgenommen werden. Da die Tiere hauptsächlich in der Dunkelphase fressen, entsprach eine Futterkarenz von 6-8 Stunden tagsüber dem menschlichen Nüchternzustand.

In einer Kurzzeitnarkose mit Ether wurde den Tieren am retroorbitalen Venenplexus durch Punktion mittels heparinisierter Hämatokritkapillare Blut abgenommen. In der sich anschließenden 5-minütigen Zentrifugation bei 9000 rpm wurden die korpuskulären Anteile abzentrifugiert.

### 4.2. Lipoproteinzentrifugation

Das Blut der einzelnen Mäuse wurde jeweils in ein Röhrchen gegeben, das mit 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8) bestückt war. Anschließend erfolgte die schon oben beschriebene Zentrifugation zur Gewinnung des Serums, das in neue Tubes überführt wurde. Nun wurden 60 µl PBS mit einer Hamiltonspritze in Ultrazentrifugentubes pipettiert und 60 µl des Serums mittels Hamiltonspritze unterschichtet. In dieser Form wurde die Probe dann bei 42.000 rpm für 2,5 Stunden bei 4°C in der L7-55 Zentrifuge mit LP-42 Ti Rotor zentrifugiert. Später wurde 60 µl des Sediments abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben. Im Überstand befand sich das VLDL, das in ein neues Eppendorf-Tube gegeben wurde. Bevor eine weitere Zentrifugation bei 42.000 rpm für 6 Stunden bei 4°C durchgeführt wurde, mußte noch 60 µl Kaliumbromid-Lösung der Dichte=1,12 zugegeben und gemischt werden. Nach dieser Zentrifugation konnten 60 µl HDL vom Boden und 60 µl LDL als Überstand mit der Hamiltonsprize abgenommen und in ein neues Tube gegeben werden.

### 4.3. TG- und Cholesterol-Assay

Es handelt sich hierbei um einen enzymatischen Test, in dem die Extinktion des entstehenden Farbstoffs proportional zum TG- bzw. Cholesterolgehalt ist. Auf einer 96-Proben-Mikrotiterplatte wurde im Doppelansatz jeweils eine Standardreihe für TG und eine für Cholesterol erstellt. Die Stammlösung für TG lag in einer Konzentration von 250 mg/ml vor und wurde mit $H_2O$ auf 200, auf 150, auf 100, auf 50 und auf 0 mg/ml verdünnt.

Die Cholesterol-Verdünnungsreihe entstammt aus einer 200 ml/mg Stammlösung. Die einzelnen Verdünnungsschritte dienten der Herstellung von Konzentrationen von 200, 150, 100, 50 und 0 mg/ml.

Es wurden nun jeweils 10 µl Mausplasma aus der Ultrazentrifugation im Doppelansatz mit 10 µl TG- bzw. Cholesterolstandard vermischt und mit einer Multipipette jeweils 200 µl der fertigen TG- bzw. Cholesterolreagenz zugeben. Nachdem die so bestückten Mikrotiterplatten für 2 Minuten auf dem Schüttler standen, wurden sie für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Extinktion des entstandenen rötlichen Farbstoffs wurde bei 550 nm für TG und für 490 nm für Cholesterol gemessen.

Aus den zuvor angesetzten Standardreihen konnte nun eine Eichkurve erstellt und der Proportionalitätsfaktor bestimmt werden. Um dabei die genaue Lipidkonzentration der Probe zu bekommen, multiplizierte man den Extinktionswert der Probe mit dem Proportionalitätsfaktor.

## 5. Herstellung von RAP

### 5.1. Bakterienkultur

Dr. Moestrup (Aarhus, Dänemark) stellte ein humanes RAP-Fusionsprotein mit N-terminalen His-Tag (pT7-H6-FX-RAP, Sequenz:MGSHHHHHHSIEGR-RAP) zur Verfügung (Moestrup u. Gliemann 1991). Die Identität des Plasmids wurde durch Restriktionsverdau festgestellt. Dieses RAP-Plasmid wurde in IPTG-induzierbaren E. coli Bakterien (BL21 DL-3 Zellen) mit Ampicillin-Resistenz produziert. Zunächst wurde die E. coli Kultur mit einem 3-Ösenausstrich auf Agarplatten mit LB-Medium gebracht und über Nacht unter ständiger Bewegung bei 37°C inkubiert.

Dann wurden einzeln stehende Kolonien gepickt und in 4 ml-LB Medium mit Ampicillin überführt und ebenfalls wieder über Nacht unter ständiger Bewegung bei 37°C inkubiert. Nun erfolgte die Überführung in ein 250 LB-Medium. Unter Kontrolle der optischen Dichte ließ man das Medium bei 600 nm und 37°C bis zum Zielwert von 0,7 inkubieren und induzierte durch Zugabe von 1 ml 100 mM IPTG eine verstärkte Plasmidproduktion. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 12 Stunden bei 37°C unter ständiger Bewegung.

### 5.2. Aufbrechen der Bakterien

Die Isolierung der 250 ml Bakterienkultur geschah durch 10-minütige Zentrifugation bei 2500 rpm und Abkippen des Überstandes. Das Bakterienpellet wurde dann in 250 ml 0,9% NaCl-Lösung aufgenommen und 7 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgegossen. Jetzt erfolgte das Waschen in 250 ml PBS, die Zentrifugation bei 3000 rpm und das Abkippen des Überstandes. Die Bakterien wurden nun in das 3 bis 5-fache des Zellvolumens in Solubisationspuffer (siehe 2.2.7.) aufgenommen und ab jetzt zwischen den einzelnen Arbeitschritten auf Eis gelagert. Eine einminütige Sonifizierung der Stärke 2,5 mit einem Ultraschallstab zerstörte die Bakterienzellwand und -membran. Das Solubilisat konnte bei Minus 80°C eingefroren werden.

### 5.3. Reinigung

Die Reinigung von 3 ml Agarose erfolgte durch dreimaliges Waschen über eine NI-NTA-Sephrose-Säule mit 15 ml PBS. Gleichzeitig taute die Solubisationsprobe auf Eis auf und wurde anschließend bei 10.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und 6 ml der Solubisationsprobe zusammen mit der gewaschenen Agarose auf die NI-NTA-Sepharose Säule gegeben. Die so bestückte Polypropylen-Säule ließ man bei 4°C eine Stunde unter ständiger Bewegung inkubieren, damit sich Agarose und Protein besser aneinanderlagern konnten. Dann ließ man den Überstand über die Sephadex Säule ablaufen und wusch sie anschließend noch mit 30 ml PBS.

### 5.4. Elution

Nach Eluierung durch 3 ml 0,5 M Imidazol in PBS wurde das RAP gegen PBS dialysiert. Das Eluat wurde in einem neuen Behältnis aufgefangen.

### 5.5. Dialyse

Die Dialyse lief 18 Stunden auf einem Magnetrührer bei 4°C. Das Eluat wurde in einen Dialyse-Schlauch gegeben, der in 5 Liter PBS schwamm, welches auf 4°C abgekühlt war. Durch die Dialyse wurde das Imidazol entfernt. Das Dialysat konnte bei –80°C gelagert werden.

## 6. SDS–Polyacrylamid-Elektrophorese

SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) bindet an die meisten Proteine in einem Umfang, der der molekularen Masse der Proteine annähernd proportional ist. Die Tatsache, dass die elektrophoretische Beweglichkeit eines Proteins in Beziehung zu seiner molaren Masse steht, wird dazu benutzt, Proteine aufzutrennen.

Dazu wurde aus kommerziell erhältlichem Nu-Page-MOPS-Gel der Kamm herausgezogen, ohne dass die entstehenden Taschen beschädigt werden durften. Mittels Pasteurpipette wurden die Taschen mit 1x MOPS-SDS-Laufpuffer gewaschen, in die Gelvorrichtung mit Gegenplatte gestellt und mit dem restlichen Puffer gefüllt.

### 6.1. Vorbereitung der SDS-Proben

Die Proben für die SDS Page wurden wie folgt vorbereitet:

- 10 µl RAP Probe bzw. RAP Reinigungs-Schritt
- 3,75 µl 4x SDS Probenpuffer
- 0,75 µl β-Mercapto-EtOH
- 0,5 µl $H_2O$.

Die Proben und auch die Kontrolle wurden bei 70°C für 10 Minuten im Heizblock denaturiert, anschließend wurde das Kondenswasser herunterzentrifugiert. Das Gel wurde nun nach folgendem Schema beladen:

Rainbow Marker (3 µl), RAP-Kontrolle (5 µl), E. coli-Lysat (10 µl), Überstand nach NI-NTA-Sepharose (10 µl), Waschschritte (10 µl), aufgereinigtes RAP (10 µl)

Der Rainbow Marker ist ein farbkodierter Marker mit folgenden Molekulargewichtstandards:

| **Markerprotein** | **kDa** | **Farbe** |
|---|---|---|
| Myosin | 200 | Blau |
| Phosphorylase B | 97,4 | Braun |
| Bovines Serumalbumin | 69 | Rot |
| Ovalbumin | 46 | Gelb |
| Carboanhydrase | 30 | Orange |
| Trypsininhibitor | 21,5 | Grün |
| Lysozym | 14,3 | Magenta |

Bei einer angelegten Spannung von 200 V lief das Gel für 45 Minuten und wurde dann nach Coomassie gefärbt.

## 6.2. Färbung nach Coomassie

Der Farbstoff bindet an die Proteine und nicht an das Gel selbst.

### 6.2.1. Fixierung:

Zunächst wurde eine Fixierlösung angesetzt, die aus 50 ml 25% Isopropanol, 20 ml 10% Eisessig und 130 ml $H_2O$ bestand. In diesem Fixierbad wurde das Gel unter dem Abzug auf einen Schüttler gestellt und 10 Minuten inkubiert.

### 6.2.2. Färbung:

In diesem zweiten Schritt sollte das Gel 30 Minuten auf dem Schüttler in einer Färbelösung inkubieren, die aus 180 ml 0,06% Coomassie (G 250 Lösung Stock) und 20 ml 10%-igem Eisessig bestand.

### 6.2.3. Entfärbung:

Das Entfärben dauerte mehrere Stunden an. Währenddessen blieb das Gel auf dem Schüttler, bis es annähernd farblos war. Der Entfärber setzte sich aus 10 ml 5% Methanol, 14 ml 7% Eisessig und 176 ml $H_2O$ zusammen.

## 7. Proteinbestimmung nach Bradford

In der SDS–Page ist das Vorhandensein von RAP gesichert worden. Mit dem Verfahren nach Bradford sollte der Proteingehalt bestimmt werden. Es wurde die Absorptionsmessung mit einem Ansatz von Standardlösungen bekannter Konzentration bei festgelegter Wellenlänge durchgeführt und die Extinktion gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Die Standardlösungen sowie die Proben wurden mit Bradford Reagenz, das bei der Reaktion mit AS sein Absorptionsmaximum nach 595 nm verschiebt, umgesetzt. Eine Probe mit unbekannter Konzentration kann dann mit der Standardkurve verglichen werden.

Die Proteineichreihe wurde aus 10 µl Bovinem Serum Albumin (BSA) Standard und 90 µl NaCl 0,9% hergestellt. Man erhielt so eine Proteinkonzentration von 2 µg/µl, die bis auf 0,125 µg/µl Protein mit NaOH verdünnt wurde. Die Leerwerte wurden aus 100 µl 0,1 M NaOH gebildet. Die Probe (100 µl) und 700 µl Aqua dest. wurden mit 200 µl Bradford Reagenz versetzt und stark gevortext. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen.

## 8. Durchführung der metabolischen Lipoprotein-Studie

Es wurden zwei Chylomikronen-Komponenten radioaktiv markiert und den Mäusen in die Schwanzvene injiziert. Die Abbau-Studie, durchgeführt mit Mck-N-LPL Mäusen und Wildtyp Mäusen als Kontroll-Gruppe, erlaubte eine Bestimmung der Organaufnahme ganzer Lipoproteine und der selektiven Cholesteroletheraufnahme. Gleichzeitig konnte durch Injektion von RAP untersucht werden, ob die Lipoproteinaufnahme in die jeweiligen Organe RAP inhibierbar ist.

### 8.1. Radioaktive Markierung der Chylomikronen

Der hydrophobe Cholesterolesterkern wurde mit dem nicht abbaubaren $^{3}$H-Cholesterolether (CE) markiert, so dass nach Lipidextraktion die selektive Cholesteroletheraufnahme bestimmt werden konnte, indem die Betastrahlung gemessen wurde. Betastrahlung ist Elektronenstrahlung, die bei der Umwandlung von Atomkernen vom Kern ausgesandt wird. Diese Emission konnte durch Zugabe von Szintillationsflüssigkeit registriert werden.

Hingegen wurde bei der nicht metabolisierbaren $^{125}$Jod-Tyramin-Zellubiose ($^{125}$J-TC) markierten apo-B Komponente der Chylomikronen ionisierende Photonenstrahlung, also Gammastrahlung, gemessen. Die Proben wurden in Kassetten (racks) auf ein Transportband gestellt und über einen automatischen Probenwechsler dem Bohrloch zugeführt. Die Messung erfogte dann nach dem folgendem Prinzip: Ein NaJ-Kristall absorbiert Gammaquanten, deren Energie, die proportional zur Intensität der Gammaenergie ist, Lichtblitze erzeugt. An der Photokathode eines Sekundärelektronen-Vervielfachers werden Elektronen frei, deren Anzahl proportional zur Lichtintensität ist. Diese Primärelektrode wird über mehrere Dynoden, zwischen denen eine

positive Spannung von 100 Volt herrscht, verstärkt, so dass zwischen der letzten Dynode und der Anode ein meßbares Signal einem Impulshöhenanalysator zugeführt werden kann.

Die Betastrahlung wurde in einem Gerät mit ähnlichem Prinzip gemessen, allerdings wurden hier erst durch Zugabe von Szintillationsflüssigkeit Lichtblitze erzeugt.

Die radioaktive Markierung der Partikel wurde von Dr. J. Heeren (Institut für Medizinische Biochemie der Universität Hamburg) durchgeführt. Chylomikronen wurden gleichzeitig mit $^{3}$H-CE und $^{125}$J-TC markiert (Pittman *et al.* 1983, Pittman *et al.* 1987, Pittman u. Taylor 1986). Zur Bestimmung der Beta-Strahlung mußte eine Lipidextraktion durchgeführt werden.

Bevor die doppelt gelabelten Chylomikronen in die Maus injiziert wurden, mußte die spezifische Aktivität in beiden Fraktionen gemessen und dann miteinander kombiniert werden. Dann erfolgte die Sterifiltration und Auflösung in 100 µl Kochsalzlösung. Für 2 ml Chylomikronen, die mit $^{125}$J-TC markiert waren, ist eine typische Konzentration 30-50 x $10^3$ cpm/µl. Bei $^{3}$H-CE Markierung beträgt sie 5-10 x $10^3$ cpm/µl.

## 8.2. Versuchsablauf

Nach einer Fastenperiode von 8 Stunden wurden die Mäuse gewogen. Die Gewichte wurden notiert und die Tiere zusätzlich zu der Ohrmarkierung nochmals mit einem wasserfesten Stift am Schwanz markiert, um die Erkennung der Tiere während des Versuchs weiter zu erleichtern. Die Versuchs- bzw. Kontrolltiere wurden sodann nacheinander mit Ether narkotisiert und in eine Vorrichtung gesetzt, die eine optimale Injektion in die Schwanzvene garantiert. Nach Erwärmung des Schwanzes mit handwarmen Wasser erfolgte die Injektion von 200 µl PBS bzw. von 5 mg RAP in 200µl PBS. Waren 2 Minuten vergangen, wurden die doppelt radioaktiv-markierten Chylomikronen zu jeweils 100 µl injiziert. Die radioaktive Injektion stellte den Zeitpunkt Null da. Alle nun gemachten Zeitangaben beziehen sich darauf. Den Tieren wurde zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 5, 10, 20 und 30 min mittels kleinem Kapillarröhrchen retroorbital Blut entnommen. Das venöse Blut wurde in ein Gammacounter-Röhrchen überführt. Zum Zeitpunkt 30 min erfolgte die Organentnahme. Dazu wurden die Tiere mit Ether narkotisiert, an den 4 Gliedmaßen fixiert und mit einem langen ventralen Schnitt eröffnet. Der rechte Ventrikel wurde mit einer spitzen Schere geöffnet. Nun erfolgte die Perfusion über den linken Ventrikel. Das Gefäßsystem wurde langsam mit vorgewärmter (37°C) PBS Lösung, die 1 U Heparin/ ml enthielt, perfundiert.

Den Tieren wurden folgende Organe entnommen: Herz, Muskel, Leber, Milz, Lunge, Fettgewebe und Nieren. Die Organe wurden gewogen und in Counterröhrchen überführt.

## 8.3. Messung der Radioaktivität vor der Extraktion

Sofort nach dem Versuch wurden die Plasma- und Organproben im Gammacounter bezüglich der $^{125}$J-Aktivität zweimal für 1 Minute gemessen.

## 8.4. Lipidextraktion

Die Methode von Dole *et al.* ist auf die hier verwendeten Volumina optimiert worden (Dole 1956). Das Lipidextraktionsschema variierte leicht bei der Plasma- und Organextraktion.

Organextraktion:

Im ersten Schritt wurden die Organe aus den Counterröhrchen in stabilere Reagenzgläser überführt. Das Counterröhrchen wurde mit 400 µl PBS gespült, anschließend wurde PBS in das Reagenzglas pipettiert. Die Organproben wurden mit dem Ultraturrax vorsichtig homogenisiert. Bevor neue Proben mit dem Ultraturrax bearbeitet werden konnten, mußte dieser zunächst mit Wasser, dann mit 20 mM NaOH und schließlich mit 100% Ethanol gesäubert werden, um eine Kontamination zu vermeiden. Jetzt wurden die Proben mit 3333 µl Extraktionsmix versehen. Der Extraktionsmix setzte sich aus 78% Isopropylalkohl, 20% Heptan und 2%1 M $H_2SO_4$ zusammen. Auf höchster Stufe mußte die Probe nun 30 Sekunden gevortext und anschließend für 10 Minuten stehen gelassen werden. Zum Schluß wurden 1333 µl Heptan und 2000 µl Wasser hinzugefügt und wieder 10 Minuten inkubiert.

Im letzten Schritt wurden die gelösten Lipide aus der Oberphase abgenommen. Für die $^{3}$H-Zählung benötigte man spezielle Szintillationsröhrchen, die mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit und 100 µl der Oberphase bestückt wurden. In die Gammacounter-Röhrchen pipettierte man 200 µl der abgenommenen Oberphase.

Plasmaextraktion:

Aus den Counterröhrchen wurde 15 µl Plasma entnommen und mit 200 µl PBS versetzt. Anschließend wurde 100 µl des Extraktionsmixes (Zusammensetzung: siehe Organextraktion) hinzugefügt. Nachdem die Proben auf stärkster Stufe für 30 Sekunden gevortext waren, wurden sie 10 Minuten stehen gelassen. Dann wurde zunächst 400 µl Heptane und 600 µl Wasser hinzugefügt, nach einer Zeit von 10 Minuten 300 µl der Oberphase in ein Szintllationsröhrchen gegeben und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versehen. Diese Probe wurde später im Betacounter gemessen. Für den Gammacounter wurden 100 µl der Oberphase entnommen und in die entsprechenden Röhrchen überführt.

## 8.5. Messung der Radioaktivität nach der Extraktion

Die $^{125}$J-Zählung erfolgte einmal für jeweils eine Minute im dafür vorgesehenen Gammacounter. Der Betacounter maß die Aktivität der $^{3}$H-Strahler zweifach für jeweils 2 Minuten. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass weniger als 5% des J lipidgebunden vorlag. Trotzdem wurde nach der Lipidextraktion neben der $^{3}$H-Strahlung auch die $^{125}$J-Strahlung gemessen, um eine Qualitätskontrolle der sauberen Extraktion zu erhalten.

# C Ergebnisse

## 1. RAP-Produktion

Die RAP-Herstellung *in vitro* und die Charakterisierung des RAP-Stoffwechsels wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Frau cand. med. T. Behrens etabliert.

Das RAP-Plasmid wurde in einer E. coli Bakterienkultur produziert und schließlich aus einem LB-Medium mit Ampicillin isoliert. Nach Reinigung und Eluierung mittels Imidazol wurde das RAP gegen PBS dialysiert. Anschließend wurde mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen, ob wirklich RAP hergestellt wurde. Die Anfärbung erfolgte nach Coomassie.

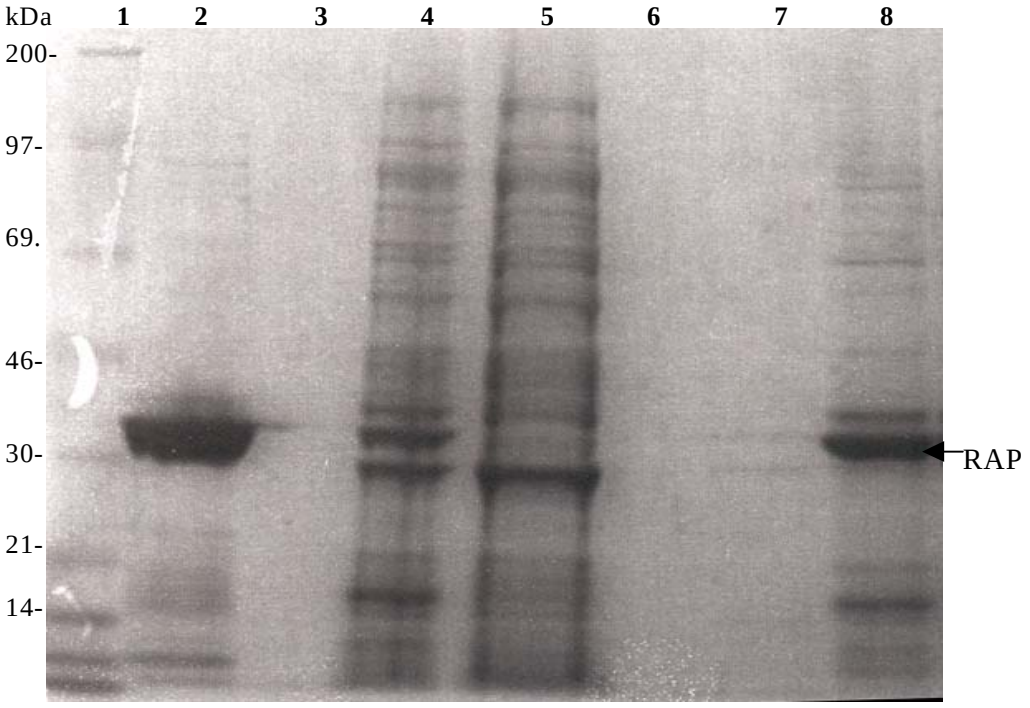



**Abb. 4: RAP-Reinigungsschritte auf einem 10%igen SDS-Gel gefärbt nach Coomassie.**

*Die Gelelektrophorese zeigt 8 Spuren, die von links nach rechts beladen wurden: 1: Rainbow Marker (3 µl), 2: RAP-Kontrolle: Dr Moestrup (5 µl), 3: unbeladene Spur, 4: E. coli-Lysat (10µl), 5: Überstand nach NI-NTA-Sepharose (10µl), 6 und 7: Waschschritte (10 µl), 8: Aufgereinigtes RAP (10 µl). Die Marker (Einheiten in kDa) waren: Myosin 200, Phosphorylase B: 97,4, BSA 69, Ovalbumin 46, Carboanhydrase 30, Trypsininhibitor 21,5, Lysozym 14,3.*

In der vorliegenden Arbeit konnte die RAP-Herstellung optimiert werden, indem die Reinigungsschritte verändert wurden, so dass größere Mengen des Proteins hergestellt werden konnten. Während zuvor die Reinigung durch Zentrifugation und Waschen des NI-NTA-Sepharose gebundenen Proteins mit PBS versucht wurde, wurde jetzt das Proteingemisch zusammen mit

Agarose über eine NI-NTA-Sepharose-Säule deutlich schneller und effizienter gereinigt. In diesem Verfahren konnten 30 ml hochgereinigtes Protein hergestellt werden, dass eine Konzentration von 39 mg/ml hatte. Die Aufreinigung des Proteins lässt sich in den einzelnen Spuren in Abbildung 4 gut verfolgen. Ganz rechts außen stellt sich die stark verdickte Bande bei 39 kDa dar, so dass es mit dem Molekulargewicht von RAP in der Kontrolle übereinstimmt. Zusätzlich wurde durch Herrn Dr. rer. nat. J. Heeren die Identifikation des RAP durch einen Western-Blot mit speziellem His-Taq Antikörper und *in vitro* Zellkulturen bestätigt.

## 2. Lipoproteinprofil von LDL-R-KO Mäusen nach RAP-Injektion

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit RAP die VLDL-Plasma-Konzentration in Mäusen verändert. Die einzelnen Lipoproteinfraktionen wurden bei LDL-R-KO Mäusen mit normaler LPL-Aktivität unter RAP- beziehungsweise PBS-Wirkung untersucht. Bei Injektion von 1 mg RAP und einer Halbwertszeit von 6 min war nach 30 min noch eine Plasmakonzentration von >40 µg/ml zu erwarten, die bei adenoviraler Expression einen deutlichen TG-Anstieg und einen langsameren Chylomikronenabbau erreichen konnte (Willnow *et al.* 1994).

Zur Überprüfung wurde jeweils 3 Tieren nach einer nüchtern Blutentnahme zum Zeitpunkt 0 min 5 mg (200 µl 25 mg/ml) His-RAP bzw. PBS injiziert. Anschließend erfolgten nach 30, 60 und 120 Minuten erneute Blutentnahmen und die entsprechenden Plasma-Separationen durch Zentrifugation. Die anschließende Lipoproteinzentrifugation trennte die einzelnen Fraktionen auf, der TG- und Cholesterolgehalt der Proben wurde in mg/dl gemessen.

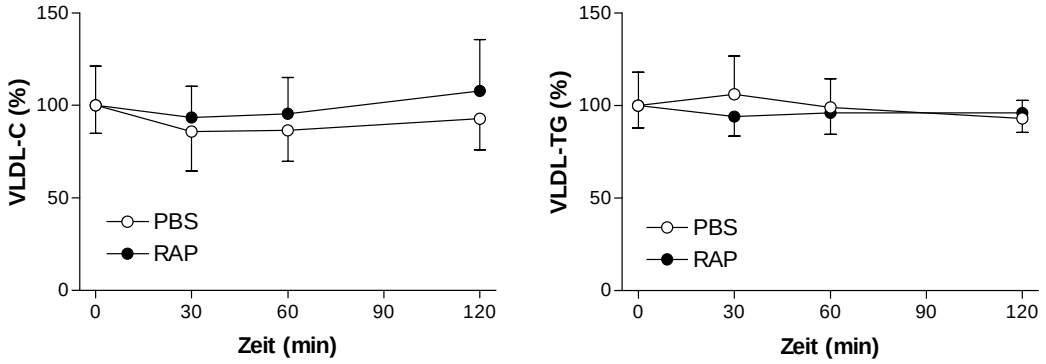



**Abb. 5: TG- und Cholesterol-Plasmaspiegel in der VLDL-Fraktion, RAP und PBS im Vergleich.** *Der Wert zum Zeitpunkt 0 min stellt den VLDL-TG- bzw. Cholesterolgehalt(C) unmittelbar vor der RAP/PBS Injektion in LDL-R-KO-Mäuse dar (100%). Die folgenden Werte sind Mittelwerte, die sich auf Änderungen des VLDL-TG- und Cholesterolgehalts nach der Injektion beziehen.*

In der Abbildung 5 stellt sich der VLDL-Cholesterolspiegel als kaum verändert durch PBS dar (30 min: 25,0+/-10,2 mg/dl; 60 min: 25,2+/-8,4 mg/dl; 120 min: 27,0+/-8,3 mg/dl). Dagegen zeigte sich unter RAP ein sehr diskreter, jedoch nicht signifikanter VLDL-Cholesterol Anstieg (30 min: 27,6+/-8,4 mg/dl; 60 min: 28,2+/-10,0 mg/dl; 120 min: 31,8+/-14,11 mg/dl).

Der VLDL-TG-Gehalt des Plasmas blieb ebenfalls relativ konstant nach PBS-Injektion (30 min: 77,3+/-26,4 mg/dl; 60 min: 72,4+/-19,8 mg/dl; 120 min: 67,7+/-12,4 mg/dl). Die TG-Werte nach RAP-Injektion lagen während der gesamten Messungszeit unter den PBS-Werten (30 min: 55,4+/-10,8 mg/dl; 60 min: 56,3+/-11,8 mg/dl; 120 min: 56,7+/-10,9 mg/dl) ohne wesentliche Änderung über die Zeit.

In den HDL- und LDL-Fraktionen zeigten sich keine besonderen Veränderungen bezüglich des Cholesterol- und TG-Gehalts.

## 3. Metabolische Studie mit RAP (30 min Laufzeit)

Nach entsprechender Vorbereitung wurde den Tieren (4 Tiere in der WT- und 5 Tiere in der Mck-N-LPL-Gruppe) jeweils 200 µl PBS bzw. 5 mg RAP in 200 µl PBS injiziert. Nach 2 Minuten erfolgte die Injektion von 100 µl der mit $^{125}$J-TC- und $^{3}$H-CE markierten Chylomikronen über die Schwanzvene. Der Moment der radioaktiven Injektion stellte den Zeitpunkt Null dar.

### 3.1. Plasma-Turnover von Chylomikronen

Zu den in der Graphik 6 angegeben Zeiten wurde den Mäusen retroorbital venös Blut abgenommen und direkt im Anschluss die Aktivität der $^{125}$J-Strahler im Gammacounter gemessen.

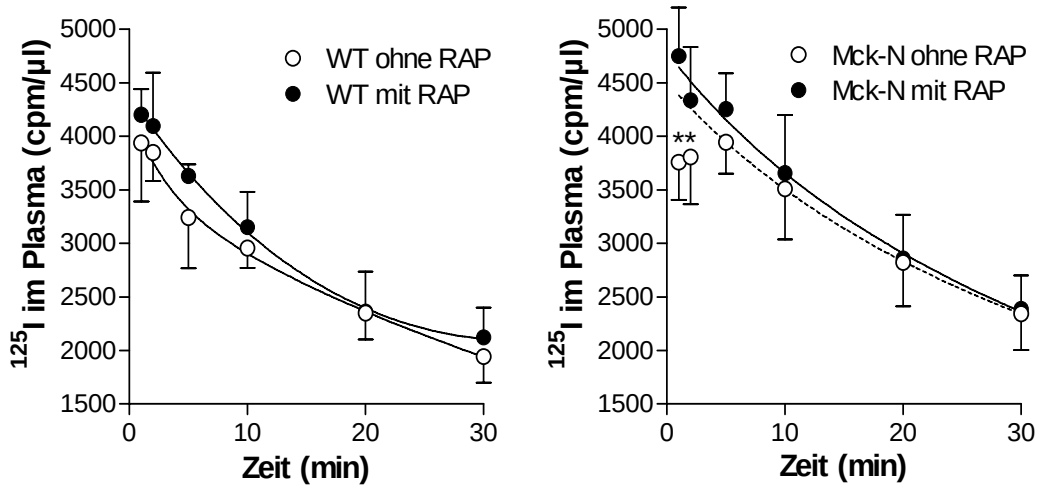



***Abb. 6: Abhängigkeit der Serumkonzentration von $^{125}$J in WT und Mck-N-LPL-Tieren ohne und mit RAP.*** *Injektion von $^{125}$J-TC-markierten-Chylomikronen in 4 WT und 5 Mck-N-LPL-Tiere jeweils ohne und mit RAP. Dargestellt ist die entsprechende Serumkonzentration von $^{125}$J in cpm/µl in Abhängigkeit von der Zeit, * p<0,005 im Student´s-Test. Die Daten sind als Mittelwert +/-SD angegeben. Die durchgezogene Linie kennzeichnet den biphasischen exponentiellen, die gestrichelte Linie den nicht exponentiellen Abbau der Chylomikronen.*

Der 1 min Wert zeigte bei den WT-Tieren ohne RAP geringere $^{125}$J-Plasmakonzentrationen (WT: 3941+/-549 cpm/µl; WT+RAP: 4203+/-237 cpm/µl). Gleiches galt für den 2 min Wert (WT: 3850+/-265 cpm/µl; WT+RAP: 4097+/-495 cpm/µl). Auch der 5 min Wert zeigte höhere Plasmacounts bei den WT-Tieren unter RAP-Einfluß (WT: 3242+/-475 cpm/µl; WT+RAP: 3630+/-109 cpm/µl). Dieser Trend setzte sich bei der 10 min-Messung fort (WT: 2956+/-185 cpm/µl; WT+RAP: 3151+/-332 cpm/µl). Zum Zeitpunkt 20 min überschnitt sich die WT ohne-RAP-Kurve mit der WT-mit-RAP-Kurve, so dass hier die Serumkonzentration von $^{125}$J fast gleich war (WT: 2349+/-248 cpm/µl; WT+RAP: 2363+/-371 cpm/µl). Nach 30 min wurde wieder die Serumkonzentration gemessen (WT: 1945+/-245 cpm/µl; WT+RAP: 2124+/-276 cpm/µl). Der Plasma-Abbau von $^{125}$J-TC-Chylomikronen bei WT-Tieren war also unter RAP-Einfluss langsamer (Kurve liegt höher) als der ohne RAP. Entsprechend wurde der Abbau von Chylomikronen durch RAP wohl etwas verzögert; die Unterschiede wurden aber nicht signifikant.

Bei den Mck-N-LPL-Tieren waren die Konzentrationsunterschiede zu Beginn (1 min) signifikant (Mck-N-LPL: 3760+/-354 cpm/µl; Mck-N-LPL+RAP: 4760+/-453 cpm/µl; p<0,005 im Student´s t-Test). Signifikante Werte waren auch bei 2 min zu sehen (Mck-N-LPL: 3808+/-442 cpm/µl; Mck-N-LPL+RAP: 4336+/-500 cpm/µl; p<0,005 im Student´s t-Test). Die Plasmakonzentrationen der beiden Gruppen näherten sich beim 5 min-Wert an (Mck-N-LPL: 3946+/-295 cpm/µl; Mck-N-LPL+RAP: 4254+/-333 cpm/µl). Zum Zeitpunkt 10 min waren die Plasmawerte nahezu identisch (Mck-N-LPL: 3612+/-477 cpm/µl; Mck-N-LPL+RAP: 3656+/-543 cpm/µl). Auch bei dem 20 min

Wert waren die Plasmacounts sehr ähnlich (Mck-N-LPL: 2823+/-411 cpm/µl; Mck-N-LPL+RAP: 2861+/-408 cpm/µl). Gleiches galt auch für die 30 min Meßwerte (Mck-N-LPL: 2345+/-338 cpm/µl; Mck-N-LPL+RAP: 2389+/-312 cpm/µl). Die Verstoffwechselung der Chylomikronen der Mck-N-LPL-Tiere ohne RAP folgte keinem exponentiellen Abbau, im Gegensatz zu den Vergleichsgruppen. Dort wurden die Chylomikronen mit zwei verschiedenen Halbwertszeiten verstoffwechselt und folgten einem biphasischen exponentiellen Abbau nach der Formel: $Y=a*e^{-\kappa 1*x}+b*e^{-\kappa 2*x}+c$ (Aalto-Setala *et al.* 1994, Aalto-Setala *et al.* 1992).

Während sich bei den WT-Tieren nur ein genereller Trend zum langsameren Abbau der apo-B-Komponente unter RAP-Einwirkung andeutete, zeigte sich ein signifikanter Unterschied (siehe Markierung: *) bei den Mck-N-LPL-Tieren, die unter RAP-Einwirkung eine deutlich höhere $^{125}$J-TC-Serumkonzentration als die Vergleichsgruppe aufwiesen.

In der Abbildung 6 wurde eine durchgezogene Linie für den biphasischen exponentiellen Abbau der Chylomikronen mit RAP bei WT und Mck-N-LPL-Tieren und eine gestrichelte Linie für die Mck-N-LPL ohne RAP mit einem nicht–exponentiellen Abbau verwendet.

### 3.2. Chylomikronenaufnahme in Organe

30 Minuten nach der oben beschriebenen Injektion von 100 µl der doppelt markierten Chylomikronen erfolgte die Organentnahme und die Messung der $^{125}$J-Strahlung in cpm/mg. In Abbildung 7 ist die Aufnahme von radioaktiv markierten Chylomikronen in die unterschiedlichen Organe dargestellt.

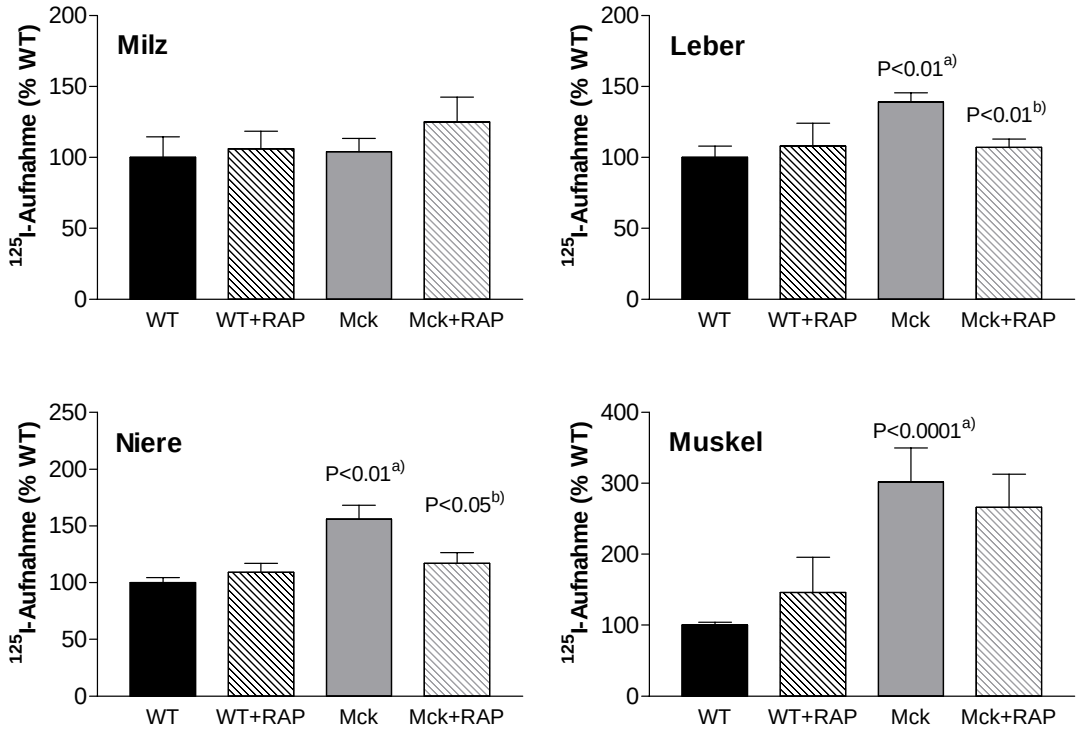



***Abb.7: Organaufnahme $^{125}$J-markierter Chylomikronen nach 30 min bei WT und Mck-N-LPL Tieren jeweils ohne und mit RAP Einwirkung.*** *Nach RAP- bzw. PBS-Injektion erfolgte 2 min. später die Injektion von doppelt radioaktiv markierten Chylomikronen. Die Organentnahme wurde nach 30 min durchgeführt. Alle Daten wurden als % der WT-Gruppe angegeben; Mittelwert +/-SD. a) Signifikanz gegenüber dem WT-Tier, b) Signifikanz gegenüber der Gruppe gleichen Genotyps ohne RAP.*

Bei der $^{125}$J-Aufnahme in die Milz zeigten sich mit und ohne RAP kaum Konzentrationsdifferenzen zwischen WT- und Mck-N-LPL-Tieren (WT: 1267+/-374 cpm/mg; WT+RAP: 1338+/-318 cpm/mg). Lediglich in der Mck-N-LPL-Maus mit RAP wurde im Vergleich zu der WT-Gruppe und der Mck-N-LPL-Maus ohne RAP eine nicht signifikant höhere Konzentration von $^{125}$J gemessen (Mck-N-LPL: 1315+/-235 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 1584+/-572 cpm/mg).

In der Leber zeigten sich nur geringe Unterschiede in der WT-Gruppe (WT: 833+/-133 cpm/mg; WT+RAP: 899+/-267 cpm/mg). Allerdings wurde eine 1,4fach verstärkte Chylomikronenaufnahme

in den Tieren mit inaktiver Muskel-LPL deutlich, die gegenüber dem WT-Tier signifikant war (Mck-N-LPL: 1156+/-107 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 887+/-97 cpm/mg; $p<0,01$). Die durch inaktive transgene LPL erhöhte Chylomikronenaufnahme wurde durch RAP komplett inhibiert, so dass der Unterschied signifikant gegenüber der Gruppe gleichen Genotyps ohne RAP ($p<0,01$) war.

In der Niere zeigten sich bei den WT-Tieren keine Unterschiede zwischen Vorhandensein bzw. Fehlen von RAP bezüglich des Chylomikronenstoffwechsels (WT: 211+/-19 cpm/mg; WT+RAP: 229+/-33 cpm/mg). Dagegen bewirkte die transgene inaktive Muskel-LPL eine signifikant erhöhte $^{125}$J-Konzentration verglichen mit dem WT (Mck-N-LPL: 329+/-51 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 246+/-40 cpm/mg; $p<0.01$). Außerdem verringerte RAP signifikant die Chylomikronenaufnahme gegenüber Mck-N-LPL-Tieren ohne RAP ($p<0,05$). Bei der Chylomikronenaufnahme in den Muskel von WT-Tieren stellten sich mit und ohne RAP keine nennenswerten Unterschiede ein (WT: 6,4+/-0,5 cpm/mg; WT+RAP: 9,3+/-3,2 cpm/mg). Die größte Differenz der Chylomikronenaufnahme zeigte sich zwischen WT- und Mck-N-LPL-Tieren. Bei den transgenen Tieren war die Aufnahme der $^{125}$J- markierten Chylomikronen um das 2,8fache erhöht im Vergleich zum WT (Mck-N-LPL: 19,2+/-3,1 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 16,9+/-3 cpm/mg, $p<0.0001$). Diese Aufnahme war durch RAP nicht inhibierbar.

## 4. Metabolische Studie mit RAP (10 min Laufzeit)

Unter der Vorstellung, dass über 30 min keine ausreichende RAP-Konzentration erreicht wurde, ist eine zweite Studie mit 10 min Laufzeit durchgeführt worden.

Insgesamt 26 Tieren wurde jeweils 200 µl PBS bzw. 5 mg RAP in 200 µl PBS injiziert. Nach 2 min erfolgte die Injektion der mit $^{125}$J-TC und $^{3}$H-CE markierten Chylomikronen (100 µl) in die WT- und Mck-N-LPL-Mäuse über die Schwanzvene. Die Injektion der Radioaktivität stellte den Zeitpunkt Null dar.

### 4.1. Plasmaturnover von Chylomikronen

Zu den Zeitpunkten 2 min und 10 min wurde den WT- und Mck-N-LPL-Tieren nach der Injektion der radioaktiv markierten Chylomikronen venös Blut entnommen (15 µl) und anschließend die Gammastrahlung der $^{125}$J-TC-markierten Chylomikronen im Plasma gemessen. Die $^{3}$H-Betastrahlung im Plasma konnte erst nach Lipidextraktion nach Dole bestimmt werden. Wichtig war auch hier der Einfluss, den RAP auf die Chylomikronenkonzentration im Plasma ausübte.

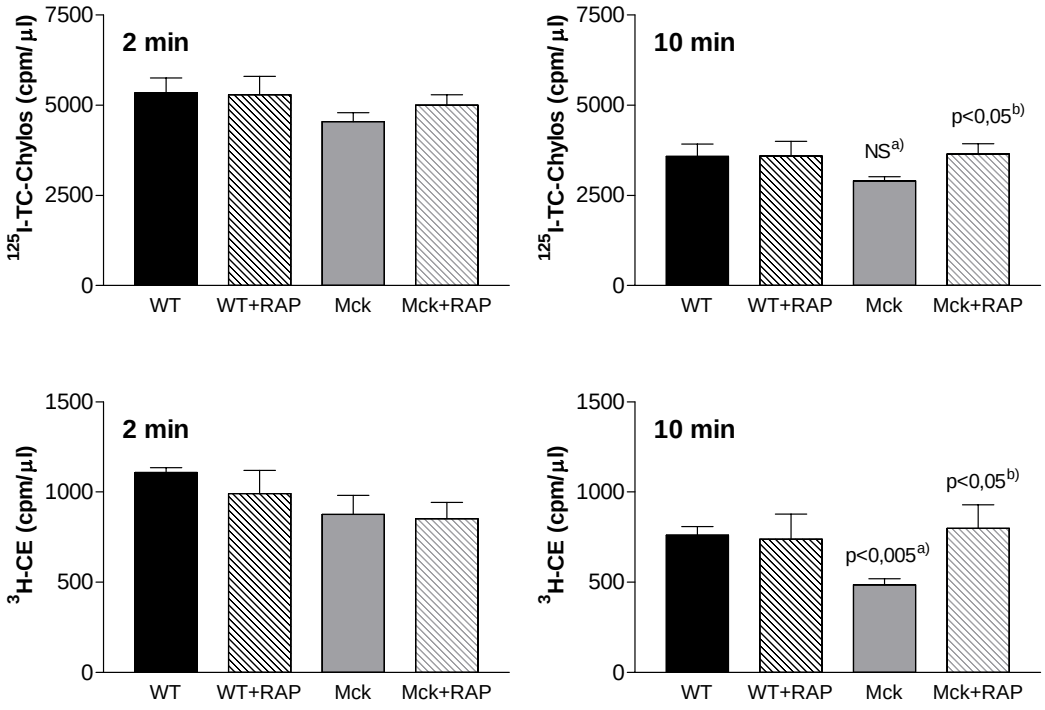



**Abb. 8: $^{125}$J- und $^{3}$H-Konzentration (cpm/µl) im Plasma jeweils 2 und 10 min nach Injektion in WT- und Mck-N-LPL-Tiere.** *2 min nach RAP- bzw. PBS-Injektion erfolgte die Injektion von doppelt radioaktiv markierten Chylomikronen. Die oberen zwei Abbildungen zeigen die $^{125}$J-Plasma-Counts nach 2 und 10 min. Die unteren zwei Abbildungen stellen die $^{3}$H-Aktivität der 2 und 10 min Plasmawerte nach Lipidextraktion dar. Die Daten wurden als Mittelwert +/- SD angegeben. a) Signifikanz gegenüber dem WT-Tier, b) Signifikanz gegenüber der Gruppe gleichen Genotyps ohne RAP.*

Abbildung 8 zeigt, dass der $^{125}$J-Gehalts des Plasma nach 2 min bei den WT-Tieren jeweils ohne und mit RAP-Einfluss annähernd gleich war (WT:5341,4+/-1173,9 cpm/µl; WT+RAP: 5287,6+/-1508,1 cpm/µl). Im Vergleich zum WT waren leicht geringere Plasma-Counts bei den Mck-N-LPL-Tieren zu verzeichnen (Mck-N-LPL: 4536,5+/-513 cpm/µl; Mck-N-LPL+RAP: 4999+/-644 cpm/µl). Signifikant höhere $^{125}$J–Counts waren bei den Mck-N-LPL-Tieren nach RAP-Injektion im Vergleich zum Genotyp ohne RAP bei den 10 min Plasmawerten zu sehen (Mck-N-LPL: 2894,5+/-242,0 cpm/µl; Mck-N-LPL+RAP: 3649+/-618 cpm/µl, $p<0,05$). Bei Betrachtung der Mck-N-LPL-Tiergruppe fielen geringere $^{125}$J-Werte in den 10 min Plasmawerten auf, die aber im Vergleich zu den WT-Tieren nicht signifikant waren (WT: 3578,4+/-973,2 cpm/µl; WT+RAP: 3578,2+/-1228,7 cpm/µl).

Ebenso wie bei den 2 min Plasmawerten der $^{125}$J-Counts wurden bei den WT-Tieren ohne und mit RAP im 2 min Plasma relativ ähnliche $^{3}$H-Counts gemessen (WT: 1108+/-48 cpm/µl; WT+RAP: 990+/-258 cpm/µl). Im Plasma der Mck-N-LPL-Mäuse fanden sich nach der gleichen Zeit insgesamt geringere $^{3}$H-Counts (Mck-N-LPL: 876+/-210 cpm/µl; Mck-N-LPL+RAP: 853+/-201 cpm/µl).

Die 10 min-Plasmacounts der $^{3}$H-Werte zeigten signifikante Differenzen zwischen den Mck-N-LPL Tieren ohne und mit RAP-Wirkung. Die Gruppe, die unter RAP-Einfluss stand, zeigte deutlich höhere $^{3}$H-Counts im Plasma (Mck-N-LPL: 485+/-68 cpm/µl; Mck-N-LPL+RAP: 798+/-295 cpm/µl, $p<0,05$). Bei den Mck-N-LPL-Tieren ohne RAP-Injektion fielen deutlich geringere $^{3}$H-Konzentrationen im Plasma im Vergleich zu den WT-Tieren auf (WT: 760+/-86 cpm/µl; WT+RAP: 739+/-278 cpm/µl). Der Unterschied wurde mit $p<0,005$ signifikant.

## 4.2. Chylomikronenaufnahme in Organe

Bei allen Tieren wurden nach Ablauf von 10 min, gerechnet vom Zeitpunkt der Injektion der Radioaktivität, die Organe entnommen und die Proben der $^{125}$J-Messung zugeführt. Die Ergebnisse dieser metabolischen Studie werden in Abbildung 9 zusammengefaßt:

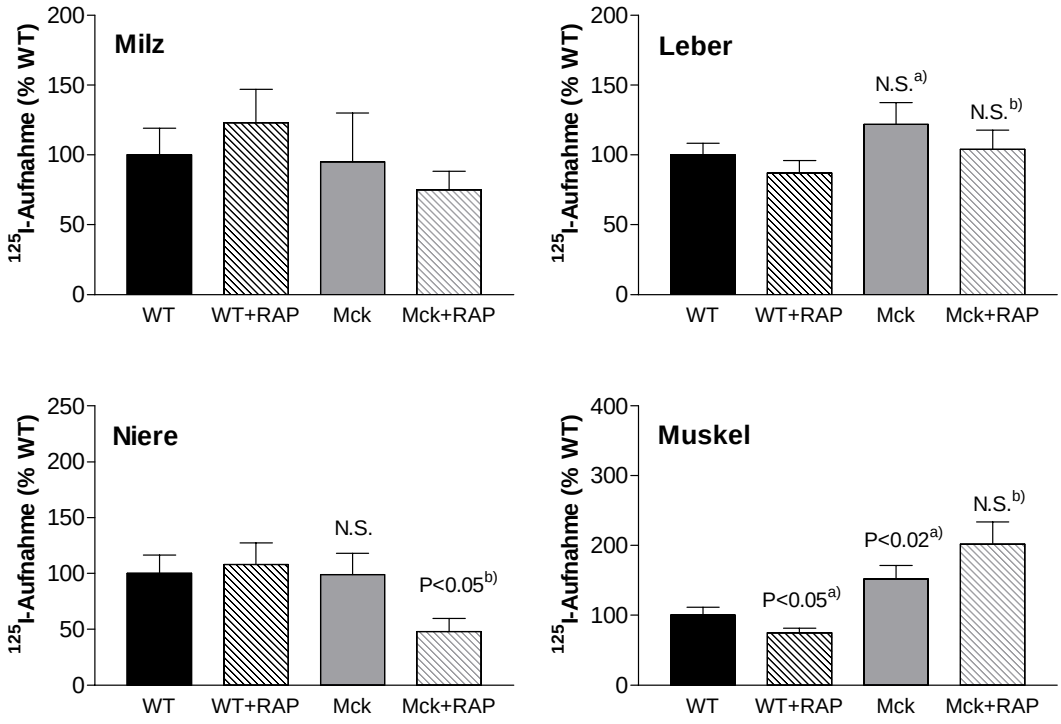



***Abb. 9: Organaufnahme $^{125}$J-markierter Chylomikronen nach 10 min bei WT- und Mck-N-LPL-Tieren jeweils mit und ohne RAP Einwirkung.*** *2 min nach RAP- bzw. PBS-Injektion erfolgte die Injektion von doppelt radioaktiv markierten Chylomikronen. Die Organentnahme wurde nach 10 min durchgeführt. Alle Daten wurden als % der WT-Gruppe angegeben; Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwerts), so dass die Tierzahl n der jeweiligen Versuchsgruppe mit in die Standardabweichung einbezogen ist; a) Signifikanz gegenüber dem WT-Tier, b) Signifikanz gegenüber der Gruppe gleichen Genotyps ohne RAP.*

In der Milz zeigte die Kontrollgruppe unter RAP-Wirkung die höchste $^{125}$J-Aufnahme (WT: 167638+/-90360 cpm/mg; WT+RAP: 206152+/-114854 cpm/mg), während die Mck-N-LPL-Tiergruppe geringere $^{125}$J-Konzentrationen in der Milz präsentierte (Mck-N-LPL: 159155+/-117064 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 126299+/-49990 cpm/mg). Allerdings ist die Abweichung innerhalb dieser Gruppe so groß, dass keine hinweisende Aussage getroffen werden konnte.

Dagegen wurde die vermehrte Aufnahme der markierten apo-B Komponente der Chylomikronen in die Leber bei den Mck-N-LPL-Tieren ohne RAP deutlich (Mck-N-LPL: 158918+/-40005 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 135051+/-40737 cpm/mg). Aber der Unterschied zum WT-Tier war auch hier nicht signifikant (WT: 130179+/-31129 cpm/mg; WT+RAP: 113496+/-33042 cpm/mg). Die Mck-N-LPL-Maus mit RAP-Einwirkung zeigte eine verminderte, jedoch nicht signifikante Aufnahme der Chylomikronen im Vergleich zur Mausgruppe gleichen Genotyps ohne RAP.

Signifikante Unterschiede ergaben sich bei der Aufnahme in die Niere zwischen den Mck-N-LPL-Tieren mit und ohne RAP (Mck-N-LPL: 13535+/-8081 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 12363+/-4157 cpm/mg, $p<0,05$). Mit einer Signifikanz von $p<0,05$ wurde die Chylomikronen-Aufnahme in die Niere durch RAP gehemmt. Vergleicht man die WT- und die Mck-N-LPL-Mäuse miteinander, sind die Unterschiede allerdings nicht signifikant (WT: 20777+/-9674,8 cpm/mg; WT+RAP: 19563+/-14415 cpm/mg).

Die $^{125}$J-Aufnahme in den Muskel wurde beim WT-Tier mit RAP gegenüber dem WT-Tier ohne RAP deutlich gehemmt (WT:2725+/-896,7 cpm/mg; WT+RAP: 2116+/-497 cpm/mg, $p<0,05$). Im Vergleich der Mck-N-LPL- mit den WT-Tieren fiel eine $p<0,02$ signifikant höhere $^{125}$J-Verstoffwechselung bei den Mck-N-LPL-Tieren auf (Mck-N-LPL:4152+/-1060 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 5496+/-1923 cpm/mg). In der Mck-N-LPL-Gruppe mit und ohne RAP war unter RAP-Wirkung eine höhere Organaufnahme zu sehen, die aber nicht signifikant wurde.

### 4.3. Cholesteroletheraufnahme in Organe

10 min nach radioaktiver Injektion erfolgte die Organentnahme, anschließend die Lipidextraktion nach Dole sowie zum Schluss die Messung der $^{3}$H-Strahlung im Beta-Counter.

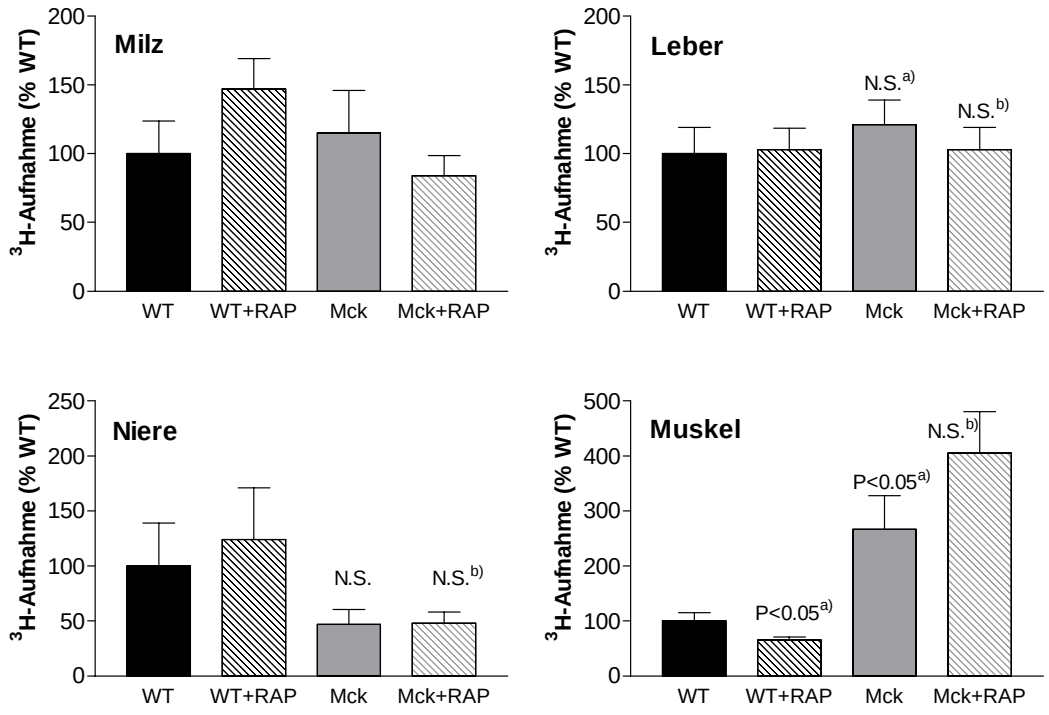



**Abb. 10: Selektive Cholesterolether-Organ-Aufnahme $^{3}$H-markierter Chylomikronen der WT- und Mck-N-LPL-Tiere mit und ohne RAP.** *2 min nach RAP- bzw. PBS-Injektion erfolgte die Injektion von doppelt radioaktiv markierten Chylomikronen. Die Organentnahme wurde nach 10 min durchgeführt. Alle Daten wurden als % der WT-Gruppe angegeben; Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwerts), so dass die Tierzahl n der jeweiligen Versuchsgruppe mit in die Standardabweichung einbezogen wurde; a) Signifikanz gegenüber dem WT-Tier, b) Signifikanz gegenüber der Gruppe gleichen Genotyps ohne RAP.*

Die höchste $^{3}$H-Aufnahme in die Milz lag im WT-Tier unter RAP-Wirkung vor (WT: 87627+/-36028 cpm/mg; WT+RAP: 128826+/-38606 cpm/mg). Im Vergleich mit den anderen Tiergruppen, ergaben sich keine hinweisenden Unterschiede. Das lag wahrscheinlich auch an der relativ großen Standardabweichung innerhalb der einzelnen Gruppen (Mck-N-LPL: 101055+/-54164 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 73367+/-29161 cpm/mg).

In der Leber stellte sich die höchste selektive $^{3}$H-CE-Aufnahme in den Mck-N-LPL-Tieren dar (Mck-N-LPL: 59444+/-17951 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 50686+/-17728 cpm/mg). Verglichen mit dem WT war der Unterschied aber nicht signifikant (WT: 49310+/-16190 cpm; WT+RAP:

50759+/-15194 cpm/mg). Stand das Mck-N-LPL-Tier unter Einfluss von RAP, war die Aufnahme nicht signifikant verringert.

Die Mck-N-LPL-Tiere ohne und mit RAP zeigten zu ihren jeweiligen Vergleichstieren geringere selektive CE-Aufnahmen in die Niere (Mck-N-LPL: 3031+/-1768 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 3101+/-1468 cpm/mg). Allerdings war diese verminderte Aufnahme nicht signifikant, da die SEM-Werte innerhalb der WT-Gruppe relativ hoch waren (WT: 6500+/-4421 cpm/mg; WT+RAP: 8075+/-6082 cpm/mg).

Signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch bei der $^{3}$H-Aufnahme in den Muskel. Mit $p<0,05$ war die Aufnahme in die Mck-N-LPL-Tiere ohne RAP signifikant höher als in die WT-Gruppe (Mck-N-LPL: 1436+/-653 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 2176+/-907 cpm/mg). Die WT-Tiere mit RAP-Injektion hatten signifikant weniger $^{3}$H in den Muskel aufgenommen als die Gruppe des gleichen Genotyps ohne RAP-Wirkung (WT: 538+/-139 cpm/mg; WT+RAP: 351+/-61 cpm/mg, $p<0,05$).

Insgesamt ergab die mit $^{3}$H-CE ermittelte Cholesterolester-Aufnahme also keine wesentlichen neuen Aspekte gegenüber dem $^{125}$J-TC-Chylomikronen-Turnover.

# D Diskussion

Kern der Arbeit war die Untersuchung der LPL-vermittelten nicht-enzymatischen Lipoproteinaufnahme *in vivo*. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass Rezeptoren und Proteoglykane an dieser Aufnahme beteiligt sind (Goldberg 1996). Um die Rezeptornutzung dieses Prozesses zu untersuchen, wurde RAP als Rezeptor-Inhibitor in WT-Mäuse mit normaler und in Mäuse mit transgener Expression inaktiver LPL injiziert. Durch zeitnahe Injektion doppelt radioaktiv markierter Chylomikronen und deren spätere Aktivitätsmessung konnten Rückschlüsse auf die Verstoffwechselung und den Einfluss von RAP auf die Rezeptormechanismen gemacht werden.

## 1. RAP-Produktion

Es gelang, mit dem His-Taq-Plasmid in E. coli Bakterien 30 ml aufgereinigtes Protein herzustellen. Die weiterentwickelte Reinigung über die Ni-NTA Sepharose stellt aufgrund der schnelleren RAP-Gewinnung bei gleicher Reinheit eine wesentliche Verbesserung der RAP-Herstellung dar.

## 2. Lipoproteinprofil nach RAP

Grundsätzlich werden die VLDL-Partikel in der Peripherie über den LDL-R und den VLDL-R aus der Blutbahn in das Gewebe aufgenommen. Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass bei LDL-R negativen Mäusen eine verlangsamte Aufnahme von VLDL-Remnants in die Leber zu sehen ist (Choi u. Cooper, 1993; Ishibashi *et al.* 1993, Ishibashi *et al.* 1994). Auch konnte gezeigt werden, dass VLDL-R negative Mäuse eine reduzierte Fettmasse und einen reduzierten Body-Mass-Index aufweisen, wahrscheinlich durch die verminderte Versorgung peripherer Zellen mit Fettsäuren (Frykman *et al.* 1995, van Vlijmen *et al.* 1999). Man geht davon aus, dass LRP ein weiterer wichtiger Rezeptor bei der Aufnahme von Chylomikronen-Remnants und VLDL-R in die Leber ist, weil bei den WHHL-Kaninchen (Watanabe´s heritable hyperlipidemic) die Chylomikronen-Remnants-Clearance nicht gestört ist. Dagegen werden die VLDL-Remnants schlechter verstoffwechselt.

Darauf aufbauend wurde in LDL-R-KO-Mäusen mit normaler LPL-Aktivität die VLDL-Plasmakonzentration unter RAP-Einfluß untersucht. Diese Untersuchung sollte Hinweise auf mögliche andere Aufnahmemechanismen der VLDL-Partikel liefern, indem der LDL-R als „üblicher“ Rezeptor ausgefallen war und zusätzlich die RAP-Hemmung des VLDL-R bestand. Den Tieren wurde Blut abgenommen, in einzelne Fraktionen mittels Ultrazentrifugation aufgetrennt und schließlich durch Extinktionsmessung auf den TG- und Cholesterolgehalt geschlossen. Es konnte ein verlangsamter Cholesterol- und ein nahezu gleichbleibender TG-Abbau unter RAP im Vergleich zu PBS beobachtet werden. Es wäre einerseits eine verminderte TG-Aufnahme aufgrund der doppelten „Rezeptorblockade“ zu erwarten gewesen. Andererseits konkurrieren das LPL-Fragment und das RAP-Fragment um die Ligandenbindungsdomäne des LRP (Nykjaer *et al.* 1993, Nykjaer *et al.* 1994), was die verminderte LPL-Aktivität und die unveränderte Plasma-TG-

Konzentration erklärt. Fraglich ist, ob die TG über einen zusätzlichen nicht RAP-inhibierbaren-Mechanismus abgebaut werden. Für diesen Mechanismus würden HSPG in Frage kommen. Es konnte mitlerweile gezeigt werden, dass HSPG unabhängig von LRP zur Lipoprotein-Aufnahme beitragen könnten (Uhlin-Hansen *et al.* 1995). Die Internalisierung der Chylomikronen-Remnants durch HSPG direkt konnte *in vitro* beschrieben werden (Fernandez-Boja *et al.* 1996; Sehayek *et al.* 1996). RAP scheint auf den Cholesterolabbau hemmend zu wirken. Die inhibierende Wirkung von RAP auf den LDL-R (Medh *et al.* 1995) und VLDL-R (Battey *et al.* 1994) ist bekannt und konnte auch hier zum Teil für den VLDL-R bestätigt werden.

## 3. Metabolische Studien mit RAP

In Vorarbeiten etablierten Merkel *et al.* ein Mausmodell, das erstmals *in vivo* zeigen konnte, dass in Anwesenheit von aktiver und inaktiver LPL nebeneinander eine Verstärkung der plasmatischen TG-Hydrolyse sowie eine Organaufnahme ganzer Lipoproteinpartikel vermittelt werden kann (Merkel *et al.* 1998). Die Tiere hatten neben der Maus-LPL eine muskelspezifische Überexpression mutierter inaktiver LPL mit physiologischer Proteoglykanbindung.

Mit dem gleichen Mausmodell wurden in der vorliegenden Arbeit zwei metabolische Studien mit einer Laufzeit von 30 min (1. Studie) und 10 min (2. Studie) durchgeführt. In beiden Studien wurde in Mck-N-LPL-Mäuse und in die WT-Kontrollgruppe PBS oder 5 mg RAP in PRS injiziert. Die Injektion der mit $^{125}$J-TC und $^{3}$H-Cholesterolether markierten Chylomikronen erfolgte 2 min später. Anschließend wurde engmaschig Blut abgenommen und schließlich nach 30 min bzw. 10 min die Organentnahme durchgeführt.

### 3.1. 30 min Studie

Bei der zunächst erfolgten 30 min Studie zeigten die Mck-N-LPL-Tiere unter RAP-Wirkung zum Zeitpunkt 1 min und 2 min signifikant höhere $^{125}$J-Serumkonzentrationen als die Kontrollgruppe. Vermutlich ist durch die hohe RAP-Konzentration zu Beginn ein optimaler Wirkungseffekt erreicht worden, der dann langsam abgenommen hat. Bei Injektion von 1 mg RAP und einer Halbwertszeit von 6 min war nach 30 min noch eine Plasmakonzentration von >40 µg/ml zu erwarten. Diese Konzentration reichte bei adenoviraler Expression, um einen deutlichen TG-Anstieg und einen langsameren Chylomikronenabbau zu erreichen (Willnow *et al.* 1994). Unklar ist, warum der WT unter RAP-Einfluss keine länger anhaltende $^{125}$J-Serumkonzentration zeigte.

Auffällig war, dass der Chylomikronen-Abbau bei den Mck-N-LPL-Tieren ohne RAP einem nicht-exponentiellen Abbau folgte. Ursächlich dafür könnte eine Interaktion der LPL sein, die Lipoproteine an die Gefäßwand binden könnte. Auch Olivecrona *et al.* vermuteten (Olivecrona *et al.* 1995, Olivecrona u. Olivecrona 1995), dass eine Bindung von Lipoproteinen an HSPG durch LPL vermittelt werden könnte. Warum sich dieser Effekt nur bei den Mck-N-LPL-Tieren ohne RAP zeigte, liegt möglicherweise an der erhöhten endothelialen LPL-Konzentration und

konsekutiv erhöhten Lipoprotein-HSPG-Bindung bei diesen Tieren (Merkel *et al.* 2002b, Merkel *et al.* 1998).

Die Organaufnahme nach 30 min zeigte eine durch inaktive Muskel-LPL 2,8fach verstärkte Chylomikronen-Aufnahme in den Muskel, die von Merkel schon in Voruntersuchungen in ähnlicher Signifikanz dargestellt werden konnte (Merkel *et al.* 1998). Die muskuläre Chylomikronen-Aufnahme war nicht RAP inhibierbar. Daher muß davon ausgegangen werden, dass ein nicht RAP-inhibierbarer Mechanismus an der Muskelaufnahme beteiligt ist. In Betracht kommt die Beteiligung des LDL-R oder des LRP an der muskulären Chylomikronen-Aufnahme. Ishibashi *et al.* konnten in diversen Vorarbeiten eine verlangsamte Chylomikronen-Remnants-Aufnahme in LDL-R-KO-Mäuse zeigen (Ishibashi *et al.* 1993). Obwohl die Hypothese aufgestellt wurde, dass LRP besonders zur hepatischen Chylomikronen-Remnants-Aufnahme beitragen könnte (Kowal *et al.* 1989), scheint dies nicht der gesuchte RAP unabhängige Mechanismus zu sein, weil die Ligandenbindung an LRP RAP inhibierbar ist (Herz *et al.* 1991). Vermutlich sind noch andere Stoffwechselwege zur Chylomikronen-Remnants-Aufnahme in Betracht zu ziehen. Vielleicht könnte durch den transgenen LDL-R-KO der Scavenger pathway an Bedeutung zunehmen. Gegen diese These spricht allerdings, dass Chylomikronen bisher nicht als Liganden des Scavenger-Rezeptors gelten.

Die Chylomikronen-Aufnahme in die Milz brachte keine neuen Aspekte bezüglich der peripheren Lipoproteinaufnahme.

In der Leber wurde die 1,4fach verstärkte Chylomikronen-Remnants-Aufnahme in die Mck-N-LPL-Tiere ebenfalls erwartet. Im Gegensatz zum Muskel war die hepatische Chylomikronen-Remnants-Aufnahme RAP inhibierbar. Die hepatische Chylomikronen-Remnants-Aufnahme verläuft nach heutigem Wissensstand über eine LPL-vermittelte Bindung der Chylomikronen-Remnants an die Proteoglykane der Leber, nachfolgender Akkumulation im Disse-Raum und Aufnahme der Chylomikronen-Remnants über LRP (Beisiegel *et al.* 1991). Die These der Chylomikronen-Remnants-Aufnahme über LRP als RAP inhibierbarer Mechanismus *in vivo* konnte bestätigt werden. RAP ist an der Zelloberfläche mit LRP assoziiert (Strickland *et al.* 1991) und hemmt dessen Ligandenbindung (Herz *et al.* 1991, Willnow *et al.* 1994). Neben der LPL-vermittelten muss es noch eine nicht LPL-vermittelte hepatische Chylomikronen-Remnants-Aufnahme geben. Diese Aufnahme läuft vermutlich über einen nicht RAP inhibierbaren Weg, wie z. B. den LDL-R. Dass der LDL-R ebenfalls eine Rolle im Chylomikronenstoffwechsel spielt, konnte durch Antikörper-Applikation gegen den LDL-R gezeigt werden (Choi *et al.* 1991). Es fand eine verlangsamte Chylomikronen-Remnants-Aufnahme statt.

In der Niere konnte ähnlich der hepatischen Chylomikronen-Aufnahme eine durch inaktive transgene Muskel-LPL signifikant höhere Chylomikronen-Aufnahme, die ebenfalls RAP inhibierbar war, verzeichnet werden. Im proximalen Tubulus der Niere wird Megalin exprimiert,

das sowohl apo-E als auch LPL binden kann und darüber zur Chylomikronenaufnahme beigetragen haben könnte. Obwohl Megalin (gp 330) aufgrund seiner Strukturhomologie sehr dem LRP ähnelt, werden beide fast nie gemeinsam in einer Zelle exprimiert.

### 3.2. 10 min Studie

Es wurde eine zweite Studie mit gleichen Versuchsparametern, bei allerdings nur 10-minütiger Laufzeit durchgeführt. Ziel war hier, die Sensitivität bei höheren RAP-Konzentrationen zu erhöhen. Die Auswertung der Organaufnahme $^{125}$J-TC markierter Chylomikronen bei WT und Mck-N-LPL-Tieren bestätigte die Ergebnisse der 30 min $^{125}$J-Organaufnahme mit geringerer Signifikanz. Neue Aspekte konnten nicht hinzu gewonnen werden.

Die Ergebnisse der Plasma-Untersuchungen der Mck-N-LPL-Tiere zeigten eine deutlich, zum Teil signifikant erniedrigte $^{3}$H-CE- und $^{125}$J-TC-Chylomikronen-Plasmakonzentration bei den 10 min Werten. Damit konnte der von Merkel bereits gezeigte Effekt, dass transgene Expression inaktiver LPL die Lipoprotein- und die selektive Cholesteroletheraufnahme erhöhen kann, bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die LPL neben ihrer bereits bekannten lipolytischen Funktion eine nicht-enzymatische Funktion ausüben muß, die die zelluläre Lipoproteinaufnahme verstärkt.

Hinweise dafür gab es schon in verschiedenen Arbeitsgruppen. Ionische Wechselwirkungen zwischen LPL und HSPG wurden bereits von Saxena *et al.* beschrieben (Saxena *et al.* 1995, Saxena u. Goldberg 1994). Olivecrona konnte diese These weiterentwickeln und vermutete eine Bindung zwischen HSPG und Lipoproteinen (Olivecrona *et al.* 1995). Wie die Lipoproteine schließlich in die Zelle gelangen könnten, wurde bisher unterschiedlich diskutiert. Auf der einen Seite konnte man sich vorstellen, dass durch die Lipoprotein-Konzentration in Rezeptornähe eine apo-E und apo-B vermittelte Aufnahme stattfindet (Mulder *et al.* 1993). Auf der anderen Seite wurde diskutiert, ob der HSPG-Stoffwechsel die Lipoproteinaufnahme in die Zelle vermittelt (Obunike *et al.* 2001).

# E Zusammenfassung

Die Lipoproteinlipase (LPL) ist ein zentrales Enzym der Hydrolyse Triglyzerid(TG)-reicher Lipoproteine. Neben der enzymatischen Funktion kann die LPL eine Lipoproteinaufnahme als Ligand oder struktureller Kofaktor vermitteln. Anhand eines bereits etablierten Mck-N-LPL-Mausmodells mit 2-2,5facher Überexpression inaktiver LPL im Muskel konnte gezeigt werden, dass die inaktive LPL sowohl ganze Lipoproteinpartikel als auch selektiv Cholesterolester in den Muskel transportieren kann (Merkel *et al.* 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde der LPL-vermittelte Lipoproteintransport hinsichtlich rezeptorvermittelter Mechanismen weiter untersucht. Hierzu wurde die Funktion des VLDL-Rezeptors und des LDL-Rezeptors (LRP) unter dem Einfluß von RAP untersucht. Zunächst wurden Plasma-TG und VLDL-TG in LDL-R defizienten Mäusen nach RAP-Injektion gemessen. Bis zu zwei Stunden nach Injektion fanden sich hierbei keine RAP-vermittelten Änderungen. Anschließend wurden Verstoffwechselung und Organaufnahme von mit $^{125}$J-Tyramin-Zellubiose- und $^{3}$H-Cholesterolether doppelt markierten Chylomikronen sowohl an Mck-N-LPL- als auch an Wildtyp(WT)-Tieren jeweils mit und ohne RAP über verschiedene Zeiträume untersucht.

Aufgrund dieser Experimente können folgende Aussagen getroffen werden:

In der Leber zeigte sich zunächst eine durch inaktive Muskel-LPL verstärkte Chylomikronenaufnahme. In WT-Tieren konnte RAP die Chylomikronenaufnahme in die Leber nicht inhibieren (WT: 833±133 cpm/mg; WT+RAP: 899±267 cpm/mg, p=NS). In Tieren mit inaktiver Muskel-LPL reduzierte RAP die hepatische Chylomikronenaufnahme deutlich (Mck-N-LPL: 1156±107 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 887±97 cpm/mg; p<0,01). Bei der Chylomikronenaufnahme in den Muskel erhöhte das Mck-N-LPL-Transgen zunächst wie erwartet deutlich. Nach RAP-Injektion war die Muskel-Aufnahme von Chylomikronen bei WT-Tieren nicht signifikant erhöht (WT: 6,4±0,5 cpm/mg; WT+RAP: 9,3±3,2 cpm/mg p=NS); bei Mck-N-LPL-Tieren leicht, nicht signifikant erniedrigt (Mck-N-LPL: 19,2±3,1 cpm/mg; Mck-N-LPL+RAP: 16,9±3 cpm/mg, p=NS).

Die LPL-vermittelte Lipoproteinaufnahme in die Leber erfolgt somit vermutlich über einen RAP inhibierbaren Mechanismus, z. B. über LRP. Die nicht LPL vermittelte hepatische Lipoproteinaufnahme ist allerdings nicht RAP inhibierbar und verläuft am ehesten über der LDL-Rezptor. Im Muskel ist die Chylomikronenaufnahme wahrscheinlich nicht durch RAP beeinflussbar und somit nicht VLDL-Rezeptor- oder LRP-abhängig. Die untersuchten Stoffwechselvorgänge werden derzeit mit Hilfe spezifisch Rezeptordefizienter Mauslinien weiter untersucht.

# F Literaturverzeichnis


Aalto-Setala, K, EA Fisher, X Chen, T Chajek-Shaul, T Hayek, R Zechner, A Walsh, R Ramakrishnan, HN Ginsberg und JL Breslow (1992) Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) ciii transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo ciii and reduced apo e on the particles. J Clin Invest. 90:1889-1900.

Aalto-Setala, K, CL Bisgaier, A Ho, KA Kieft, MG Traber, HJ Kayden, R Ramakrishnan, A Walsh, AD Essenburg und JL Breslow (1994) Intestinal expression of human apolipoprotein a-iv in transgenic mice fails to influence dietary lipid absorption or feeding behavior. J Clin Invest. 93:1776-1786.

Anderson, RG, JL Goldstein und MS Brown (1976) Lokalization of low density lipoproteinreceptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in ells from a familial hypercholesterolemia homozygote. Proc Natl Acad Sci U S A 73:2434-2438.

Beisiegel, U, W Weber und G Bengtsson-Olivecrona (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 88:8342-8346.

Beisiegel, U und RW St Clair (1996) An emerging understanding of the interactions of plasma lipoproteins with the arterial wall that leads to the development of atherosclerosis. Curr Opin Lipidol. 7:265-268.

Benlian, P, JL De Gennes, L Foubert, H Zhang, SE Gagne und M Hayden (1996) Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. N Engl J Med. 335:848-854.

Brown, MS, TF Deuel, SK Basu und JL Goldstein (1978) Inhibition of the binding of low density lipoprotein to ist cell surface receptor in human fibroblast by positively charged proteins. J Supramolecular Structure 8: 223-234.

Brown, MS und JL Goldstein (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science. 232:34-47.

Brunzell, JD (1995) Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. *In* The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol. II. CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly und D Valle, editors. McGraw-Hill, New York. 1913-1932.

Chen, WJ, JL Goldstein und MS Brown (1990) NPXY, a squense often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. J Biol Chem 265:31116-31123.

Choi, SY, LG Fong, MJ Kirven und AD Cooper (1991) Use of an anti-low density lipoprotein receptor antibody to quantify the role of the LDL receptor in the removal of chylomicron remnats in the mouse in vivo. J Clin Invest. 88:1173-1181.

Choi, SY und AD Cooper (1993) A comparison of the roles of the low density lipoprotein (LDL) receptor and the LDL-receptor-related protein / alpha 2-macroglobulin receptor in chylomicron remnant removal in the mouse in vivi. J Biol Chem 268:15804-15811.

Cummings, RD, S Kornfeld, WJ Schneider, KK Hobgood, H Tolleshaug, MS Brown und JL Goldstein (1983) Biosynthesis of n- and o-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. J Biol Chem. 258:15261-15273.

Davis, CG, JL Goldstein, TC Südhoff, AGW Anderson, DW Russel und MS Brown (1987) Acid dependent ligand assoziation by growth factor homolgy region. Nature 326:760-765.

Davis, RC, H Wong, Nikazy, K Wang, Q Han und MC Schotz (1992) Chimeras of hepatic lipase and lipoprotein lipase. Domain localisation of enzyme-specific properties. J Biol Chem 267:21499-21504.

Dichek, HL, C Parrott, R Ronan, JD Brunzell, HBJ Brewer und S Santamarina-Fojo (1993) Functional characterization of a chimeric lipase gentically engineered from human lipoprotein lipase and hepatic lipase. J Lipid Res. 34:1293-1340

Dole, VP (1956) A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. J Clin Invest. 35:150-154.

Dugi, KA, HL Dichek, GD Talley, HB Brewer, Jr. und S Santamarina-Fojo (1992) Human lipoprotein lipase: The loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. J Biol Chem. 267:25086-25091.

Eisenberg, S, E Sehayek, T Olivecrona und I Vlodavsky (1992) Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. J Clin Invest. 90:2013-2021.

Emmerich, J, OU Beg, J Peterson, L Previato, JD Brunzell, HB Brewer, Jr. und S Santamarina-Fojo (1992) Human lipoprotein lipase. Analysis of the catalytic triad by site-directed mutagenesis of ser-132, asp-156, and his-241. J Biol Chem. 267:4161-4165.

Everson, GT, C McKinley und FJ Kern (1991) Mechanisms of gallstone formation in women. Effects of exogenous estrogen. J Clin Invest. 87:237-246.

Fernandez-Borja, M, D Bellido, E Vilella, G Olivecrona und S Vilaro. (1996) Lipoprotein lipase-mediated uptake of lipoprotein in human fibroblasts: evidence for an LDL receptor-independent internalization pathway. J Lipid Res. 37:464-481.

Felts, JM, H Itakura und RT Crane (1975) The mechanism of assimilation of constituents of chylomicrons, very low density lipoproteins and remnants - a new theory. Biochem Biophys Res Commun. 66:1467-1475.

Fielding, CJ, VG Shore, und PE Fielding (1972) A protein cofactor of lecithin: cholesterol acyltransferase. Biochem Biophys Res Commun. 46:1943-1949.

Fredrickson, DS, JL Goldstein und MS Brown (1978) The familial hyperlipoproteinemias. *In* The metabolic basis of inherited disease. Vol. 4. JB Stanbury, JB Wyngaarden und DS Fredrickson, editors. McGraw-Hill, New York. 604-655.

Frykman, PK, MS Brown, T Yamamoto, JL Goldstein und J Herz (1995) Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 92:8453-8457.

Glomset, JL (1968) The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. J Lipid Res. 9:155-167.

Goldberg, IJ (1996) Lipoprotein lipase and lipolysis: Central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. J Lipid Res. 37:693-707.

Goldberg, IJ und M Merkel (2001) Lipoprotein lipase: Physiology, biochemistry, and molecular biology. Front Biosci. 6:D388-D405.

Gray, A, TJ Dull, und A Ullrich (1983) Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. Nature. 3030:722-725.

Greenwood, MRC (1984) Enzymatic alterations in the obese: Long and short term regulatory errors? Int J Obes. 8:561-569.

Greenwood, MRC (1985) The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: Lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. Int J Obes. 9:67-70.

Havel, RJ, HA Eder und JH Bragdon (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest. 34:1345-1353.

Havel, RJ, CJ Fielding, T Olivecrona, VG Shore, PE Fielding und T Egelrud (1973) Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoproteins lipase from different sources. Biochemistry. 12:1828-1833.

Herz, J, U Hamann, S Rogne, O Myklebost, H Gausepohl und KK Stanley (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as liporotein receptor. EMBO J. 7:4119-4127.

Herz, J, RC Kowal, JL Goldstein und MS Brown (1990) Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. EMBO J. 9:1769-1776.

Herz, J, JL Goldstein, DK Strickland, YK Ho und MS Brown (1991) 39-kda protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. J Biol Chem. 266:21232-21238.

Herz, J, DE Clouthier und RE Hammer (1992) Ldl receptor-related protein internalizes and degrades upa-pai-1 complexes and is essential for embryo implantation. Cell. 71:411-421.

Ishibashi, S, MS Brown, JL Goldstein, RD Gerard, RE Hammer und J Herz (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. J Clin Invest. 92:883-893.

Ishibashi, S, JL Goldstein, MS Brown, J Herz und DK Burns (1994) Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. J Clin Invest. 93:1885-1893.

Jaeckle, S, F Rinninger, J Greeve, H Greten und E Windler (1992) Regulation of the hepatic removal of chylomicron remnants and beta-very low density lipoproteins in the rat. J Lipid Res. 33:419-429.

Jensen, PH, SK Moestrup, L Sottrup-Jensen, CM Petersen und J Gliemann (1988) Receptors for alpha 2-macroglobulin- and pregnancy zone protein- proteinase complexes in the human placental syncytiotrophoblast. Placenta. 9:463-477.

Ji, ZS, WJ Brecht, RD Miranda, MM Hussain, TL Innerarity und RW Mahley (1993) Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant liporoteins by cultured cells. J Biol Chem. 268:10160-10167.

Johnson, JE, BJ Wold und SD Hauschka (1989) Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. Mol Cell Biol. 9:3393-3399.

Kerjaschki, D und MG Farquhar (1982) The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal promimal tubule brush border. Proc Nati Acad Sci U S A. 79:5557-5581.

Kirchgessner, TG, KL Svenson, AJ Lusis und MC Schotz (1987) The sequence of cdna encoding lipoprotein lipase: A member of a lipase gene family. J Biol Chem. 262:8463-8466.

Kirchgessner, TG, JC Chuat, C Heinzmann, J Etienne, S Guilhot, K Svenson, D Ameis, C Pilon, L d'Auriol, A Andalibi, MC Schotz, F Galibert und AJ Lusis (1989) Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. Proc Natl Acad Sci U S A. 86:9647-9651.

Kowal, RC, J Herz, JL Goldstein,V Esser und MS Brown (1989) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 86:5810-5814.

Krapp, A, H Zhang, D Ginzinger, MS Liu, A Lindberg, G Olivecrona, MR Hayden und U Beisiegel (1995) Structural features in lipoprotein lipase necessary for the mediation of lipoprotein uptake into cells. J Lipid Res. 36:2362-2373.

Krieger, M und J Herz (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and ldl receptor-related protein (lrp). Annu Rev Biochem. 63:601-637.

Kristensen, T, SK Moestrup, J Gliemann, L Bendtsen, O Sand und L Sottrup-Jensen (1990) Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein(LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor. Febs Lett. 276:151-155.

Langmann, T,J Klucken, M Reil, G Liebsch, M-F Luciani, G Chimini, WE Kaminski und g Schmitz (1999) Molecular Cloning of the humn ATP binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. Biochem Biophys. Res. commun. 257,29.

LaRosa, JC, RI Levy, P Herbert, SE Lux und DS Fredrickson (1970) A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. Biochem Biophys Res Commun. 41:57-62.

Lundgren, S, T Carling, G Hjaelm, C Juhlin, J Rastad, U Pihlgren, L Rask, G Akerstroem und P Hellman (1997) Tissue distribution of human gp330/megalin, a putative Ca(2+)-sensing protein. J Histochem Cytochem. 45:383-392.

Luoma, J, T Hiltunen, T Särkioja, SK Moestrup, J Gleimann, T Kodama, T Nikkari, S Ylä-Herttuala (1994) Expression of alpha2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions. J Clin Invest. 93:2014-2021.

Lupu, F, D Heim, F Bachman, EKO Kruithof (1994) Expression of LDL receptor-related protein/ alpha2-macroglobulin receptor in human normal and atherosclerotic arteries. Arterioscler Thromb. 14:1438-1444.

Mahley, RW, TL Inneraity und KH Weisgraber (1980) Alterations in metabolic activity of plasma lipoproteins following selective chemical modification of the apolipoproteins. AnnNY Acad Sci. 348:265-280.

Ma, YH, T Bruin, S Tuzgol, BI Wilson, G Roederer, MS Liu, J Davignon, JJ Kastelein, JD Brunzell und MR Hayden (1992) Two naturally occurring mutations at the first and second bases of codon aspartic acid 156 in the proposed catalytic triad of human lipoprotein lipase. In vivo evidence that aspartic acid 156 is essential for catalysis. J Biol Chem. 267:1918-1923.

Medh, JD, GL Fry, SL Bowen, MW Pladet, DK Strickland und DA Chappell (1995) The 39-kda receptor-associated protein modulates lipoprotein catabolism by binding to ldl receptors. J Biol Chem. 270:536-540.

Medh, JD, SL Bowen, GL Fry, S Ruben, M Andracki, I Inoue, JM Lalouel, DK Strickland und DA Chappell (1996) Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins in vitro. J Biol Chem. 271:17073-17080.

Merkel, M, Y Kako, H Radner, IS Cho, R Ramasamy, JD Brunzell, IJ Goldberg und JL Breslow (1998) Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases vldl uptake. Direct evidence that lpl bridging occurs in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 95:13841-13846.

Merkel, M, RH Eckel und IJ Goldberg (2002a) Lipoprotein lipase: Genetics, lipid uptake and regulation. J Lipid Res. 43:1997-2006.

Merkel, M, J Heeren, W Dudeck, F Rinninger, H Radner, JL Breslow, G I.J., R Zechner und H Greten (2002b) Inactive lipoprotein lipase (lpl) alone increases selective cholesterol ester uptake *in vivo*, whereas in the presence of active lpl it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. J Biol Chem. 277:7405-7411.

Moestrup, SK und J Gliemann (1991) Analysis of ligand recognition by the purified alpha 2-macroglobulin receptor (low density lipoprotein receptor-related protein). Evidence that

high affinity of alpha 2-macroglobulin-proteinase complex is achieved by binding to adjacent receptors. J Biol Chem. 266:14011-14017.

Moestrup, SK, TL Holtet, M Etzerodt, HC Thoegersen, A Nykjaer, PA Andreasen, L Sottrup-Jensen und J Gliemann (1993) alpha2-macroglobulin-proteinase complexes, plasminogen activator inhibitor type-1-plasminogen activtor complexes, and receptor associated protein bind to a region of the alpha2-macroglobulin-receptor containing a cluster of eight complement type repeats. J Biol Chem. 268:13691-13696.

Mulder, M, P Lombardi, H Jansen, TJ van Berkel, RR Frants und LM Havekes (1993) Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoproteins that are bound to heparan sulfate proteoglycans via lipoprotein lipase. J Biol Chem. 268:9369-9375.

Nykjaer, A, G Bengtsson-Olivecrona, A Lookene, SK Moestrup, CM Petersen, W Weber, U Beisiegel und J Gliemann (1993) The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta-migrating very low density lipoprotein associated with the lipase. J Biol Chem. 268:15048-15055.

Nykjaer, A, M Nielsen, A Lookene, N Meyer, H Roigaard, M Etzerodt, U Beisiegel, G Olivecrona und J Gliemann (1994) A carboxyl-terminal fragment of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein and inhibits lipase-mediated uptake of lipoprotein in cells. J Biol Chem. 269:31747-31755.

Obunike, JC, EP Lutz, Z Li, L Paka, T Katopodis, DK Strickland, KF Kozarsky, S Pillarisetti und IJ Goldberg (2001) Transcytosis of lipoprotein lipase across cultured endothelial cells requires both heparan sulfate proteoglycans and the very low density lipoprotein receptor. J Biol Chem. 276:8934-8941.

Olivecrona, G, M Hultin, R Savonen, N Skottova, A Lookene, Y Tugrul und T Olivecrona (1995) Transport of lipoprotein lipase in plasma and lipoprotein metabolism. *In* Atherosclerosis x. W F.P., J Davignon und A Sniderman, editors. Elsevier, New York. 250-253.

Olivecrona, G und T Olivecrona (1995) Triglyceride lipases and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol. 6:291-305.

Orlando, RA und MG Farquhar (1994) Proc Nati Acad Sci U S A 91:3161-3165.

Pennacchio, LA, M Olivier, JA Hubacek, JC Cohen, DR Cox, JC Fruchart, RM Krauss und EM Rubin (2001) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. Science. 294:169-173.

Pittman, RC, TE Carew, CK Glass, SR Green, CA Taylor, Jr. und AD Attie (1983) A radioiodinated, intracellularly trapped ligand for determining the sites of plasma protein degradation in vivo. Biochem J. 212:791-800.

Pittman, RC und CA Taylor, Jr. (1986) Methods for assessment of tissue sites of lipoprotein degradation. Methods Enzymol. 129:612-628.

Pittman, RC, TP Knecht, MS Rosenbaum und CA Taylor, Jr. (1987) A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesterol esters. J Biol Chem. 262:2443-2450.

Rigotti, A, BL Trigatti, M Penman, H Rayburn, J Herz und M Krieger (1997) A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (hdl) receptor scavenger receptor class b type i reveals its key role in hdl metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A. 94:12610-12615.

Rogler, G, B Trümbach, B Klima, KJ Lackner und G Schmitz (1995) HDL mediated efflux of intracelluar cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease patients. Arterioscler Thomb Vasc Biol. 15:683-690.

Saite, A, S Pietromonaco, AK Loo und MG Farquhar (1994) Complete cloning and sequencing of rat gp330/“megalin“, a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. Proc Natl Acad Sci U S A 91:9725-9729.

Saxena, U, MG Klein und IJ Goldberg (1991) Transport of lipoprotein lipase across endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 88:2254-2258.

Saxena, U und IJ Goldberg (1994) Endothelial cells and atherosclerosis: Lipoprotein metabolism, matrix interactions, and monocyte recruitment. Curr Opin Lipidol. 5:316-322.

Saxena, U, BJ Auerbach, E Ferguson, J Wolle, YL Marcel, KH Weisgraber, RA Hegele und CL Bisgaier (1995) Apolipoprotein b and e basic amino acid clusters influence low-density lipoprotein association with lipoprotein lipase anchored to the subendothelial matrix. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 15:1240-1247.

Schneider, WJ, U Beisiegel, JL Goldstein und MS Brown (1982) Purification of the low density lipoprotein receptor, an acid glycoprotein of 164,000 molecular weight. J Biol Chem. 257:2664-2673.

Schwandt,P, WO Richter und KG Parhofer (2000) Handbuch der Fettstoffwechselstörung, 2. Aufl.Schattauer.

Sehayek, E, XX Wang, I Vlodavsky, R Avner, H Levkovitz, T Olivecrona, G Olivecrona, TE Willnow, J Herz und S Eisenberg (1996) Heparan sulfate-dependent and low density lipoprotein receptor-related protein-dependent catabolic pathways for lipoprotein lipase in mouse embryonic fibroblasts. Israel. J Med Sci 32: 449-454.

Semenkovich, CF, SH Chen, M Wims, CC Luo, WH Li und L Chan (1989) Lipoprotein lipase and hepatic lipase mrna tissue specific expression, developmental regulation, and evolution. J Lipid Res. 30:423-431.

Simonsen, ACW, CW Heegaard, LK Rasmussen, L Ellgaard, L Kjoeller, A Christensen, M Etzerodt und PA Andreasen (1994) VLDL receptor from mammary gland and mammary epithelial cell lines binds and mediates endocytosis of 40-kDa RAP. FEBS Lett. 54:279-283.

Stanley, KK, HP Kocher, JP Luzio, P Jackson, J Tschopp und J Dickson (1985) The sequence and topology of human complete component C9 EMBO 4:375-382.

Strickland, DK, JD Ashcom, S Williams, WH Burgess, M Migliorini und WS Argraves (1990) Sequence identify between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related lipoprotein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. J Biol Chem. 265:7401-17404.

Strickland, DK, JD Ashcom, S Williams, F Battey, E Behne, K Mc Tigue, JF Battey und WS Argraves (1991) Primary structure of alpha2-macroglobulin receptor-associated protein. J Biol Chem. 266:13364-13369.

Takahashi, S, Y Kawarabayasi, T Nakai, J Sakai und T Yamamoto (1992) Rabbit very low density lipoprotein recreptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. Proc Natl Acad Sci U S A. 89: 9252-9256.

Uhlin-Hansen, L und M Yanagishita (1995) Brefeldin A inhibits the endocytosis of plasma-membrane-associated heparan sulphate proteoglycans of cultured rat ovarian granulose cell. Biochem J. 271-278

van Vlijmen, BJ, A Rohlmann, ST Page, A Bensadoun, IS Bos, TJ van Berkel, LM Havekes und J Herz (1999) An extrahepatic receptor-associated protein-sensitive mechanism is involved in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. J Biol Chem. 274:35219-35226.

Watanabe, M, J Osada, Y Aratani, K Kluckman, R Reddick, MR Malinow und N Maeda (1995) Mice deficient in cystathionine beta-synthase: Animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 92:1585-1589.

Weisgraber, KH und SCL Hall (1987) Human apolipoprotein B-100 heparin-binding sites. J Biol Chem. 626:11097-11103.

Willnow, TE, Z Sheng, S Ishibashi und J Herz (1994) Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. Science. 264:1471-1474.

Willnow, TE, SA Armstrong, RE Hammer und J Herz (1995) Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by recptor-associated protein in vivo. Proc Nati Acad Sci U S A 92:4537-4541.

Yanagishita, M und VC Hascall (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycans. J Biol Chem. 267:9451-9454.

Yamamoto, T, CG Davis, MS Brown, WJ Schneider, ML Casey, JL Goldstein und DW Russel (1984) The human LDL-receptor: A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. Cell. 39:44-148.

# G Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Exogener und endogener Plasmalipidstoffwechsel

Abb. 2: Zusammensetzung der einzelnen Lipoproteine (Quelle: Kritchevsky)

Abb. 3: Aufbau der Rezeptoren der LDL-R-Familie (Quelle: Schwandt/Richter/Parhofer)

Abb. 4: RAP-Reinigungsschritte auf einem 10%igen SDS-Gel gefärbt nach Coomassie

Abb. 5: TG- und Cholesterol-Plasmaspiegel in der VLDL-Fraktion, RAP und PBS im Vergleich

Abb. 6: Abhängigkeit der Serumkonzentration von $^{125}J$ in WT und Mck-N-LPL-Tieren mit und ohne RAP

Abb.7: Organaufnahme $^{125}J$-markierter Chylomikronen nach 30 min bei WT und Mck-N-LPL-Tieren jeweils mit und ohne RAP-Einwirkung

Abb. 8: $^{125}J$-und $^{3}H$-Konzentration (cpm/µl) im Plasma jeweils 2 und 10 min nach Injektion in WT und Mck-N-LPL-Tiere

Abb. 9: Organaufnahme $^{125}J$-markierter Chylomikronen nach 10 min bei WT und Mck-N-LPL-Tieren jeweils mit und ohne RAP Einwirkung

Abb. 10: Selektive Cholesterolether-Organ-Aufnahme $^{3}H$- markierter Chylomikronen der WT- und Mck-N-LPL-Tiere mit und ohne RAP

# Lebenslauf

Personaldaten:

| | |
|---|---|
| Name: | Ines Jüttner |
| Geboren: | 08. 03. 1977 in Nordenham |
| Nationalität: | deutsch |
| Familienstand: | ledig |

Ausbildung:

| | |
|---|---|
| 1983–1996 | Schulausbildung |
| 1996 | Abitur |
| 1996-2003 | Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg |
| 1999 | Physikum |
| 2000 | 1. Staatsexamen |
| 2000-2001 | Wissenschaftliche Arbeit im Lipaselabor<br>Arbeitsgruppenleiter: Dr. med. M. Merkel<br>Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |
| 2002 | 2.Staatsexamen |
| 2002-2003 | Praktisches Jahr<br>Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde: Universitätsspital Zürich, (Schweiz) und Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf<br>Innere Medizin: Israelitisches Krankenhaus, Hamburg<br>Chirurgie: LBK Allgemeines Krankenhaus Barmbek, Hamburg |
| 2003 | 3. Staatsexamen |
| 2004 | Ärztin im Praktikum, Israelitisches Krankenhaus, Hamburg |

## Danksagung:

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. med. H. Greten, Direktor der Medizinischen Klinik I, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, verpflichtet. Er hat mir insbesondere die Möglichkeit geboten, an seiner Klinik die vorliegende Arbeit anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. F.U. Beil für die Vergabe des Themas und für die interessante Aufgabenstellung.

Herrn Dr. med. M. Merkel danke ich für die ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Arbeit, seine engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die Hilfestellung bei Fragen und Problemen, die ich besonders hervorheben möchte.

Herrn Dr. rer. nat. J. Heeren aus dem Institut für Medizinische Biochemie der Universität Hamburg danke ich vor allem für die Herstellung der doppelt radioaktiv markierten Chylomikronen. Herr Dr. Heeren hat mir auch bei verschiedenen anderen Experimenten sehr geholfen.

Für die Hilfe bei Laborarbeiten und die gute Zusammenarbeit danke ich Frau K. Frahm und meinen Mitdoktoranden.

Meinem Verlobten Jörn Kowalewski und meiner Zwillingsschwester Maren danke ich von Herzen für ihre nie endende Unterstützung.

# Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 12. August 2004

Ines Jüttner