Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Biochemie und Molekularbiologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Guse

Die Bedeutung von Apolipoprotein E und *LDL-receptor related* protein 1 für die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie in Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von Svenja Mondry

aus Hamburg

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.12.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter: Prof. Dr. E. Windler

Inhaltsverzeichnis

1
2
2
4
4
7
0
4
7
8
8
8
8
9
9
9
9
9
0
0
0
1
1
1
2
2
3
4
6
8
9
9

3.2.5.2 Quantifizierung des Lipidgehalts der Leber vor und nach partieller	
Hepatektomie	31
3.2.6 Western Blot (Immunblot)	31
3.2.7 Membranpräparation der Leber	34
3.2.8 Histologie	35
3.2.8.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	35
3.2.8.2 Ki67-Färbung	36
3.2.8.3 Quantifizierung der Ki67-Färbung	37
3.2.9 Dokumentation des Leberwachstums	37
3.2.10 Berechnung des Leberregenerationsindex	37
4. Ergebnisse	39
4.1 ApoE-Knockout-Studie	39
4.1.1 Charakterisierung der ApoE-Knockout-Mäuse	39
4.1.2 Analysen nach partieller Hepatektomie an ApoE-Knockout-Mäusen	41
4.1.2.1 Lipidanalysen	41
4.1.2.2 Proliferationsanalysen	47
4.1.3 Expression von LRP1 nach partieller Hepatektomie	51
4.2 LRP1-/Studie	53
4.2.1 Charakterisierung der LRP1-/Mäuse	53
4.2.2 Analysen nach partieller Hepatektomie an LRP1-Knockout-Mäusen	55
4.2.2.1 Lipidanalysen	55
4.2.2.2 Proliferationsanalysen	59
5. Diskussion	66
6. Zusammenfassung	70
7. Abkürzungsverzeichnis	71
8. Literaturverzeichnis	74
9. Abbildungsverzeichnis	80
10. Danksagung	81
11. Eidesstattliche Versicherung	822

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Menschen. Für die Regeneration der Leber werden große Mengen an Lipiden sowohl für die Synthese von Membranen als auch für die Bereitstellung von Energie benötigt. Die Aufnahme von Lipiden in Form von Lipoproteinen wird durch verschiedene hepatische Lipoprotein-Rezeptoren vermittelt. Dabei wird die Aufnahme von triglyzeridreichen Lipoproteinen hauptsächlich über den Rezeptor *low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) vermittelt, welcher Apolipoprotein E (ApoE) als Liganden erkennt. Die Bedeutung von LRP1 und ApoE für den Prozess der Leberregeneration ist jedoch unklar.

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass der LRP1- sowie ApoEvermittelte Transport von Lipiden und Lipoproteinen einen Einfluss auf die Regeneration der Leber hat. Somit kann die Fragestellung beantwortet werden, ob die Aufnahme von Lipoproteinen Voraussetzung für die Bildung der hepatozellulären Lipidpools während der Leberregeneration ist. Der Einfluss insbesondere von ApoE und LRP1 wird in diesem Zusammenhang untersucht. Zu diesem Zweck werden Parameter des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels während der Leberregeneration in ApoE-defizienten und leberspezifischen LRP1-Mäusen untersucht. Experimentell werden quantitative defizienten und histologische Analysen der hepatischen Lipidakkumulation, Expressionsanalysen Schlüsselenzymen Lipid-Lipoproteinstoffwechsels von des und sowie biochemische und histologische Analysen der hepatischen Proliferation nach partieller Hepatektomie durchgeführt.

2.1 Anatomie der menschlichen Leber

Die menschliche Leber ist 1 bis 1,5 kg schwer und liegt im rechten oberen Quadranten des Abdomens unterhalb des Zwerchfells. Makroskopisch-anatomisch wird sie durch das Ligamentum falciforme und das Ligamentum teres hepatis in einen größeren rechten Leberlappen und einen linken Leberlappen unterteilt (siehe Abb. 2.1). Im Bereich der Pfortader befindet sich außerdem ventral der Lobus quadratus und dorsal der Lobus caudatus.

Die Leber besitzt eine duale Blutversorgung, wobei sie zu 25% arteriell und somit sauerstoffreich über die Aorta, dem Truncus coeliacus, bzw. über die A. hepatica und zu 75% portal-venös über die Pfortader nährstoffreich aus dem Gastrointestinaltrakt versorgt wird. 25% des Herzminutenvolumens durchfließen die Leber, was beim erwachsenen Menschen etwa 1,4-1,9 l/min entspricht.



Abb. 2.1 Anatomie der menschlichen Leber

Die Leber wird in einen rechten und linken Leberlappen, sowie einen Lobus quadratus und Lobus caudatus (hier nicht zu sehen) eingeteilt. Über die A. hepatica und Pfortader wird sie mit Blut versorgt. Histologisch gruppieren sich die Hepatozyten zu Leberläppchen, in deren Zentrum sich die Zentralvene befindet. Zwischen den Hepatozyten vereinigen sich die Äste der Pfortader und A. hepatica zu Sinusoiden. Die sich im Periportalfeld befindlichen Äste der A. hepatica, V. portae und Gallengang werden "Glissonsche Trias" genannt.

Modifiziert nach [2.1].

Mikroskopisch werden anatomisch hexagonale Leberläppchen beschrieben, in deren Zentrum sich die Zentralvene und peripher das Portalfeld mit A. und V.

interlobularis (Äste der A. hepatica und V. portae) und Ductus biliferi interlobularis befinden.

Funktionell strukturiert sich die Leber jedoch in sogenannte Azini, die wiederum in drei Zonen eingeteilt werden. Die erste Zone beschreibt die zentrale, um das Portalfeld gelegene Zone des Leberparenchyms, welches durch eine sauerstoffund nährstoffreiche Blutversorgung gekennzeichnet ist. In diesem Bereich sind die regulären Gefäßstrukturen aufgehoben, sodass sich arterielles und venöses Blut in den Sinusoiden mischen kann. Durch das gefensterte Endothel ohne Basalmembran können alle nichtzellulären Plasmabestandteile wie Lipoproteine, Hormone und Wachstumsfaktoren in den Disse-Raum gelangen [Wisse et al., 1985]. In Fließrichtung befinden sich die Zonen 2 und 3 der Azini, in deren Peripherie die Zentralvenen der Lobuli stehen. Diese führen das Blut über die V. cava wieder dem systemischen Kreislauf zu.

Zwei Drittel des Zellanteils der Leber sind Leberzellen (Hepatozyten). Der Rest besteht aus ortsständigen, spindelförmigen Makrophagen, in der Leber Kupfferzellen genannt, die dem sinusoidalem Raum anliegen und deren Aufgabe in der Phagozytose von Antigenen besteht. Des Weiteren befinden sich sogenannte Stern- bzw. Itozellen im subendothelialen Disse-Raum. Es sind Fettund Vitamin A-speichernde, fibroblastenähnliche Zellen, die zur Kollagen- und Matrixsynthese fähig sind [Sato et al., 2003]. Zusätzlich können sie Matrix-Metalloproteinasen produzieren, die wichtig für das Remodeling der extrazellulären Matrix bei Verletzung und Regeneration der Leber sind [Milani et al., 1994]. Außerdem findet sich eine kleine Zahl Lymphozyten wie Dendritsche Zellen und leberspezifische Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen) in der Leber, die Teil des Immunsystems sind und wie die Makrophagen vor Infektion schützen [Milani et al., 1994.; Taub, R., 2004].

Die Hepatozyten haben an ihrem basolateralen Pol Mikrovilli, welche die Aufnahme der Nahrungsbestandteile aus dem Disse-Raum erleichtern. Apikal ist die Membran kanikulär gefaltet; hier wird die Galle sezerniert und entgegen der Fließrichtung des Blutes abgeleitet.

2.1.1 Aufgaben der Leber

Mit ihren vielfältigen Aufgaben trägt die Leber wesentlich zur Homöostase und physiologischen Gesundheit bei. Sie produziert zahlreiche Serumproteine wie Albumin, womit sie einerseits zur Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks und damit des Kreislaufs, andererseits auch zur Blutgerinnung (Gerinnungsfaktoren), des Immunsystems (Komplementfaktoren, Akute-Phase-Proteine), als auch des endokrinologischen Systems (Bildung von Bindungsproteinen wie Thyroxinbindendes Globulin TBG) beiträgt. Des Weiteren steuert sie während der extramedullären Phase zusammen mit der Milz zur Blutbildung des Fötus bei.

Die zentrale Rolle der Leber besteht allerdings in der Regulation des Energiestoffwechels. In der periportalen Zone, die durch ein hohes Substrat- und Sauerstoffangebot gekennzeichnet ist, finden oxidative Stoffwechsel wie Glukoneogenese, Glykogenabbau, Fettsäureoxidation und Aminosäurenabbau statt. Die perivenöse Zone ist durch Glykolyse, Glykogensynthese, Liponeogenese, Glutaminsynthese und Biotransformation durch das Cytochrom P450-System gekennzeichnet. Somit trägt sie wesentlich zur Aufrechterhaltung des Blutzuckers bei.

Die Leber produziert täglich 0,5 bis 1 Liter Galle, die über die kleinen Gallengänge zum Ductus hepaticus communis, von dort zur Gallenblase über den Ductus cysticus und über den Ductus choledochus gemeinsam mit dem Ductus pancreaticus im Duodenum mündet. Die Funktion der Galle bzw. der darin enthaltenden Gallensäuren besteht darin, mit der Nahrung aufgenommene wasserunlösliche Bestandteile wie Fette zu emulgieren und sie somit der Resorption zugänglich zu machen. Des Weiteren werden mit der Galle lipophile Substanzen wie Cholesterin, Hormone, Medikamente und auch Bilirubin, welches das Abbauprodukt von Hämoglobin darstellt, ausgeschieden. Somit stellt sie das Hauptentgiftungsorgan des Menschen dar.

Die zentrale Rolle der Leber verdeutlicht auch die Tatsache, dass ein totales Leberversagen nicht mit dem Leben vereinbar ist und bislang nicht durch apparative (Dialyse) oder medikamentöse Maßnahmen ersetzt werden kann.

2.2 Übersicht über den Lipidstoffwechsel

Da Lipide wasserunlöslich sind, müssen sie im Blut an Transportproteine gebunden oder in Komplexen mit Proteinen transportiert werden. Diese Komplexe aus Lipiden und Proteinen werden Lipoproteine (siehe Abb. 2.2) genannt. Ähnlich

wie in Mizellen wird die Hülle durch ein Phospholipidmonolayer und freies, unverestertes Cholesterin gebildet. Im Kern, dem "core", befinden sich die zu transportierenden Triglyzeride und verestertes Cholesterin. Der Proteinanteil der Lipoproteine besteht aus Apolipoproteinen (Apo) und dient der Stabilität.



Abb. 2.2 Aufbau eines Lipoproteins

Lipoproteine dienen dem Transport von Lipiden im Blut. Sie bestehen außen aus einer Hüllschicht aus Phospholipiden, der Phosphlipidmonolayer, die den Kern kugelförmig umgibt. Im Inneren befinden sich die zu transportierenden Fette, deren größter Anteil Triglyzereide und verestertes Cholesterin ausmacht. Vereinzelt findet man freies (unverestertes) Cholesterin in der Phospholipidmonolayer. Hier befinden sich auch Apolipoproteine, um den mizellenartigen Lipoproteinen Stabilität zu verleihen. Modifiziert nach [2.2].

Ihrer Dichte entsprechend werden die Lipoproteine in mehrere Hauptgruppen unterteilt: Chylomikronen, *Very-low-density-lipoproteins* (VLDL), IDL (*Intermediatedensity-lipoproteins*), LDL (*Low-density-lipoproteins*) und HDL (*High-densitylipoproteins*). Sie unterscheiden sich auch bezüglich ihrer Masse, Durchmesser und Triglyzerid- bzw. Cholesteringehalt. Außerdem haben sie unterschiedliche Apolipoproteine, Funktionen und sind ständig einem dynamischen Umbauprozess ausgesetzt.

Wie 1981 von Brown et. al zusammengefasst, wird zwischen einem exogenen und einem endogenen Lipidstoffwechsel unterschieden, in denen jeweils die Leber die zentrale Rolle spielt [Brown et al., 1981].

Der exogene Lipidstoffwechsel beginnt mit der Nahrungsaufnahme von Lipiden, die hauptsächlich aus Triglyzeriden und Cholesterin, aber auch aus Phospho- und Sphingolipiden, Vitaminen und freien Fettsäuren bestehen. Sie werden, nachdem Spaltprodukte resorbiert wurden, wieder zu Triglyzeriden sie als und Cholesterinester aufgebaut und von den Epithelzellen des Jejunums gemeinsam mit Phospholipiden, die der Emulgation dienen, in Chylomikronen eingebaut. Mit ApoAI, ApoB48 und ApoAIV werden sie über das Lymphsystem in den Ductus thoracicus und in den systemischen Kreislauf unter Umgehung der Leber drainiert. Von den HDL bekommen sie ApoC übertragen, das als Kofaktor für die endotheliale Lipoprotein-Lipase (LpL) dient. Die LpL spaltet die im Kern liegenden Triglyzeride zu ß-Monoglyzeriden und freien Fettsäuren, die nun vom Gewebe (hauptsächlich Muskel und Fettgewebe) aufgenommen werden können. Im Verlauf ihres Umbaus werden ApoEs von den HDL auf die Chylomikronen übertragen, sodass sogenannte Chylomikronenremnants (CR) entstehen. Sie sind durch einen hohen Cholsterinester- und ApoE-Gehalt charakterisiert. Da sie wesentlich kleiner als die Chylomikronen sind, können sie in den Disse-Raum gelangen und werden über Lipoproteinrezeptoren von der Leber aufgenommen. Trotz der primären Umgehung der Leber, beträgt die Halbwertszeit von Chylomikronen sowie deren Remnants beim Menschen nur 4 bis 5 Minuten [Grundy et al. 1976; Grundy et al. 1978]. Eine wesentliche Rolle für die hepatische Aufnahme spielt hierbei das LDL receptor related protein (LRP).

Im Zustand reichlicher Engergieversorgung werden die peripheren Organe via VLDL aus der Leber mit Lipiden versorgt. Ähnlich den Chylomikronen enthalten sie reichlich Triglyzeride, die während der Reifung der VLDL in den Core gepackt werden. Das charakteristische Apolipoprotein ist hier das ApoB100. Über HDL werden ApoE und ApoC auf die VLDL übertragen. Letztere verhindern die Wiederaufnahme in die Leber. ApoCII aktiviert die LpL, sodass die VLDL über Triglyzeridhydrolyse und deren Aufnahme ins Gewebe kleiner werden und einen hohen Cholesterinester- und ApoE-Gehalt verfügen. Auch sie werden Remnants genannt, die über den LDL-Rezeptor (LDL-R) in die Leber aufgenommen werden.

Alternativ können die VLDL über IDL zu LDL umgebaut werden. Der Anteil der VLDL, der über diesen Weg verstoffwechselt wird, ist variabel. Des Weiteren wird ein kleiner Teil über LRP1, wo ApoE und LpL die Ligandenfunktion übernehmen, in die Zellen aufgenommen.

Die LDL werden zu zwei Drittel über den LDL-R abgebaut, wobei die Leber den Hauptanteil übernimmt. Wie bei den anderen Lipoproteinen existieren auch bei den LDL Subfraktionen. Kleine, besonders dichte LDL gelten als atherogen, da sie über eine geringe Affinität zum LDL-R verfügen und eine längere Halbwertszeit als andere LDL-Partikel haben. So werden sie eher modifiziert und oxidiert, was ein Binden und Penetrieren der Gefäßwand möglich macht. Makrophagen nehmen die veränderten LDL über den unspezifischen, nicht sättigbaren Scavenger-Rezeptor auf. Das Cholesterin wird in Lysosomen verestert und in den Makrophagen (den sogenannten "Schaumzellen") gespeichert, was wesentlich zur Genese der Atherosklerose und damit zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko beiträgt.

HDL werden hauptsächlich in der Leber gebildet und enthalten ApoAI, ApoAII und ApoE. Die naszierenden HDL haben eine scheibenförmige Struktur. Sie nehmen von peripheren Zellen freies Cholesterin aus den Membranen auf und nehmen dabei eine kugelige Form an. Somit sind die HDL für den reversen Cholsterintransport verantwortlich. Die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT, ein von Hepatozyten sekretiertes Enzym) verestert das Cholesterin, wonach die CETP (*cholesterol-ester transfer protein*) die Cholesterinester im Tausch gegen Triglyzeride an VLDL und LDL weitergibt. Diese werden, wie bereits erwähnt, rezeptorvermittelt von der Leber aufgenommen [Canbay et al., 2007; Schwandt et Parhofer, 2007].

2.2.1 Apolipoprotein E

Das Apolipoprotein E ist als einziges Apolipoprotein auf allen Lipoproteinen – außer den LDL – zu finden und besonders charakteristisch für die VLDL und Chylomikronen.

ApoE ist ein Protein, das 299 Aminosäuren lang, 34kDa groß ist und im Plasma in einer Konzentration von 30 bis 50 mg/l vorkommt. Für das ApoE-kodierende Gen sind drei Allele (epsilon2, epsilon3 und epsilon4) bekannt, die somit für 3 homozygote (ApoE2/2, ApoE3/3 und ApoE4/4) und 3 heterozygote (ApoE2/E3, ApoE2/4 und ApoE3/4) Phänotypen sorgen. Das Gen befindet sich auf dem

langen Arm des Chromosoms 19 an der Position 13.2. Daneben sind noch zahlreiche andere Isoformen des ApoE bekannt, die durch posttranslationale Modifikation entstehen. Als so genanntes Wildtypallel ist ApoE3 beschrieben, das mit 78 % am häufigsten in der kaukasichen Bevölkerung vorkommt [Kolovou et al., 2009].

Die Hauptisoformen unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz an zwei Stellen: an Rest 112 und 158. Wie Weisgraber et al. herausstellten, enthält ApoE2 an beiden Stellen einen Cystein-Rest, ApoE3 einen (an Stelle 158) und ApoE4 keinen Cystein-Rest. Anstatt des Cysteins befinden sich hier Arginin-Reste [Weisgraber et al., 1981]. Diese Änderungen in der Aminosäuresequenz haben Auswirkungen auf die Affinität des ApoE zu seinen Rezeptoren und damit auf den Abbau von ApoE-haltiger CR, sowie den Plasma-LDL-Cholesterin-Spiegel.

Aus der Aminosäuresequenz schlossen Rail et al. auf eine Sekundärstruktur, die zu 62% aus Alphahelix, 9% aus Betafaltblatt, 11% aus Betaschleifen und zu 18% aus zufälligen Schleifen besteht [Rail et al., 2008]. Das aminoterminale Ende besteht aus vier Helices [Wilson et al., 1991] und bildet die rezeptorbindende Domäne. Das carboxyterminale Ende ist für die Interaktion mit Lipiden zuständig.

Obwohl der funktionelle Zusammenhang unklar ist, gilt die Isoform ApoE4 als Risikofaktor, an Morbus Alzheimer zu erkranken [Bettens et al., 2010].

ApoE wird als Bestandteil der VLDL in die Blutbahn abgegeben und anschließend umverteilt. Daneben findet sich auch frei zirkulierendes ApoE im Plasma, wovon 90% von der Leber produziert wird [McLean et al., 1983; März et al., 1988; Elshourbagy et al., 1995]. Die restlichen 10% entstammen hauptsächlich den Makrophagen.

Der Anteil von ApoE auf neu synthetisierten VLDL ist relativ gering. ApoC hemmt die vorzeitige Aufnahme der VLDL in die Leber. Durch die endotheliale Lipase werden die Triglyzeride hydrolytisch gespalten und vom peripheren Gewebe aufgenommen. Im Laufe der Umbauprozesse verlieren die VLDL ApoC, der Cholesteringehalt steigt und weitere ApoE werden via HDL auf die entstehenden VLDL-Remnants übertragen. Damit steigt die Affinität der Lipoproteinpartikel für ihre Rezeptoren und eine Aufnahme in die Leber wird möglich.

ApoE gilt als Ligand vieler verschiedener Lipoproteinrezeptoren. Der wohl am besten untersuchte Rezeptor ist der LDL-Rezeptor. Daneben bindet es an LRP, VLDL-Rezeptor (VLDL-R), Lipolysestimulierter Rezeptor (LSR), ApoE-Rezeptor2,

Sortilin-Related-Rezeptor 1 (SORL1). Besonders für die LRP vermittelte Aufnahme spielt die Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) eine große Rolle, da sie die Internalisierung erleichtert. Daneben konnten Ji et al. zeigen, dass auch ein geringer Teil der ApoE-haltigen Remnants direkt über HSPG aufgenommen werden können [Ji et al., 1994]. Zusätzlich wird von den Hepatozyten ApoE aus intrazellulären Vesikeln an den Disse-Raum abgegeben und somit die Bindung an die Rezeptoren verstärkt [Shimano et al., 1994]. Die Remnants werden in Endosomen aufgenommen und lysosomal abgebaut. Im Gegensatz zu ApoB konnte für ApoE gezeigt werden, dass es dem Abbau entgeht, zum Großteil recycelt und wieder an das Plasma abgegeben wird [Fazio et al., 1999; Heeren et al., 1999]. Dieser Kreislauf wird auch als Secretionrecapture-Mechanismus bezeichnet.

Kontrovers wird die Rolle des freizirkulierenden und intrazellulären ApoE diskutiert. Das freizirkulierende ApoE entstammt hauptsächlich der Leber. ApoE-Knockout-Mäuse sind unter anderem dadurch charakterisiert, dass sie im Plasma erhöhte Cholesterinwerte haben. Dies erklärt sich durch einen Wegfall der ApoE vermittelten CR- und VLDL-R- Clearance. Linton et al. konnten zeigen, dass sich die Cholesterinspiegel der ApoE-Knockout-Mäuse nach Knochenmarktransplantation wieder normalisierten, obwohl der ApoE Gehalt des Plasmas nur bei 10% des normalen Levels entsprach [Linton et al., 1995]. Demnach muss hier das ApoE, das in Makrophagen exprimiert wird, für die Remnant-Aufnahme verantwortlich sein. Des Weiteren produzieren ApoE-Knockout-Mäuse deutlich weniger VLDL, der hepatische Triglyzerid- und Cholesteringehalt dagegen ist erhöht [Kuipers et al., 1996]. Dies unterstützt die Annahme, dass ApoE für die Produktion von triglyzeridreichen Lipoproteinen von großer Bedeutung ist. Der genaue Mechanismus ist dennoch unklar, da die Leber auch trotz ApoE-Defizienz VLDL herstellt. Diese VLDL sind in ihrem Durchmesser kleiner (38nm) als VLDL, die mit der Präsenz von ApoE synthetisiert werden (49nm) [Kuipers et al., 1997].

Daneben spielt ApoE in vielen anderen biologischen Prozessen eine Rolle. Beispielsweise unterstützt es die Präsentation lipidhaltiger Antigene [van den Elzen et al., 2005] und hemmt die Thrombozytenaggregation [Pedreño et al., 2000].

9

2.2.2 LRP1

LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein 1*) gehört zur Familie der LDL-Rezeptoren, dessen Ligand unter anderem ApoE ist [Beisiegel et al., 1989]. Das Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 12 und wird unter anderem in der Leber, in den Gefäßen und im Gehirn exprimiert.

Das 4544 Aminosäuren große Protein ist ein Dimer aus einer 515 kDa großen extrazellulären Domäne, der α-Untereinheit, und einer 85 kDa großen Transmembrandomäne, der β-Untereinheit. Damit gehört es zu den größten Membranproteinen. Charakteristisch für die Familie der LDL-Rezeptoren sind verschiedene Motive: Cystein-reiche Komplement-artige Wiederholungen, EGF-Wiederholungen,
ß-Propeller-Domänen, eine einfache Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne. Die extrazelluläre Domäne von LRP1 wird in vier unterschiedlich viele Cystein-reiche Cluster unterteilt, in denen jeweils Wiederholungen vorkommen (siehe Abb. 2.3). Das in diesen Wiederholungssequenzen gebundene Calcium dient der Stabilisation.



Abb. 2.3 Schematische Darstellung von LRP1 und LDL-R

Alle Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Familie enthalten eine oder mehrere Cystein-reiche Komplement-artige Wiederholungssequenz, EGF-Wiederholungen, β-Propeller-Domänen (YWTD-Repeat), eine einfache Transmembrandomäne und einen intrazellulären Abschnitt, in dem sich das NPXY-Motiv befindet. [2.3]

Die meisten Liganden binden an Cluster II und IV; ApoE bindet an Cluster II.

Des Weiteren enthält LRP1 mehrere Regionen, in denen auf zwei Cystein-reiche EGF-ähnliche Wiederholungssequenzen ein YWTD-Repeat (oder auch β-Propeller genannt) und im Anschluss erneut eine EGF-ähnliche Wiederholungssequenz folgt. Sie spielen eine Rolle beim Lösen des Liganden vom Rezeptor in Endosomen [Davis et al., 1987].

Die zytoplasmatische Domäne enthält 100 Aminosäuren und zwei NPXY-Motive. Letztere interagiert mit verschiedenen Proteinen, die als Adapterproteine funktionieren und die Genexpression beeinflussen.

Erstmalig wurde LRP1 1988 von Herz et al. kloniert und bereits als "recycelnder Lipoproteinrezeptor mit möglicherweise wachstumsmodulierenden Effekten" beschrieben, da es eine große Homologie u.a. zum Wachstumsfaktor EGF aufweist [Herz et al., 1988].

Wie bereits angedeutet spielt LRP1 in zwei zentralen biologischen Prozessen eine wesentliche Rolle: der Endozytose sowie der Signaltransduktion. Seine Vielfältigkeit wird unter anderem dadurch deutlich, dass es über 50 verschiedene Liganden, zu denen neben Lipoproteinen auch Protease-Komplexe, bakterielle Toxine, Viren, Wachstumshormone und Zytokine zählen, bindet [May et al., 2005; Lillis et al., 2008].

Auf Hepatozyten übernimmt LRP1 die Aufgabe der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Plasmaproteinen wie α 2-Makroglobulin, einem Proteaseinhibitor, und dem Blutgerinnungsfaktor VIII. Aber auch im Stoffwechsel spielt LRP1 in der Leber eine zentrale Rolle. Hier ist es neben dem LDL-Rezeptor für die Aufnahme von ApoE-haltigen Remnants verantwortlich. Nachdem sie in den Disse-Raum gelangt sind, werden sie zunächst von HSPG sequestiert. Dann werden sie durch die LpL und die hepatische Lipase weiter umgebaut, bevor sie von den Hepatozyten per HSPG, LDL-R oder als HSPG/LRP1-Komplex aufgenommen werden [Mahley et al., 2007]. Laatsch et al. konnten zeigen, dass Insulin die Aufnahme der Cylomikronenremnants beeinflusst. Postprandial kommt es physiologischer Weise zu einer Insulinausschüttung durch das Pankreas. Dies ist für die schnelle Glukoseaufnahme durch z.B. GLUT4 (Glukosetransporter 4) essentiell. Daneben fördert Insulin die Translokation von LRP1 aus intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran, was zu einer erhöhten postprandialen Clearance von CRs führt [Laatsch et al., 2009]. Die Aufnahme der CRs mitsamt des Rezeptors erfolgt durch Einstülpungen der Plasmamembran in sogenannten "coated pits", sodass Endosomen entstehen. Im Gegensatz zu LDL-R wird LRP1 zu einem Großteil abgebaut und entsprechend neu synthetisiert [Lund et al., 1989]. LDL-R und ApoE werden recycelt.

In den Gefäßwänden bildet LRP1 mit dem Rezeptor für den Wachstumsfaktor PDGF (*platelet-derived growth factor*) einen Komplex und verhindert so die

Migration von Zellen glatter Muskulatur (*smooth muscle cells*, SMC). Ein Knockout von LRP1 in den SMC der Gefäßwände in Mäusen führt durch eine Überexpression von PDGF-Rezeptor zu einem verstärkten PDGF-Signaling. Histologisch zeigen die Gefäße Risse in der Lamina elastica, verstärkte SMC-Proliferation und neigen zur Aneurysmabildung. Ebenso zeigt sich eine verstärkte, durch Cholesterin induzierte, Artherosklerosebildung [Boucher et al., 2003]. Durch die Behandlung mit Imatinib, einem Proteinkinase-Inhibitor, der für die Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie und anderen onkologischen Erkrankungen eingesetzt wird, konnten diese Veränderungen reduziert werden.

In Neuronen des zentralen Nervensystems reguliert LRP1 den Metabolismus von APP (*amyloid precursor protein*) [Kounnas et al., 1995]. APP ist ein Membranprotein, das vermutlich für die Bildung von Synapsen eine Rolle spielt. Durch Spalten des APP durch die β - und γ -Sektretasen entsteht bei der Alzheimererkrankung das sogenannte β -Amyloid, das maßgeblich an der Plaquebildung im Gehirn der Patienten beteiligt ist. LRP1 wird für die Endozytose und den Abbau von β -Amyloid benötigt. Mit dem Alter nimmt die LRP1-Expression im Gehirn physiologisch ab, jedoch ist die Expression LRP1 in Gehirnen von an Alzheimer Erkrankten signifikant geringer, als in der Kontrollgruppe [Kang et al., 2000].

Ein drittes Gewebe, das im Hinblick auf die Funktion von LRP1 relativ gut untersucht ist, ist das Fettgewebe. Hier ist es mitverantwortlich für die postprandiale Fettclearance, die Regulation der Fettspeicher und des Körpergewichts. Ein Knockout von LRP1 in Adipozyten von Mäusen führt zu einer verbesserten Glukosetoleranz und einer Resistenz gegen eine Fett-induzierte Fettleibigkeit [Hofmann et al., 2007].

Neben den beschriebenen Aufgaben, spielt LRP1 ebenso eine Rolle bei der Zellmigration [Okada et al, 1996; Orr et al., 2003], der posttranslationalen Modifikation von β 1-Integrin [Goultier et al., 2006] sowie dem Invasionsverhalten von Tumorzellen [Song et al., 2004].

LRP1 ist einer der komplexesten bekannten Rezeptoren mit multifunktionalen Aufgaben. Seine Wichtigkeit wird unter anderem dadurch deutlich, dass ein Knockout von LRP1 in Mäusen bereits in der Embryonalphase zum Tode führt. Aus diesem Grund erfordert es in den Tiermodellen einen gewebespezifischen Knockout, um die Funktionen von LRP1 zu untersuchen. Dies wird in der vorliegenden Arbeit mittels des Cre-loxP-Systems unter dem Albumin-Promotor erreicht (siehe Kapitel 3.2.1).

2.3 Leberregeneration

Bereits in der antiken griechischen Mythologie war bekannt, dass die Leber eine einzigartige Regenerationsfähigkeit besitzt. Prometheus, Sohn der Titanin Klymene (oder Themis) und Handwerker- und Töpfergott, war als Freund und Wohltäter bei den Menschen beliebt. Nachdem Zeus den Menschen das Feuer genommen hatte, stahl Prometheus es und brachte es ihnen zurück. Daraufhin bestrafte Zeus Prometheus, indem er ihn an den Kaukasus fesseln ließ. Er ließ einen Adler einen Teil von Prometheus' Leber fressen, die daraufhin wieder nachwuchs. Dies wiederholte sich von nun an täglich, bis sich Prometheus durch einen Handel befreien konnte.

Die Leber ist das einzige Organ des Menschen, das sich ohne Stammzellen regenerieren kann. Ausdifferenzierte, ruhige Hepatozyten, die sich in der GO-Phase befinden, treten wieder in den Zellzvklus ein, proliferieren und teilen sich [Taub et al., 2004; Oertel et al., 2007; Alison et al. 2009]. Dies geschieht so lange, bis die Leber ihre volle funktionelle Größe erreicht hat. Ebenfalls einzigartig für die Leber ist ihr geringes altersabhängiges Funktionsdefizit. Ihre Regenerationsfähigkeit in Bezug auf die Regenerationsrate nimmt zwar mit zunehmendem Alter ab, die Kapazität und das endgültige Volumen nach Regeneration sind jedoch gleich derer jüngerer Organe [Schmucker et al., 2011]. Mittlerweile ist viel über die Signalkaskaden, die zur Aktivierung und Proliferation der Hepatozyten führen, bekannt. So spielen zahlreiche Zytokine und

Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle.

Ein Modell, um Vorgänge der Leberregenration zu untersuchen, das auch in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, ist die partielle Hepatektomie (PH) nach Higgins und Anderson an Nagetieren [Higgins et Anderson, 1931]. Nachdem zwei Drittel der Leber entfernt wurden, regeneriert sich der restliche Teil innerhalb ca. einer Woche auf die funktionell optimale Größe. Dabei wachsen die resizierten Leberlappen nicht nach, sondern die verbliebenen Lappen vergrößern sich entsprechend.

Die Signalkaskaden, die zur Aktivierung der Hepatozyten und deren Proliferation führen, sind umfassend untersucht. Es werden zwei Hauptsignalwege - einerseits

Zytokin- und andererseits Wachstumsfaktor-vermittelt - beschrieben. Wie in Abbildung 2.4 dargestellt, aktivieren Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) Hepatozyten, die sich in der G0-Phase befinden [Akerman et al., 1992]. Beide werden von Kupfferzellen sekretiert. Der wachstumsvermittelte Weg wird durch die Stern- bzw. Ito-Zellen aktiviert, die über *hepatocyte-growth-factor* (HGF) die Hepatozyten stimulieren [Fausto et al., 1995]. Daneben haben zahlreiche andere Faktoren einen Einfluss auf Aktivierung und Inhibierung der Hepatozyten, wie beispielswiese Insulin und *transforming*-growth-factor- β (TGF- β) [Taub, R., 2004].



Abb. 2.4 Übersicht über die Aktivierung der Hepatozyten nach partieller Hepatektomie

Nach partieller Hepatektomie bzw. Schädigung der Leber, werden vom Magen-Darm-System Lipopolysaccharide (LPS), die auf die Kupfferzellen wirken, ausgeschüttet. Diese wiederum sekretieren IL-6 und TNF- α , die zu einer Aktivierung der reifen, ausdifferenzierten Hepatozyten führen. Daneben werden von den Ito- bzw. Sternzellen Wachstumsfaktoren, hauptsächlich HGF, sezerniert, die ebenfalls bewirken, dass die Leberparenchymzellen aus der G0-Phase in die G1-Phase treten und somit anfangen zu proliferieren. Daneben gibt es zahlreiche andere Faktoren, die eine Rolle spielen, wie Insulin und Noradrenalin. TGF- β gilt dagegen als Inhibitor der Proliferation. [2.4]

Die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor führt zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) in den Hepatozyten. Als Homodimer wirkt es als Transkriptionsfaktor für verschiedene

Plasmaproteine und "intermediate-early"-Gene wie c-Jun, NF-κB (*nuclear factor κB*) und C/EBPß-Proteine (*CCAAT/enhancer binding protein*) [Costa el al., 2003]. Gehemmt wird STAT3 über SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*). Ein Knockout für SOCS3 führt zu einer deutlich höheren Proliferationsrate der Hepatozyten und einem durchschnittlich zwei Tage früheren Erreichen der endgültigen Lebermasse in Mäusen nach partieller Hepatektomie [Riehle et al., 2008] wohingegen STAT3-Knockout-Mäuse eine auf ein Drittel reduzierte DNA-Syntheseleistung nach PH aufweisen, als STAT3 exprimierende Mäuse [Li et al., 2002; Yin et al., 2011].

Während der frühen Phase nach partieller Hepatektomie kommt es zu einer starken, vorübergehenden Lipidakkumulation von hauptsächlich Triglyzeriden in den Hepatozyten. Die Serumkonzentration von HDL sinkt und die LDL-Konzentration nimmt deutlich zu [Narayan et al., 1968].

Während der Regeneration benötigt die Leber viele Fette, um Membranen aufzubauen und den Energiehaushalt aufrecht zu erhalten. Da jeder Hepatozyt im Durchschnitt 1,4-mal während der Regenerationsphase seine DNA repliziert [Alison et al., 2009], ist der akkumulierte Fettgehalt jedoch zu hoch, um allein dem Membranaufbau zu dienen.

Nach 12 Stunden erreicht der Fettgehalt seinen Höhepunkt und ist nach 48 Stunden kaum noch in der Oil-Red-O-Färbung sichtbar [Shteyer et al., 2004].

Neben der Funktion ist unklar, welche Mechanismen für die Lipidakkumulation die entscheidende Rolle spielen. Shteyer et. al. fanden heraus, dass Gene hochreguliert werden, die ähnlich bei der Ausdifferenzierung von Adipozyten induziert werden.

Des Weiteren zeigte die Arbeit von Fernández et. al., dass Caveolin-1, ein Protein, das für die Ausbildung von Einbuchtungen der Plasmamembran von Hepatozyten mitverantwortlich ist, wesentlich zur Akkumulation von Triglyzeriden beiträgt [Fernández et al., 2006; Mastrodonato et al., 2012]. Mäuse, die Caveolin-1defizient waren, akkumulierten deutlich weniger Fette, die Regenerationsfähigkeit der Leber war beeinträchtigt und ihre Überlebensrate war geringer, als die von Wildtypmäusen. Die Caveolae der Hepatozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Proliferation und Lipogenese der Leber [Frank et al., 2001].

2.4 Klinische Relevanz der Leberregeneration

Dyslipoproteinämie, Hypertonie Stammbetonte Adipositas, und eine Glukosetoleranzstörung Insulinresistenz sind die entscheidenden bzw. Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung (KHK) und werden zusammengefasst als metabolisches Syndrom bezeichnet. Die Prävalenz des metabolischen Syndroms liegt in Deutschland zurzeit bei über 20% der erwachsenen Allgemeinbevölkerung (18-79 Jahre) [Neuhauser et al., 2005]. Manifestiert sich das metabolische Syndrom in der Leber, kommt es zunächst zu einer reinen Fettleber (NAFLD = non-alcoholic fatty liver disease), kann über einen längeren Zeitraum im Rahmen einer entzündlichen Reaktion zu einer Nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH = non-alcoholic steatohepatitis) und schließlich einer irreversiblen mikronodulären Leberzirrhose ("Fettzirrhose") führen. Ein Teil der Erkrankten entwickelt darüber hinaus ein hepatocelluläres Carcinom (HCC). Da die Fettleber an sich keine typischen Symptome verursacht und Patienten mit einer NASH nur zu 50% unspezifische Beschwerden wie Müdigkeit/Abgeschlagenheit äußern, ist die Diagnosestellung äußerst schwierig. Des Weiteren ist eine Differenzierung zwischen NAFLD, NASH und Zirrhose nur durch eine histologische Untersuchung möglich.

In der Histologie wird eine Fettleber diagnostiziert, wenn mehr als 5-10% des Lebergewichts aus Fetten besteht, oder wenn in mehr als 50% der Hepatozyten mittel- bis großtropfige Fettakkumulationen erkennbar sind. Generell ist eine beginnende Verfettung erst ab einem Lipidgehalt von mindestens 3% lichtmikroskopisch sichtbar (Normwerte 0,8-1,5% des Lebergewichts). Ab einem Fettgehalt von 5% spricht man von einer pathologischen Verfettung der Leber und ab 50% von einer Fettleber.

Die Prävalenz der NAFLD wird mit 20-30% in der westlichen Bevölkerung angegeben, bei Kindern 3-10% und unter adipösen Kindern sogar 40-70% [Bellentani et al., 2010]. Die Indikation zur Lebertransplantation aufgrund einer NAFLD wird zunehmend gestellt.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Aqua injectabilia	Braun, Melsungen	
Bromphenolblau, 10%	Merck, Darmstadt	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen	
Ethanol absolut	Sigma, Deisenhofen	
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma, Deisenhofen	
Folin-Ciocalteau-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt	
Glycerol	Sigma, Deisenhofen	
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe	
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen	
LE Agarose	SeaKem, Rockland, USA	
Marker für 100 bp	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe	
2-Mercaptoethanol	Serva	
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe	
Milchpulver	Spinnrad, Norderstedt	
NaCI-Lösung, 0,9%	B. Braun	
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Deisenhofen	
PCR-Puffer (10x)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe	
Ponceau S	Serva	
Rainbow Molecular Weight Marker RPN 800	Amersham/GE Healthcare, München	
SDS	Sigma, Deisenhofen	
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (TRIS)	Sigma, Deisenhofen	
Trizma Base	Sigma, Deisenhofen	
Wasser	wurde mit einem BiDestder Firma	
	F.Gössner, Hamburg, doppelt destilliert	
	und autoklaviert.	

3.1.2 Enzyme / Proteine

Bovines Serum Albumin (BSA)

Sigma, Deisenhofen

Proteinase K (10mg/ml)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe

3.1.3 Nukleotide

Desoxyadenosintriphosphat (dATP) Desoxycytidintriphosphat (dCTP) Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) Desoxythymidintriphosphat (dTTP) Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe

mwg Biotech AG, Ebersberg
mwg Biotech AG, Ebersberg

3.1.5 Antikörper

АроЕ	rabbit anti human	Dako, Glostrup
LDL-R	goat anti mouse	R&D Systems
LRP1	sheep anti mouse	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
PCNA	mouse anti mouse	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA

GARPO (Peroxidase conjugated	Jackson Immuno Research, West Grove,
Affini Pure Goat anti Rabit IgG),	PA, USA
DASHPO (donkey anti sheep peroxidas	se),
donkey anti chicken peroxidase,	
GAMPO (goat anti mouse peroxidase)	

3.1.6 Narkosemedikamente

Ketanest (Ketamin) 100 mg/ml	Gräub AG, Bern
Xylazin (Rompun) 2 %	Bayer Vital, Leverkusen

3.1.7 Analgesie

Metamizol (Novaminsulfon)

Ratiopharm, Ulm

3.1.8 Nahtmaterial

Nähfaden:	Premilene®, USP 5/0,75cm	Braun, Tuttlingen
Abbindfaden:	Dagrofil®, USP 1, 3x45cm	Braun, Tuttlingen

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikverbrauchsmaterialen wurden soweit nicht anders bezeichnet, von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland), Falcon (Becton Dickinson Labware, USA) und Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bezogen.

Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell
Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
Nitrocellulosemembran Whatman	Schleicher & Schuell
Porengröße 0,45 µm	
NuPage Novex Bis-Tris Mini Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
PCR-Tubes	Corning Inc., New York, USA
Spritzen	BD Discardit II, Spanien
Röntgenfilm Hyperfilm ECL	Amersham/GE Healthcare

3.1.10 Geräte

Biotrak II Plate Reader	Amersham/GE Healthcare	
Digitalkamera IXUS 65	Canon	
Elektrophoresekammer Whide	Bio-Rad, Hercules, CA, USA	
Mini-Sub Cell GT		
Entwicklungsmaschine X-OMAT	Kodak	
1000 Processor		
Feinwaage BP 410S	Sartorius	
Gel-Elektrophoresekammer	Biorad, München	
PCR-Thermocycler TP48	Biometra, Göttingen	
Pipettierhilfe Accujet	Brand	
Power Supply Power PAC 200	Biorad	
Scanner scanjet 3970	hp	
Tissue Lyser	Qiagen, Retsch	
UV-Detektor mit Digitalkamera	Bachhofer Laboratoriumsgeräte, BDA	
	Digital Biometra	
Vortexer REAX 2000	Heidolph	

Warmhalteplatte	Medax
Wärmebad	GFL
Zentrifugen	
- Tischzentrifuge Typ 1-15 K	Sigma
- Laborzentrifuge Rotana TRC	Hettich

3.1.11 Mauslinien

Für die erste Studie wurden Tiere der ApoE-Knockout-Linie untersucht. Der zweite Teil wurde mit Tieren der LRP1 flox Linie mit und ohne Expression der Rekombinase unter dem Albuminpromotor durchgeführt.

Beide Linien entstammen einem C57Bl6-Hintergrund. Die Tiere wurden in der Versuchstierhaltung des UKE bei normaler Nager-Diät und einem zirkadianen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Sie hatten jeder Zeit freien Zugang zu Futter und Wasser.

3.2 Methoden

3.2.1 Cre-loxP- System

Das Cre-loxP-System wurde 1981 von Sternberg und Hamilton zum ersten Mal in Bakteriophagen P1 beschrieben [Sternberg et Hamilton, 1981]. Dieses System ermöglicht ein Zelltyp- bzw. gewebespezifischen Knockout eines Gens. Das Cre (cyclization recombination)-Protein ist eine Topoisomerase Typ 1, die die Rekombination von DNA zwischen zwei bestimmten Stellen katalysiert. Diese Stellen werden mittels loxP-Sequenzen markiert (auch floxen genannt). Sie sind 34bp groß und enthalten zwei verdrehte Wiederholungssequenzen á 13bp und eine dazwischen liegende 8bp große Abstandsregion [Stricklett et al., 1999]. Die Abstandsregion ist asymmetrisch und wird *locus of X-over in P1*, loxP genannt. Exprimiert eine Zelle die Cre-Rekombinase und enthält ihre DNA das gleichgerichtete gefloxte Zielgen, wird die doppelsträngige DNA heraus geschnitten, die Enden mittels Ligase aneinander gefügt sodass ein ringförmiges Stück DNA entsteht (siehe Abb. 3.1). Dieses wird in der Zelle abgebaut. Sollte die Zelle kein gefloxtes Gen enthalten, wird dieses normal exprimiert, da die loxP-Stellen in Introns integriert werden und somit nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen.



Abb. 3.1 Cre-loxP-System

Zur Generierung eines Cre-loxP vermittelten Knockouts werden zwei Mauslinien benötigt. Die erste exprimiert die Cre-Rekombinase unter einem bestimmten Promotor, in diesem Fall der Albuminpromotor. Das Zielgen, hier LRP1, wurde in Tieren der zweiten Linie mittels loxP-Sequenz markiert. Kreuzt man beide Mauslinien, erhält man in der Tochtergeneration Tiere, die sowohl Cre-Rekombinase exprimieren, als auch gefloxt sind. Da die Rekombinase unter dem Albuminpromotor exprimiert wird, erhält man einen leberspezifischen Knockout des LRP1. Modifiziert nach [3.1].

3.2.2 Genotypisierung der Mauslinien

Um die Mäuse genotypisieren zu können, wurde zunächst aus einer Schwanzbiopsie DNA gewonnen. Mittels PCR wurden bestimmte DNA-Abschnitte vervielfacht und schließlich gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Bei den Arbeiten mit DNA-Material wurde ausschließlich mit autoklavierten Geräten und Verbrauchsmaterialien gearbeitet, um mögliche Kontaminationen mit Fremd-DNA und damit falsche Ergebnisse ausschließen zu können.

3.2.2.1 Isolierung der DNA

Zur Isolierung der DNA wurde den Mäusen eine Gewebeprobe der Schwanzspitze entnommen und in ein 1,5ml Eppendorf-Tube gegeben. Versetzt mit 700µl STE-Puffer und 12,5µl ProteinaseK wurde die Biopsie über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator verdaut. Am nächsten Morgen wurden 70µl 10%-SDS hinzugegeben. Nach einer Kühlung auf Eis von 5 Minuten wurden 275µl gesättigte Kochsalzlösung hinzugefügt, woraufhin erneut eine Kühlung von 10 Minuten erfolgte. Anschließend wurden die Tubes für 15 Minuten bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert. 500µl des Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und mit 1000µl 100%igem Ethanol versetzt, wobei das DNA-Präzipat ausfiel. Nach gründlichem Vortexen wurde erneut bei 4°C und 14000rpm 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mit 200µl 70%igem Ethanol gewaschen. Es erfolgte der nächste Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14000rpm für 5 Minuten woraufhin wieder der Überstand abpipettiert wurde. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und mit 70µl Aqua dest. resuspendiert. Das so gewonnene DNA-Isolat wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C und nach Auswertung bei –20°C gelagert.

STE-Puffer: 100 mM NaCl 20mM Tris pH 7,5 10mM EDTA 1% SDS

3.2.2.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfachung definierter DNA-Abschnitte, die dadurch detektierbar gemacht werden. Es wurden 1µl der zuvor isolierten DNA mit dem entsprechenden Mastermix versetzt und im Thermocycler vervielfältigt. Dabei wurde die DNA zunächst für 1min bei 94°C denaturiert und anschließend in mehreren Zyklen vervielfältigt. Bei jeder PCR wurde eine Probe ohne DNA versetzt, um Kontaminationen ausschließen zu können. Des Weiteren liefen zu jeder PCR eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit.

Mastermix ApoE je Probe:		2,5µl PCR Puffer ohne MgCl2	
		1µI MgCl2	
		1µl dNTPs	
		17,2µl dd. H2O	
		je 0,6µl Primer ApoE	
		0,5µl Taq-Polymerase	
Primer:	ApoE180 (20pm	ol) 5'-GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG-3'	
	ApoE181 (20pm	ol) 5'-TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C-3'	
	ApoE182 (20pm	ol) 5'-GCC GCC CCG ACT GA TCT-3'	

Die Proben wurden in 40 Zyklen zu je 3min 95°C 20sec bei 95°C, 40sec 62°C, 2min 72°C durchgeführt.

Mastermix CreAlb je Probe: 2,5µl PCR Puffer ohne MgCl2 2µl MgCl2 1µl DMSO 1µl dNTPs 17µl dd. H2O 1µl creAlb-for 1µl creAlb-for 1µl creAlb-rev 0,5µl Taq-Polymerase Primer: CreAlb-for 5'-GCA CTG ATT TCG ACC AGG TT-3' CreAlb-rev 5'-CCC GGC AAA ACA GGT AGT TA-3'

Die Proben wurden in 30 Zyklen zu je 30sec bei 94 °C, 30sec bei 60 °C und 30sec bei 72 °C durchgeführt.

Mastermix	LRPflox je Probe:	2,5µl 10xPCR-Puffer
		2µI MgCl2 (50mM)
		1µl dNTPs
		14µl dd. H2O
		1µI LRPpostflox (10pmol)
		1µl LRPint (10pmol)
		0,5µl Taq-Polymerase
Primer:	LRP1 5'-CAT AC	C CTC TTC AAA CCC CTT CCT G-3

LPR2 5'-GCA AGC TCT CCT GCT CAG ACC TGG A-3'

Die Proben wurden in 37 Zyklen zu je 1min bei 94°C, 30sec 65°C und 30sec 72°C durchgeführt.

3.2.2.3 Gelelektrophorese

Zur abschließenden Detektion der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde zunächst ein 2%iges Agarosegel gegossen. Hierfür wurden 100ml TBE-Puffer mit 2g Agarose in der Mikrowelle bei 600W so lange erhitzt, bis sich die Agarose komplett löste und die Flüssigkeit mindestens einmal kochte. Anschließend wurde das Gel auf 60°C herabgekühlt, mit 3µl Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer mit 20-zähnigem Kamm gegossen. Sobald sich das Gel verfestigte, wurde der Kamm gezogen und das Gel im Schlitten in eine Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer gelegt. Die Taschen wurden nun mit 15µl der jeweiligen Proben bestückt. Diese wurden zuvor mit 8µl Ladepuffer versetzt. Zur Orientierung wurde in die erste Tasche 15µl eines PCR-Markers gegeben. Bei einer Spannung von 120V wurden die Proben in ca. 45 Minuten aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht betrachtet und digital abfotografiert.

	bp ng/	0.5µg	%
1% TopVision" LE GQ Agarose (#R0491)	10000 8000 5000 5000 2500 2500 1500 1200 1500 1200 1000 500 500 500 500 500 100 500 100	18.0 18.0 18.0 18.0 16.0 16.0 16.0 17.0 17.0 17.0 20.0 20.0 20.0	3.5666666 3.33333 3.3333 12.0 4.4444 4.0 4.0 4.0 4.0
1X TAE, 7V/cm.	45min	yei,	

Abb. 3.2 GenRuler DNA Ladder Mix

TBE-Puffer (10fach):	108g Trisbase
	55g Borsäure
	40ml 0,5M EDTA, pH 8,0
	in 1l Aqua dest.
Ladepuffer:	500µl 10% Bromphenolblau
	6ml Glycerol
	13,5ml H2O
PCR-Marker:	15µl GeneRuler DNA Ladder Mix
	50µl dd.H2O
	17,5µl Ladepuffer

3.2.3 Partielle Hepatektomie nach Higgins und Anderson 1931

Nach intraperitonealer Verabreichung von 10ml Narkoselösung pro kg Körpergewicht wurde den 10-12 Wochen alten Mäusen 5 Minuten später ebenfalls intraperitoneal 100µl des Analgetikumgemischs gespritzt. Sobald die Tiere sediert waren, wurden die Augen zum Schutz vor Austrocknung und somit zur Vorbeugung von Entzündungen im Augenbereich mit Augensalbe bedeckt, da unter Narkose die Schutzreflexe ausfallen.

Um die physiologische Körpertemperatur der Mäuse von 36,5-38°C aufrechtzuerhalten, wurde auf sterilen, im Wasserbad erwärmten, Kühlakkus operiert.

Bei vollständiger Reaktionslosigkeit nach appliziertem Schmerzreiz und Desinfizierung der Bauchdecke mit 70%igem Ethanol, wurden nacheinander ein vertikaler Schnitt links der Mittellinie bis zum Processus Xiphoideus im Fell und im Peritoneum durchgeführt und somit die Bauchhöhle geöffnet. Mithilfe zweier gestielter Tupfer wurde zunächst der mittlere Leberlappen einschließlich Gallenblase der Bauchhöhle entnommen, abgebunden und resiziert. Im Anschluss wurde der linke Leberlappen operativ entfernt (siehe Abb. 3.3). Sollte es dabei zu Blutungen gekommen sein, wurden die Gefäße mittels eines Kauters verödet. Zusammen entspricht der resizierte Anteil der Leber 60% [Martins et al., 2008].



Abb. 3.3 Anatomie der Mäuseleber

Schema der anatomischen Verhältnisse der Oberbauchorgane der Labormaus. Dunkelbraun repräsentieren die in der vorliegenden Arbeit resizierten Leberanteile (60% der Leber), hellbraun die verbleibenden 40% der Leber. Modifiziert nach [3.3]. Nach erfolgreicher 60% iger Resektion der Leber wurden nacheinander Peritoneum und Fell vernäht. Postoperativ wurde den Mäusen 100µl 0,9% NaCl-Lösung subkutan appliziert und bis zum Erwachen wurden sie auf Warmhalteplatten bei physiologischer Körpertemperatur gehalten. Bis zum Zeitpunkt der endgültigen Blut- und Organentnahme wurden die Tiere weiterhin bei zirkadianem Tag-Nacht-Rhythmus, freiem Zugang zu Futter und Wasser sowie bei Standard-Nager-Diät gehalten. In den ersten Tagen postoperativ wurde ihnen in Wasser gelöstes Standardfutter im Käfig angeboten.

120µl Ketanest 100 mg/ml	
80µl Rompun 2%	
800µl 0,9% NaCl-Lösung	
250µl Novaminsulfon	
ad 1ml 0,9% NaCl-Lösung	

Augen- und Nasensalbe: Bepanthen®, Bayer Vital, Leverkusen

3.2.4 Proteinbestimmung nach Lowry

Um den Proteingehalt der Leber zu bestimmen, wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt [Lowry et al., 1951]. Sie beruht auf zwei Reaktionen. Zunächst gehen Kupferionen mit den Peptidbindungen in alkalischer Lösung Komplexe ein. Im Anschluss reduzieren diese Kupferionen das hinzugefügte Folin-Ciocalteu-Reagenz, sodass es entsprechend dem Proteingehalt zu einer Blaufärbung der Probe kommt. Diese kann photometrisch bestimmt werden.

Ein Teil der resizierten Lebern wurde direkt nach Entnahme in Organschälchen in flüssigem Stickstoff bei -190°C gekühlt, sodass es zu einer schnellstmöglichen Gefrierung kam. Für die Proteinbestimmung wurden 50mg Gewebe in 250µl Zelllysispuffer in einem 2ml Eppendorf-Gefäß mithilfe des Tissuelysers zweimalig für 3min bei einer Frequenz von 20Hz homogenisiert. Die Proben mit Leberlysat sowie eine Probe mit reinem Zelllysispuffer wurden 1:40 in 0,1 NaOH verdünnt. Es erfolgte eine weitere Verdünnung von 1:4 mit NaOH, wobei auch eine Standardreihe Rinderserumalbumin (BSA) mit bekannten Konzentrationen von 2mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml, 0,063mg/ml und ein Leerwert von 0mg/ml verdünnt wurde. Nun wurden 1ml Lowry Lösung C hinzugegeben,

gevortext und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 100µl Folin-Gemisch hinzugegeben, erneut gevortext und die Proben 30min unter Lichtabschluss inkubiert. Zur photometrischen Bestimmung wurden 200µl in je 1 Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und bei 750nm die Extinktion gemessen. Durch die bekannten Konzentrationen der Standardreihe konnte der Proteingehalt der Proben errechnet werden.

Alle Proben wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Zelllysispuffer:	50mM Tris 2mM CaCl2 80mM NaCl
Lowry Lösung A:	2,0% Na2CO3
	2,0% Natriumkaliumtatrat
	in 0,1N NaOH
Lowry Lösung B:	0,5% CuSO4
	5,0% SDS
	in Aqua dest.
Lowry Lösung C:	Lösung A + Lösung B im Verhältnis 50:1
Folin-Gemisch (im Verhältnis 1:1):	Folin-Ciocalteau-Phenolreagenz
	Aqua dest.

3.2.5. Quantifizierung der Lipidspiegel

3.2.5.1 Quantifizierung der Lipidspiegel im Serum vor und nach partieller Hepatektomie

Zur Messung der Lipidspiegel im Serum vor und nach partieller Hepatektomie wurde den Tieren einige Mikroliter Blut abgenommen und anschließend bei 4°C, 13000rpm für 10min zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und bis zur nachfolgenden Analyse bei -20°C gelagert.

Sowohl die Messung der Triglyzeride, als auch des Cholesterins beruht auf einer enzymatischen Reaktion und photometrischer Detektion des Farbumschlags der Probe. Es wurde ein Standardpräzipat auf 15mg/dl, 7,5mg/dl, 3,75mg/dl, 2,5mg/dl, 1,25mg/dl und 0,5mg/dl mit PBS verdünnt. Sowohl von den Proben als auch des Standards wurden Doppelwerte bestimmt.

Bei Triglyzeriden handelt es sich um drei Fettsäuren, die mit Glyzerin, einem dreiwertigen Alkohol, verestert sind. Die im Reagenz enthaltene Lipoproteinlipase löst diese Esterbindung, sodass die Glyzerinkinase das Glyzerin zu Glyzerin-3-phosphat umsetzen kann. Dieses wird anschließend zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid oxidiert. Durch die Peroxidase wird mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol ein roter Farbstoff gebildet, dessen Intensität proportional zur Triglyzeridkonzentration ist.

Cholesterin ist ein polyzyklischer Alkohol, der in die Gruppe der Steroide gehört. Bei der Quantifizierung des Cholesteringehalts der Probe werden zunächst Cholesterinester in Cholesterin und freie Fettsäuren gespalten. Durch die Einwirkung der Cholesterinoxidase entsteht unter anderem Wasserstoffperoxid, das wie bei der Triglyzeridbestimmung zu einem roten Farbstoff umgesetzt wird. Auch hier ist die Farbintensität proportional zur Cholesterinkonzentration.

Die Serumproben wurden 1:30 mit PBS verdünnt, sodass alle gemessenen Werte innerhalb der Standardreihe lagen. Es wurden je 100µl verdünnte Probe bzw. Standard in ein Well einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200µl Triglyzerid- bzw. Cholesterin-Reagenz versetzt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte bei 37°C für 10min inkubiert und dann mittels Photometer die Extinktion bei 540nm bestimmt.

Cholesterin-Reagenz:CHOL, Roche/Hitachi 912Triglyzerid-Reagenz:TG, Roche/Hitachi 912

PBS: 8g NaCl (phosphat buffered saline) 0,2g KCl 1,44g Na2HPO4 0,24g KH2PO4 ad 1l Aqua dest.

3.2.5.2 Quantifizierung des Lipidgehalts der Leber vor und nach partieller Hepatektomie

Analog zur Quantifizierung der Lipidspiegel im Serum vor und nach pariteller Hepatektomie wurde der Triglyzerid- und Cholesteringehalt der Leber nach PH bestimmt. Dazu wurden die oben genannten Leberlysate entsprechend mit PBS verdünnt, sodass die gemessenen Werte innerhalb der Standardkurve lagen. Das weitere Vorgehen entspricht dem oben genannten. Schließlich wurden die gemessenen Werte auf den Proteingehalt bezogen.

3.2.6 Western Blot (Immunblot)

Der Western Blot dient dem quantitativen Nachweis von Proteinen. Ein primärer Antikörper bindet an ein spezifisches Protein, das als Antigen fungiert. Ein zweiter, Peroxidase gebundener Antikörper bindet an den primären. Ein hinzugefügtes Substrat wird von der Peroxidase umgesetzt, sodass Licht abgegeben wird. Dies kann wiederum über einen Röntgenfilm detektiert werden.

In dieser Arbeit wurden Western Blots der Leber durchgeführt. Hierzu wurden die oben genannten Leberlysate aufgetaut und Lysat, das 2mg Protein enthält, ad 200µl Zelllysispuffer vermischt. Nach Hinzugeben von 20µl 10-prozentigem SDS wurden die Proben erneut zweifach mit dem Tissuelyser homogenisiert. Nach dem Lysieren wurden die Proben bei Raumtemperatur (RT) 10min inkubiert und anschließend für 5min bei RT und 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mittels Proteinbestimmung nach Lowry der Proteingehalt ermittelt, wobei der erste Verdünnungsschritt 1:10 betrug.

Anschließend an die Proteinbestimmung wurden 200µg Gesamtprotein ad 100µl Zelllysispuffer gegeben und 50µl Mix reduziert (red.) hinzugefügt. Alle Proben, sowie eine Probe des Markers und eine Probe mit BSA als Laufkontrolle, wurden gevortext, 10min bei 60°C im Heizblock denaturiert und letztendlich kurz anzentrifugiert. "NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels" wurden in die Kammern gespannt, 500ml Ladepuffer in die Kammern gefüllt und jede Tasche der Gele wurde mit 20µl der Proben beladen. Die Proteine wurden bei einer konstant gehaltenen Spannung von 200V für ca.1h ihrer Größe nach aufgetrennt.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine in einer Blottingkammer bei 400mA für 2h auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierzu wurden die Gele unter Luftabschluss auf die Nitrozellulosemembran gelegt und zwischen zwei Filterpapiere und Schwämme in einen Kamm gespannt. Die Blottingkammer, die

mit Blotting Puffer randgefüllt war, wurde auf 4°C gehalten. Zur Kontrolle wurde anschließend die Nitrozellulosemembran in einem Bad aus Ponceau S 5min inkubiert, sodass alle Proteine unspezifisch markiert wurden. Überschüssiger Farbstoff wurde abgegossen und die Membran mittels Filterpapier getrocknet. Der Marker wurde nachgezogen, die Membranen zur Dokumentation eingescannt und gegebenenfalls den zu detektierenden Proteinen entsprechend geschnitten. Zum Entfärben wurde die Membran mehrfach in PBS gewaschen. Anschließend wurden mögliche unspezifische Bindungsstellen mit Blocking-Lösung für mindestens 30min blockiert. Um eine Verunreinigung des ersten Antikörpers zu verhindern, wurde die Membran kurz in PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C in einer Lösung des ersten Antikörpers inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran für 10min in PBS und 3mal für 10min in TBS-Tween (TBS-T) gewaschen. Nun wurde sie mit dem sekundären Antikörper für 90min inkubiert und im Anschluss erneut 3mal für 10min in TBS-T und einmal 10min in PBS gewaschen. In einer Filmkassette wurde die Membran für 2min mit 2ml Substrat inkubiert. Anschließend wurde das Substrat mit Filterpapier abgetragen.

In der Dunkelkammer wurden die Röntgenfilme, die entsprechend belichtet wurden, zunächst in ein Fixierbad, anschließend in ein Entwicklungsbad und letztendlich zur Reinigung in ein Wasserbad gegeben. Um die Ergebnisse weiter zu dokumentieren wurden die Filme eingescannt und digital gesichert.



Abb. 3.4 Rainbow Molecular Weight Marker (RPN800)

Marker für Western Blot [3.4]
Mix reduziert:	Teile 10%SDS in 0,25M Tris pH8,0		
	1 Teil 87%Glycerol + Bromphenolblau		
	1 Teil Mercaptoethanol		
Marker:	3µl Marker RPN800		
	7µl dd. H2O		
	10µl Mix red.		
BSA:	1µl BSA 2mg/ml		
	9µl dd. H2O		
	10µl Mix red.		
Ladepuffer:	25ml 20x NuPAGE® MES SDS Running Buffer		
	ad. 500ml dd. H2O		
Blotting Puffer:	56,2g Glycin		
	12,1g Tris		
	1l Methanol		
	ad. 5l Aqua dest.		
Plaaking Lägung	10g Miloboulvor		
DIOCKING-LOSUNG.			

Primärantikörper:	anti ApoE aus Kaninchen	n 1:5000	
	anti LDL-R aus Huhn	1:200	
	anti LRP Dolly aus Schaf	1:500	
	anti PCNA aus Maus	1:10000	
	gelöst in 5%BSA in TBS-T		
Sekundärantikörper:	GARPO (goat anti rabbit peroxidase)		
	DASHPO (donkey anti sheep peroxidase)		
	donkey anti chicken peroxidase		
	GAMPO (goat anti mouse peroxidase)		
	je 1:5000 gelöst in Blocking-Lösung		

3.2.7 Membranpräparation der Leber

Es wurden 0,2g Lebergewebe in 1,2ml Homogenisierungspuffer zweimal im Tissuelyser für 20sec. homogenisiert. Anschließend wurde zu den Proben ein Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) im Verhältnis 1:1000 hinzugegeben. Nach gründlichem Vortexen wurden die Proben 15min bei 800g und 4°C zentifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. In 100µl des Überstands wurde der Lipid- und Proteingehalt bestimmt. Im Anschluss wurden die Proben bei 100.000g und 4°C für eine Stunde ultrazentrifugiert. In der löslichen Fraktion befanden sich die zytosolischen Proteine, während das Pellet aus Membranen bestand. Mittels einer 27"G Kanüle wurde das Pellet in 0,2ml Resuspensionspuffer mit 1:1000 PIC vorsichtig resuspendiert. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 100.000g und 4°C für 30min. Der nun erhaltene Überstand enthält die Plasmamembran, Membranen des Golgi-Apparates und endoplasmatischen Retikulums (ER), Lysosomen sowie Mikrosomen. Im Pellet finden sich Kernmembranen und Mitochondrien wieder. Nach Proteinbestimmung wurden 200µg Protein ad. 100µl Zelllysispuffer eingesetzt, um mittels Western Blot die Proteine zu detektieren.

Homogenisierungspuffer:	20mM Tris-HCl pH7,4
	2mM MgCl2
	0,25M Saccharose
	ad 500ml
PIC:	Pepstatin A, Chymostatin, Leupeptin, Antipain
(protease inhibitor cocktai	0
Resuspensionspuffer:	50mM Tris-HCl pH 8,8
	2mM CaCl2
	80mM NaCl
	1% Triton X100
	(evtl. 0,1% SDS)
	ad 10ml
	PIC frisch 1:1000 zusetzen

3.2.8 Histologie

Sowohl die histologischen Schnitte, als auch die Hämatoxylin-Eosin- (HE-) sowie ein großer Teil der Ki67-Färbungen, wurden in Kooperation mit PD Dr. rer. nat. Johannes Herkel, I. Medizinische Klinik und Poliklinik des UKE durch Nicola Peters und Dipl.-Biol. Dorothee Schwinge ausgeführt.

Ein Teil der Leberproben wurde nach Entnahme sofort in 4% Paraformaldehyd (PFA) gegeben und über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurden sie zunächst eine Stunde mit destilliertem Wasser gewaschen und dann je eine Stunde mit 20%-, 40%-, 60%- und 70% Isopropanol entwässert. Die Gewebe wurden in Paraffin eingeblockt.

PFA: 4g Paraformaldehyd ad 100ml PBS

3.2.8.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung, mit der besonders morphologische Untersuchungen durchgeführt werden. Zunächst werden die Gewebsschnitte mit aufbereitetem Hämatoxylin, dem Hämalaun, angefärbt. Als basischer Farbstoff bindet dies besonders an saure Zellkompartimente, wie den Zellkern und das raue ER. Im zweiten Schritt wurden die basischen Anteile mit Eosin, einem sauren Farbstoff angefärbt.

3.2.8.2 Ki67-Färbung

Um die Proliferation der Hepatozyten nach partieller Hepatektomie darzustellen, wurden Ki67-Färbungen durchgeführt. Durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion gegen das Ki67-Antigen lassen sich ausschließlich Zellen, die die G0-Phase des Zellzyklus verlassen haben, detektieren.

Die 3µm dicken Leberschnitte wurden zunächst 3mal für 5min in Xylol entparaffiniert und dann jeweils 3min in 100%, 90%, 70%, 50% Ethanol sowie 2min in Aqua bidest. entwässert. Anschließend wurden die Schnitte in einer Demaskierungslösung 20min bei schwächster Leistung in der Mikrowelle demaskiert. Nachdem die Proben 45min bei Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie 3mal je 1min in TBS gewaschen. Mittels Inkubieren der Proben mit Peroxidase-Block für 30min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss, wurde die endogene Peroxidase inaktiviert. Die Proben wurden erneut 3 mal für je 2min in TBS pH 7,4 gewaschen. Um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren, wurde analog zur Peroxidase das endogene Biotin blockiert, da die Leber über einen besonders hohen Biotingehalt verfügt. Hierzu wurden die Proben zunächst mit Avidin für 15min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBS für 1min wurden sie erneut für 15min bei RT mit Biotin inkubiert und im Anschluss wieder zweimalig für 1min in TBS gewaschen. Nun wurde der erste Antikörper, der gegen das Ki67 gerichtet ist, in einer Verdünnung von 1:25 in TBS auf die Schnitte gegeben und bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer im Dunkeln gehalten. Am nächsten Morgen wurden die Proben zunächst 3mal für je 5min in TBS gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper, ein biotinylierter Antikörper, der den ersten erkennt, in einer Verdünnung von 1:200 in TBS für 60min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nun erfolgte erneut eine 3malige á 5minütige Waschung in TBS. Dann wurden die Proben mit Streptavidin für 45min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer und einer Verdünnung von 1:300 in TBS inkubiert und erneut wie zuvor gewaschen. Schließlich wurden die Proben mit einem 3,3'Diaminobenzidin-(DAB)-Chromogen unter lichtmikroskopischer Durchsicht gefärbt. Sobald sich eine ausreichende Färbung zeigte, wurde sie in TBS abgestoppt. Zum Schluss wurden die Schnitte mit 36 Mayer's Hämalaun gegengefärbt, unter fließendem Wasser gewaschen und eingedeckelt.

Peroxidase-Block: 8ml H2O2 (30%) in 80ml Methanol DAB-Chromogen: 2µl DAB-Chromogen auf 100µl Substratpuffer

3.2.8.3 Quantifizierung der Ki67-Färbung

Zur Quantifizierung und damit zur Auswertung der Proliferation der Tiere nach partieller Hepatektomie, wurden die Ki67-Färbungen bei 100facher Vergrößerung abfotografiert. Anschließend wurden alle Ki67-positiven Zellkerne ausgezählt und statistisch ausgewertet.

3.2.9 Dokumentation des Leberwachstums

Die entnommenen Lebern der LRP1-Studie wurden zum Zeitpunkt der Sakrifizierung bei gleichem Abstand digital abfotografiert.

3.2.10 Berechnung des Leberregenerationsindex

Das Verhältnis neu regenerierter Lebermasse zur ursprünglichen Masse in Prozent wurde nach der folgenden Formel berechnet:

A = ursprüngliches Lebergewicht

B = Gewicht des resizierten Leberanteils

C = Gewicht der regenerierten Leber zum Zeitpunkt der Sakrifizierung

Wobei A das Lebergewicht vor partieller Hepatektomie darstellt und auf Basis des Gewichts der Tiere berechnet wurde. Das durchschnittliche Gewicht der Mäuseleber beträgt ein 0,4faches des Körpergewichts. B repräsentiert das Gewicht des resizierten Leberanteils zum Zeitpunkt der Operation, wodurch mit (A-B) das Gewicht des verbliebenen Gewebes errechnet wird. Durch die Subtraktion des verbliebenen Leberanteils von dem Gewicht der regenerierten Leber zum Zeitpunkt der endgültigen Organentnahme (C) wurde allein die Masse der regenerierten Leber zum Verhältnis der ursprünglichen Lebermasse gesetzt. [Peters et al., 2000; Leclerq et al., 2006; Tiberio et al., 2008]

Die Ergebnisse gliedern sich in zwei Teile. Um die Rolle des Lipidstoffwechsels für die Leberregeneration genauer zu charakterisieren, wurde eine Studie mit ApoE-Knockout-Mäusen durchgeführt. Nach partieller Hepatektomie wurde das Lipidund Proliferationsverhalten der Tiere untersucht. Analog zur ersten Studie beschäftigt sich der zweite Teil der Arbeit mit dem Lipidund Proliferationsverhalten von Tieren, bei denen über das Cre-loxP-System ein leberspezifischer LRP1-Knockout generiert wurde.

4.1 ApoE-Knockout-Studie

4.1.1 Charakterisierung der ApoE-Knockout-Mäuse

Zunächst wurden die ApoE-Knockout-Mäuse auf ihren genetischen Hintergrund untersucht. Es wurden ausschließlich Tiere verwendet, die einen homozygoten Knockout (-/-)- oder Wildtyp(+/+)hintergrund hatten. Dieser musste sich einerseits in der PCR, als auch im Western Blot zeigen (Abb. 4.1 A und B).



```
C. Cholesterin [mg/dl]
```

Abb. 4.1 Charakterisierung der Mäuse

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde je Maus eine PCR und eine anschließende gelelektrophoretische Auftrennung (A) sowie ein Western Blot (B) durchgeführt. Zur Kontrolle wurden bei der PCR zwei Mäuse bekannten Genotyps (d/d für Knockout; +/+ für Wildtyp) verwendet sowie eine Wasserprobe zur Darstellung sauberen Arbeitens. C: mittlere Plasmalipidwerte unter physiologischen Bedingungen von Wildtyp- und ApoE-/-

-Mäusen (n=14)

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Triglyzerid- und Cholesterinspiegel im Plasma der Tiere bestimmt (Abb. 4.1 C). Hierbei zeigten ApoE-Knockout-Mäuse im Durchschnitt doppelt so hohe Triglyzeridwerte wie Wildtypmäuse. Die Cholesterinspiegel waren sogar bis zu einem Vierfachen in den Knockout-Tieren erhöht. Demnach zeigen ApoE defiziente Mäuse unter physiologischen Bedingungen ein anderes Plasmalipidprofil.

4.1.2 Analysen nach partieller Hepatektomie an ApoE-Knockout-Mäusen

4.1.2.1 Lipidanalysen

Es wurden jeweils 4 Tiere zum Zeitpunkt 6h, 24h, 48h, 72h und 168h nach partieller Hepatektomie untersucht. Verglichen wurde zwischen ApoE-Knockoutund Wildtypmäusen.

Zunächst wurden der Triglyzerid- und Cholesteringehalt des Serums gemessen. Bei den Wildtyptieren zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Triglyzeride im Serum nach PH, der nach 24h abflacht und bis zu 168h rückläufig war (Abb. 4.2.1 A). Auch bei den ApoE-Knockout-Tieren konnten Veränderungen der Triglyzeridkonzentration gesehen werden, die sich allerdings deutlich inhomogener darstellten. Zur Errechnung signifikanter Unterschiede zwischen Knockout- und Wildtyptieren wurde der T-Test angewandt. Hierbei zeigten sich zum Zeitpunkt 0h, 6h, 48h und 72h signifikante bis deutlich signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen im Triglyzeridgehalt des Serums.



Abb. 4.2.1 Serumlipidwerte nach partieller Hepatektomie

Um Veränderung und Unterschiede des Serumlipidspiegels nach partieller Hepatektomie zu detektieren, wurde je 4 Wildtyp- sowie ApoE-/- -Mäusen nach 0h, 6h, 24h, 48h, 72 und 168h Serum abgenommen und separat Triglyzerid- (A) und Cholesterinwerte (B) bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung; T-Test p< 0,05 *, p< 0,01 **, p< 0,001 ***

Bei den Messungen der Cholesterinwerte zeigte sich bei den Wildtyptieren kein charakteristisches Profil. Allerdings ist der Cholesteringehalt im Serum der ApoE-Knockout-Mäuse durchweg um ein Vielfaches höher, verglichen mit den Wildtyptieren. Dies spiegelt sich auch in deutlichen Signifikanzwerten nach Berechnung des T-Test wider. Allerdings könnte man bei Betrachtung dieser Werte von einem Rückgang des Cholesteringehalts im Serum nach partieller Hepatektomie sprechen.

Um Unterschiede in der Akkumulation von Lipiden in der Leber nach partieller Hepatektomie zu untersuchen, wurden zu 0h, 24h, 48h und 168h nach PH HE-Färbungen der Leber durchgeführt. In Abbildung 4.2.2.1 sind diese in A bei 100facher Vergrößerung zur Übersicht gezeigt. Deutlich ist hier die klassische Leberstruktur, die auch nach der Operation weitestgehend aufrechterhalten bleibt, erkennbar.





B. ¹⁶⁸

Abb. 4.2.2.1 Histologische Schnittbilder der Leber

Als Übersichtsfärbung für die histologischen Schnittbilder der Leber nach partieller Hepatektomie wurde eine Färbung mit Hämatoxylin und Eosin gewählt. Zu sehen ist der Vergleich zwischen repräsentativen Wildtyp- und ApoE-/- -Mäusen zu 0, 24, 48 und 168 Stunden nach partieller Hepatektomie, je bei 100facher (A) und 400facher (B) Vergrößerung.

Bei Betrachtung der HE-Färbungen mit 400facher Vergrößerung (B) wird deutlich, dass sowohl die Wildtyp- als auch die ApoE-Knockout-Mäuse nach partieller Hepatektomie Fette in den Hepatozyten akkumulieren. Die Wildtyptiere zeigen bei 48h den größten Lipidgehalt, wobei sich die Zellkerne stets im Zentrum der Zellen befinden. Nach 7 Tagen (168h) ist keine Lipidakkumulation mehr sichtbar. Bei genauer Betrachtung lassen sich in den ApoE-Knockout-Mäusen bereits zum Zeitpunkt 0h, das heißt präoperativ, kleine Fettvakuolen in den Hepatozyten beobachten. Nach PH nimmt die Fettakkumulation drastisch zu und ist auch nach 7 Tagen noch deutlich erkennbar (Abb. 4.2.2.1 B). Vergleicht man Wildtyp mit ApoE-Knockout miteinander, zeigt sich in den ApoE defizienten Tieren zu jedem Zeitpunkt eine stärkere Lipidakkumulation.

Um diese beobachteten Unterschiede in der Akkumulation von Fetten nach partieller Hepatektomie näher zu charakterisieren, wurden Lipidprofile der Leber nach PH erstellt, wobei die gemessenen Triglyzerid- und Cholesterinwerte auf den Zellproteingehalt bezogen wurden. Hierbei zeigten die Wildtyptiere einen massiven Anstieg des Triglyzeridgehaltes nach PH, der nach 24h absank und bei 7 Tagen (168h) wieder den Ausgangswert erreichte (Abb. 4.2.2.2 A). Ebenso nahm der Triglyzeridgehalt in den ApoE-Knockout-Mäusen zu und erreichte Spitzenwerte bei 24h nach PH. Im direkten Vergleich enthielten die Lebern der Knockout Tiere zu jedem Zeitpunkt mehr Triglyzeride, die bei 0h, 24h und 48h einen deutlich signifikanten Unterschied zeigten.







Die Lebertriglyzerid- (A) und Lebercholesterinwerte (B) nach partieller Hepatektomie wurden zum Vergleich in je 4 Wildtyp- und ApoE-/- -Mäusen zu 0, 6, 24, 48, 72 und 168 Stunden in Leberlysaten gemessen. Die Signifikanzsterne beziehen sich auf Unterschiede zwischen Wildtyp- und ApoE-/- -Daten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung; T-Test p< 0,05 *, p< 0,01 **, p< 0,001 ***

Ein ähnliches Profil, allerdings weniger ausgeprägt wie bei den Triglyzeridwerten, zeigten sowohl die Wildtyp- als auch ApoE-Knockout-Mäuse bei der Quantifizierung des Cholesterins der Leber (Abb. 4.2.2.2 B). In beiden Tiergruppen stieg der Cholesteringehalt nach Operation an und erreichte Spitzenwerte nach 24h. Auch hier enthielten die Leberlysate der ApoE-defizienten Tiere zu jedem Zeitpunkt höhere Cholesterinwerte verglichen mit den Wildtyptieren. Allerdings waren sie nur bei 0h und 168h statistisch signifikant erhöht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Wildtyp-, als auch ApoE-Knockout-Mäuse nach partieller Hepatektomie im Vergleich zu physiologischen Bedingungen erhöhte Triglyzeridwerte im Serum haben. Außerdem unterscheiden sich beide Tiergruppen in ihren Serumtriglyzerid- und Serumcholesterinwerten zu jedem gemessenen Zeitpunkt nach PH von einander. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ApoE-Knockout-Mäuse deutlich mehr Lipide nach PH in der Leber akkumulieren, die hauptsächlich aus Triglyzeriden bestehen.

4.1.2.2 Proliferationsanalysen

Um das Regenerationsverhalten der Mäuse nach partieller Hepatektomie zu untersuchen, wurde die Proliferation der Hepatozyten mittels Western Blot, Ki76-Färbung und dem errechneten Leberregeneratonsindex analysiert.

Als Marker zur Bestimmung der Proliferationsaktivität wurde die Expression von Proliferating Cell Nuclear Anitgen (PCNA) im Western Blot quantifiziert. In Abbildung 4.2.3.2. A sind jeweils Proben von drei Tieren vor und drei Tieren nach 6h, 24h, 48h, 72h und 168h nach PH auf ein Gel aufgetragen. Dies ist separat für die Wildtyp- (links) und ApoE-Knockout-Tiere (rechts) durchgeführt worden. Während nach 6h noch keine Veränderung im Vergleich zu 0h erkennbar ist, ist sowohl nach 24h, 48h und 72h eine erhöhte Expression von PCNA nach PH zu sehen. Nach 168h ist das Expressionslevel wieder dem von 0h angeglichen. Diese Ergebnisse gelten sowohl für Wildtyp- als auch für ApoE-Knockout-Mäuse. Beim Auftragen von jeweils zwei Proben zu 0h, 6h, 24h und 72h wird ersichtlich, dass bei beiden Tiergruppen die Expression von PCNA bis 72h ansteigt. Im direkten Vergleich zueinander sind keine Unterschiede zum Zeitpunkt der Operation und 6h danach erkennbar. Nach 24h ist die Expression von PCNA auf Proteinebene in den Wildtypmäusen allerdings höher, als in den ApoE-Knockout-Mäusen. Zwei Tage später, nach 72h, sind die Level angeglichen (Abb. 4.2.3.2. B). Demnach zeigen ApoE-Knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen einen verzögerten Anstieg der Expression von PCNA auf Proteinebene nach partieller Hepatektomie.





Expressionslevel von PCNA im Western-Blot, (A) zeigt vergleichend Oh-Werte zu 6h bzw. 24h, 48h, 72 und 168h von je drei Wildtyp- bzw. ApoE-/- -Mäusen; (B) zeigt direkte Verläufe der PCNA-Expression in Wildtyp und ApoE-/- -Mäusen, sowie den direkten Vergleich zwischen Wildtyp- und ApoE-/- -Mäusen.

Zur Bestätigung des Ergebnisses wurden Ki67-Färbungen gemacht. Ki67 ist ein Protein, das ebenfalls als Prolifierationsmarker dient und in der Zelle während aller aktiven Phase des Zellzyklus (G1, S, G2 und Mitose), aber nicht in der Ruhephase, G0, exprimiert wird. Hierbei zeigte sich, dass sich sowohl in der Wildtyp- als auch ApoE-Knockout-Gruppe nach partieller Hepatektomie vermehrt Ki67 in den Hepatozyten anfärben ließ. Allerdings war die Färbung der Wildtypmäuse nach 48h deutlich intensiver, verglichen zu den ApoE Defizienten (Abb. 4.2.3.3. A). Nach 168h zeigten beide Tiergruppen nur noch vereinzelte proliferierende Hepatoyzten. Um diesen Unterschied genauer zu quantifizieren wurden die Ki67-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in beiden Tieren nach 48h und 168h ausgezählt. Es bestätigte sich die Beobachtung der bei 48h stärker proliferierenden Lebern der Wildtypmäuse, allerdings unter Ausbleiben eines Signifikanzniveaus (Abb. 4.2.3.3. B).





Abb. 4.2.3.3 Histologische Schnittbilder der Leber sowie deren Quantifizierung

Immunhistologische Ki-67-Färbung hepatektomierter Lebern von repräsentativen Wildtypund ApoE-/- -Mäusen nach 48 bzw. 168 Stunden bei 100facher Vergrößerung (A) sowie deren Quantifizierung (B). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. n= 4 pro Gruppe

Letztendlich wurde der Leberregenerationsindex der Tiere berechnet (Abb. 4.2.3.4). Hier zeigte sich in den ApoE-Knockout-Tieren eine leicht verzögerte hepatische Regenerationsrate. Nach 168h liegen die Knockout Mäuse deutlich hinter den Wildtyptieren.



Abb. 3.2.3.4 Leberregenerationsindex

Anteil des neu regenerierten Lebergewichts nach partieller Hepatektomie nach 6, 24, 48, 72 und 168 Stunden in Wildtyp- und ApoE-/- -Mäusen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung; n= 4 pro Gruppe.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ApoE defiziente Mäuse mehr Lipide, hauptsächlich aus Triglyzeriden bestehend, in Hepatozyten nach partieller Hepatektomie akkumulieren. Des Weiteren sind sie durch eine leicht verzögerte Proliferation der Leber nach PH im Vergleich zu Wildtypmäusen charakterisiert.

4.1.3 Expression von LRP1 nach partieller Hepatektomie

Als neben der Expression von PCNA nach partieller Hepatektomie im Western Blot auch der Expression von LRP1 untersucht wurde, zeigte sich, dass sowohl die ApoE-Knockout-Mäuse als auch die Wildtypmäuse die Expression von LRP1 hochregulierten (Abb. 4.3). Dies lässt auf eine Rolle von LRP1 bei der Leberregeneration nach PH schließen.



Abb. 4.3 Expression von LRP1 nach partieller Hepatektomie

Expressionsanalysen von LRP1 in der Leber mittels Western-Blot anhand von Wildtypund ApoE-/- -Mäusen nach 0, 6, 24 und 72 Stunden nach partieller Hepatektomie.

4.2 LRP1-/- -Studie

Um den Einfluss von LRP1 auf die Akkumulation von Lipiden und Proliferation nach partieller Hepatektomie näher zu untersuchen, wurde eine zweite Studie durchgeführt. Da Mäuse, denen ubiquitär LRP1 fehlt, bereits im Embryonalstadium sterben, wurde mittels Cre-loxP-System ein leberspezifischer Knockout generiert. Im Folgenden ist mit "LRP1-Knockout" dieser leberspezifische Knockout gemeint.

4.2.1 Charakterisierung der LRP1-/- -Mäuse

Die Tiere wurden präoperativ mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese genotypisiert. Damit die Tiere kein LRP1 in der Leber exprimieren, müssen sie sowohl homozygot für das gefloxte LRP1-Gen, als auch die integrierte Cre-Rekombinase unter dem Albuminpromotor besitzen. Da die Rekombinase eine lange Halbwertszeit hat, reicht die Integration dieser auf einem Allel. Mögliche Genotypen sind +/d cre-, +/d cre+, d/d cre-, d/d cre+. Für die weitere Zucht wurden ausschließlich für das gefloxte LRP1 homozygote Tiere genommen. Abbildung 4.4 C zeigt einen Western Blot einer Membranpräparation für die Genotypen +/d cre+, d/d cre- und d/d cre+ in jeweils dreifacher Kontrolle. Sie verdeutlicht, dass sich unter alleiniger Expression der Rekombinase oder der gefloxten LRP1-Allele die Expression von LRP1- sowie LDL-R und ApoE- nicht verändert. Dagegen wird unter dem Genotyp d/d cre+ kein LRP1 exprimiert. Außerdem wird die Expression des LDL-Rezeptors und ApoE bei LRP1 defizienten Mäusen hochreguliert.

Für die Studie dienten Tiere mit einem d/d cre- Genotyp als Wildtyp im Vergleich zu den d/d cre+ Knockout-Tieren, wobei zu den Zeitpunkten 24h, 48h, 72h und 168h jeweils 4 Wildtyp- und 4 Knockout-Mäuse ausgewertet wurden.





Abb. 4.4 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde eine PCR auf das gefloxte LRP1 sowie eine PCR auf Cre-Albumin und anschließende Gelelektrophorese durchgeführt (A) und (B). Zur Kontrolle wurden zwei Proben mit bekanntem Genotyp untersucht. Die Membranpräparation der Leber charakterisiert die Genotypen zusätzlich (C). Zum definitiven Beweis des LRP1-Knockouts wurde weiterhin ein Western-Blot von Leberlysaten auf LRP1 gemacht (D).

Zur Bestätigung der Genotypisierung wurde postoperativ mittels Western Blot die Expression von LRP1 in Leberlysaten bestimmt (Abb. 4.4 D).

4.2.2 Analysen nach partieller Hepatektomie an LRP1-Knockout-Mäusen

4.2.2.1 Lipidanalysen

Analog zur ApoE-Knockout-Studie, wurden zunächst Triglyzerid- und Cholesterinwerte im Serum zum Zeitpunkt der Operation und 24h, 48h, 72h und 168h nach PH gemessen (Abb. 4.5.1). Hier scheint es, dass vor allen Dingen die Triglyzeridwerte im Serum nach PH absinken. Allerdings lagen die Werte in großen Schwankungsbereichen.

	Triglyzeride [mg/dl]		Cholesterin [mg/dl]	
	Wildtyp	LRP1-/-	Wildtyp	LRP1-/-
0h	145 ± 52	127 ± 19	137 ± 26	123 ± 35
24h	62 ± 26	40 ±6	93 ± 30	46 ± 13 *
48h	48 ± 18	39 ± 13	56 ± 7	111 ±95
72h	56 ± 29	49 ± 18	123 ± 131	174 ± 258
168h	63 ±7	45 ± 27	45 ±7	34 ± 11

Abb. 4.5.1 Serumlipidwerte nach partieller Hepatektomie

Mittlere Serumtriglyzeride und –cholesterin nach partieller Hepatektomie nach 24, 48, 72 und 168 Stunden in Wildtyp- und LRP1-/- -Mäusen; n= 4 pro Gruppe; T-Test p< 0,05 *, p< 0,01 ***, p< 0,001 ***

Um auch hier postoperativ die Akkumulation von Lipiden in den Hepatozyten beurteilen zu können, wurde eine HE-Färbung der Lebern gemacht. Bei 100facher Vergrößerung ist zu allen Zeitpunkten die klassische Leberstruktur erkennbar. In der 400fachen Vergrößerung ist in den Wildtypmäusen direkt nach Operation eine Anreicherung von Lipiden in den Hepatozyten erkennbar. Den größten Fettgehalt haben die Hepatozyten 24h nach PH. Anschließend nimmt der Fettgehalt wieder ab und ist nach 168h nicht mehr sichtbar (Abb. 4.5.2.1 B). Ebenso akkumulieren auch die LRP1-Knockout-Mäuse nach PH Lipide in den Hepatozyten. Allerdings ist der Fettgehalt nach 24h deutlich geringer als in der Wildtypvergleichsgruppe, steigt bis 48h postoperativ weiter an und fällt ebenfalls bis 168h soweit ab, dass keine Fettvakuolen mehr sichtbar sind.





Abb. 4.5.2.1 Histologische Schnittbilder der Leber

Zur übersichtlichen Darstellung der Lebern nach partieller Hepatektomie wurde eine Hämatoxylin- und Eosinfärbung zu 0, 24, 48 und 168 Stunden gemacht. (A) zeigt Ausschnitte bei 100facher, (B) Ausschnitte bei 400facher Vergrößerung; je repräsentative Wildtyp- und LRP1-/- -Mäuse im Vergleich.

Zur Quantifizierung der Lipidakkumulation nach partieller Hepatektomie wurden der Triglyzerid- und Cholesteringehalt in Leberlysaten gemessen und auf das Gesamtzellprotein bezogen (Abb.4.5.2.2).





Biochemische Messung der Lipidakkumulation von Wildtyp- und LRP1-/- -Mäusen nach partieller Hepatektomie zu 0, 24, 48, 72 und 168 Stunden. (A) stellt Triglyzerid-, (B) Cholesterinwerte pro mg Zellprotein dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung; T-Test p< 0,05 *, p< 0,01 **, p< 0,001 ***; n= 4 pro Gruppe

Wie in der ApoE-Knockout-Studie zeigt sich, dass in beiden Vergleichsgruppen der Hauptbestandteil der Lipide aus Triglyzeriden besteht. Ferner ist, wie in der HE-Färbung zu sehen, in den Wildtypmäusen nach 24h das Maximum der Lipidwerte - sowohl Triglyzerid- als auch Cholesterinwerte - erreicht und fällt bis 168h postoperativ auf die Anfangswerte ab. Dagegen ist der Fettgehalt der Lebern der LRP1-Knockout-Tieren nach 24h deutlich geringer und nimmt erst 48h nach PH Werte an, die vergleichbar mit den 24h-Wildtypmäusen sind. Nach 168h sind die Messwerte wieder auf das Ausgangsniveau abgefallen. Insgesamt sehen die Verläufe der Cholesterinwerte ähnlich der Triglyzeridwerte aus, allerdings sind die Ausschläge der Zunahme deutlich geringer.

Schlussfolgernd konnte mit beiden Methoden gezeigt werden, dass LRP1-Knockout-Mäuse eine verzögerte Lipidakkumulation nach partieller Hepatektomie aufweisen.

4.2.2.2 Proliferationsanalysen

Zunächst wurde bei den Expressions- und Proliferationsanalysen kontrolliert, ob LRP1 nach PH in der Wildtypgruppe hochreguliert wird. Wie in Abbildung 4.5.3 zu sehen, ist die Expression von LRP1 24h postoperativ kaum zu der präoperativen verändert. Nach 48h ist dagegen ein klarer Unterschied zu den vergleichenden 0h zu sehen, der sich nach 72h noch weiter auszuprägen scheint. Dies bestätigt erneut die Hochregulierung der LRP1-Expression nach partieller Hepatektomie.



Abb. 4.5.3 Hochregulation von LRP1 in Wildtypmäusen nach partieller Hepatektomie

Expression von LRP1 in Wildtypmäusen nach partieller Hepatektomie, Western-Blot

Bei Betrachtung von PCNA nach partieller Hepatektomie zeigte sich bereits nach 24h eine verstärkte Expression auf Proteinebene, die bis 72h postoperativ anhielt und nach 168h noch leicht erkennbar war (Abb. 4.5.4.1 A). Dieser Trend zeigte sich sowohl in Wildtyp- als auch in LRP1-/- Mäusen. In den Verläufen wurde deutlich, dass die Expression von PCNA von 0h bis 48h ansteigt, um nach 168h wieder runterreguliert zu werden. Im direkten Vergleich zueinander ist ein deutlicher Unterschied der Expression von PCNA in Wildtyp- und LRP1-/- Tieren zu sehen. Nach 24h und nach 48h ist die Expression in den Wildtypmäusen wesentlich höher reguliert. 168h postoperativ gleichen sich die Expressionslevel zwar an, dennoch ist immer noch eine verstärkte Expression von PCNA in den Wildtyptieren erkennbar (Abb. 4.5.4.1 B).



Abb. 4.5.4.1 Expression von PCNA nach partieller Hepatektomie

Expressionslevel von PCNA im Western-Blot, (A) zeigt vergleichend 0h-Werte zu 24h bzw. 48h, 72 und 168h von je drei Wildtyp- bzw. LRP1-/- -Mäusen, (B) zeigt Verläufe der PCNA-Expression von Wildtyp, LRP1-/- -Mäusen sowie den direkten Vergleich zwischen repräsentativen Wildtyp- und LRP1-/- -Mäusen.

Zur weiteren Proliferationsanalyse wurde eine Ki67-Färbung der Lebern nach partieller Hepatektomie gemacht (Abb. 4.5.4.2 A), die anschließend quantifiziert wurde (Abb. 4.5.4.2. B).





Abb. 4.5.4.2 Histologische Schnittbilder der Leber

Ki67-Färbung zur Beurteilung der Proliferation der Leber nach partieller Hepatektomie zu 0, 48, 72 und 168 Stunden (A). (B) zeigt die Quantifizierung der Ki67-Färbung. Verglichen werden Wildtyp- versus LRP1-/- -Mäuse. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung; T-Test p< 0,05 *, p< 0,01 **, p< 0,001 ***; n=4 pro Gruppe

Bereits in der Ki67-Färbung zeigte sich ein starkes Signal der proliferierenden Kerne nach 48h in den Wildtyptieren. Nach 72h war diese schon deutlich zurückgegangen und nach 168h färbten sich nur noch vereinzelt Kerne, ähnlich der präoperativen Situation. Bei den LRP1-Knockout-Tieren zeigte sich die maximale Proliferation bei 72h, die, wie bei den Wildtyptieren, bei 168h postoperativ dem Bild bei 0h entsprach. In der Quantifizierung der proliferierenden Zellkerne konnte diese Beobachtung bestätigt werden (Abb. 4.5.4.2 B).

Zur weiteren Visualisierung des Leberwachstums nach PH wurden die regenerierten Lebern bei Organentnahme in stets gleichem Abstand abfotografiert (Abb. 4.5.4.3). Auch hier konnte gezeigt werden, dass die LRP1-/- Lebern verzögert die Größe der Wildtyplebern einnehmen. Dies wird besonders nach 48h deutlich.



Abb. 4.5.4.3 Leberwachstum nach PH

Fotos der hepatektomierten Lebern nach 24, 48, 72 und 168 Stunden; Wildtyp versus LRP1-Knockout

Auch in der LRP1-Knockout-Studie wurde der Leberregenerationsindex bestimmt, um mögliche Unterschiede der hepatischen Regenerationsrate detektieren zu können (Abb. 4.5.4.4). Hier zeigten Wildtyp- und LRP1-/- Mäuse bis 72h sehr ähnliche Proliferationswerte. Nach 168h waren die Durchschnittswerte der Knockout-Tiere geringer, wobei die Wildtyptiere größeren Schwankungen unterlagen.



Abb. 4.5.4.4 Leberregenerationsindex

Anteil des neu regenerierten Lebergewichts nach partieller Hepatektomie nach 24, 48, 72 und 168 Stunden in Wildtyp- und LRP1-/- -Mäusen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung; n= 4 pro Gruppe

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass LRP1-Knockout-Mäuse durch eine verzögerte Akkumulation von Triglyzeriden nach partieller Hepatektomie charakterisiert sind. Außerdem zeigen sie postoperativ eine verzögerte Proliferationsrate im Vergleich zu Wildtypmäusen.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Lipidakkumulation in Hepatozyten nach partieller Hepatektomie und der Proliferation der Leber näher untersucht.

In den beschriebenen Experimenten wurde jeweils nur eine begrenzte Anzahl Knockout-Mäuse mit Wildtypmäusen verglichen. Somit zeigen die Ergebnisse eine Tendenz auf, erheben aber keinen Anspruch auf absolute Gültigkeit.

Bei der Untersuchung der ApoE-Knockout-Mäuse vor Operation zeigt sich bei ihnen ein anderes Lipidprofil, als bei den Wildtypmäusen. Ihre Seren enthalten etwa vierfach erhöhte Cholesterin- und bis zu doppelt so hohe Triglyzeridwerte (Abb. 4.2.1).

Erklärbar ist dies durch die herabgesetzte Aktivität der endothelialen Lpl durch das Fehlen von ApoE, weshalb weniger Triglyzeride durch periphere Gewebe aufgenommen werden können. Annähernd kompensatorisch versucht die Leber die Homöostase des Blutes aufrechtzuerhalten, indem sie vermehrt Lipide über ApoE-unabhängige Mechanismen, wie die Aufnahme von LDL über den LDL-R, aufnimmt. Dies führt bereits präoperativ zu einer verstärkten Fettakkumulation in der Leber, wie es auch in der vorliegenden Arbeit ersichtlich wird [Kuipers et al., 1996]. Dass bereits eine präoperative Verfettung eine koordinierte Leberregeneration nach PH hemmt, zeigen Untersuchungen von Tanoue et al. Allerdings spielen die Mechanismen, die zur Verfettung führen – hier die Ernährungsweise – eine wesentliche Rolle [Tanoue et al., 2011].

Ebenso führt die veränderte VLDL-Produktion der Leber bei ApoE-Defizienz zu einem erhöhten Fettgehalt der Leber. Über einen längeren Zeitraum würde dies zu einem pathologischen Krankheitsbild einer Nicht-alkoholischen Steatosis Hepatis im Rahmen eines metabolischen Syndroms führen. Die in Abbildung 4.2.2.1 ersichtliche Fettakkumulation der ApoE-Knockout-Mäuse zum Zeitpunkt 0h ist allerdings zu gering, um bereits von einer Fettleber sprechen zu können (Definition siehe Einleitung). Ebenso ist keine Fibrosierung oder Entzündung erkennbar.

1987 fanden Harris et al. heraus, dass regenerierende Hepatozyten vermehrt ApoE-haltige Lipoproteine binden, als ruhende Hepatozyten [Harris et al, 1987]. Von daher wurde erwartet, dass ein ApoE-Knockout zu einer reduzierten Lipidakkumulation während der Regeneration in Hepatozyten führt. Allerdings

Diskussion

vorliegenden Ergebnisse, dass ApoE-Knockout-Mäuse zeigen die mehr Triglyzeride und Cholesterin - auch nach Abzug der Fettwerte zum Zeitpunkt 0h in der Leber nach partieller Hepatektomie aufnehmen, als Wildtypmäuse (Abb. 4.2.2.2). Diese vermehrte Lipidakkumulation unter Abwesenheit von ApoE weist darauf hin, dass das hepatische, intrazelluläre ApoE bei der Leberregeneration eine regulatorisch-hemmende Funktion für die Lipidaufnahme in der Leber haben könnte. Dafür würden auch Untersuchungen von Panduro et al. sprechen. Sie konnten zeigen, dass sich die ApoE-Expression während der Leberregeneration gewebeabhängig verhält. In der Leber selbst wird die Genexpression runterreguliert, wohingegen untersuchte nicht-hepatische Gewebe wie Intestinum, Niere, Lunge und Gehirn ihre mRNA-Expression verstärkten [Panduro et al., 1993]. Um zwischen hepatischem und nicht hepatischem ApoE-Einfluss während der Leberregeneration differenzieren zu können, würden Untersuchungen an Mäusen mit einem leberspezifischen Knockout für ApoE weiterführen.

Im Zusammenhang mit der vermehrten Aufnahme von Fetten nach partieller Hepatektomie, zeigt sich auch bei den Tieren eine verzögerte Proliferation der Leber. Ein Unterschied zur Proliferation der Kontrollgruppe wird in der Literatur häufig gefunden. Ob dieser nun direkt auf das Fehlen von ApoE oder indirekt durch eine verstärkte Akkumulation von Lipiden in den Hepatozyten, verursacht durch den ApoE-Knockout, zurückzuführen ist, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Die Beobachtung von Fukushima et al., dass mRNA des LDL-R in regenerierenden Lebern vermehrt exprimiert wird, ist hinweisend auf einen Einfluss der Lipoproteinrezeptoren auf die Leberregeneration [Fukushima et al., 1993]. Dafür sprechen auch die vorliegenden Ergebnisse. Nach partieller Hepatektomie wird sowohl in ApoE-Knockout Mäusen wie auch in Wildtypmäusen LRP1 hochreguliert (Abb. 4.3).

Bei der Untersuchung der Bedeutung von LRP1 für die Lipidakkumulation und Leberregeneration nach partieller Hepatektomie wurden die gleichen Methoden angewandt, wie bei den ApoE-Knockout-Versuchen.

Die unter Ruhebedingungen verstärkte LDL-R-Expression der LRP1-Knockout-Tiere ist in der Literatur bekannt und von Rohlmann et al. beschrieben [Rohlmann et al., 1998]. Daneben wird auch die Expression von ApoE hochreguliert (Abb. 4.4).

Unter physiologischen Bedingungen unterscheiden sich in den verglichenen Tiergruppen Serumtriglyzerid- und Cholesterinwerte nicht voneinander.

Im Vergleich der prä- mit den postoperativen Serumlipidwerten fällt in beiden Gruppen ein Absinken auf, während diese in der ApoE-Knockout-Studie zunehmen. Ursache könnte eine zufällige Messungenauigkeit in einer Gruppe sein, da alle LRP1-Studien-Werte im Schwankungsbereich der ApoE-Knockout-Werte lagen. Ebenso könnte es aufgrund einer Hyperbilirubinämie durch verstärkte Hämolyse, die vor der Untersuchung nicht erkennbar war, zu einer Verfärbung des Serums in den orangefarbenen Bereich gekommen sein. Da der Essay zur Bestimmung der Serumlipide auf einen Farbumschlag im roten Bereich beruht, könnten hier fälschlicherweise zu hohe Werte gemessen worden sein.

Die LRP1-Knockout-Mäuse zeigen nach partieller Hepatektomie eine verzögerte Lipidakkumulation im Vergleich zu den Wildtyptieren (Abb. 4.5.2.1 und 4.5.2.2). Dies ist durch ein Wegfallen der Rezeptor-vermittelten Endozytose via LRP1 zu erklären.

Korrelierend zu den Lipidergebnissen wurde eine verzögerte Proliferationsrate der LRP1-Knockout-Mäuse beobachtet. Wie bereits einleitend beschrieben, ist LRP1 in viele biologische Prozesse involviert. Neben seiner endozytotischen Funktion spielt es eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion. Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse ist nicht direkt erkennbar, über welchen Mechanismus LRP1 die Proliferation der Hepatozyten beeinflusst. Dennoch wäre aufgrund der in der Literatur beschriebenen antiproliferativen Eigenschaften von LRP1 zu erwarten gewesen, dass ein Knockout von LRP1 die Proliferation fördert (siehe Einleitung). So ist LRP1 ein Rezeptor für TGF-β, welches über eine Hemmung von Cyclin D und E die Hepatozyten an der Proliferation hindert [Derynck et Zhang, 2003; Zhong et al., 2010]. In der Leber wird TGF-β hauptsächlich von den Ito-Zellen produziert und fördert die Fibrosebildung und Apoptose.

Ein Grund für die verzögerte Proliferationsrate der Knockout-Mäuse nach PH könnte ebenso die Hochregulation von LDL-Rezeptor und ApoE in den LRP1-Knockout-Mäusen sein (Abb. 4.4). Somit könnte der Ausfall in gewissem Ausmaß kompensiert worden sein.

68
Diskussion

Grundsätzlich sei zu erwähnen, dass sich in vielen Studien gezeigt hat, dass ausgeschaltete Proteine - selbst so zentrale wie II-6 - nach partieller Hepatektomie zu einer verzögerten Proliferation führen und diese nicht verhindern oder zum Tod der Tiere führen [Akerman et al., 1992; Cressman et al., 1996; Skrtic et al., 2001; Mitchell et al., 2005].

Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass eine koordinierte Lipidakkumulation nach partieller Hepatektomie essentiell für die anschließende Leberregeneration ist. Sowohl ApoE-Knockout-Mäuse, als auch die LRP1-Knockout-Mäuse zeigen eine verzögerte Regenerationsrate. Ebenso zeigen primäre Hepatozyten in Zellkultur während der Proliferation eine Fettakkumulation [Michalopoulos et al, 1982].

Um die Rolle der für den Lipidstoffwechsel zentralen Proteine für die Leberregeneration näher zu beleuchten sollten noch weitere Untersuchungen, beispielsweise mittels ApoE transgenen Tieren, sowie zum LDL-Rezeptor, durchgeführt werden.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung der Lipidakkumulation im Zusammenhang mit der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie zu untersuchen. Hierfür wurde der Einfluss von zwei zentralen Proteinen des Fettstoffwechsels - ApoE sowie LRP1 - auf die Lipidakkumulation und Proliferation in entsprechenden genetisch modifizierten Mäusen untersucht.

Zu diesem Zweck wurden in den entsprechenden Mausmodellen nach partieller Hepatektomie prä- und postoperativ Cholesterin- und Triglyzeridprofile des Serums erstellt. Analog wurden postoperativ auch Lipidprofile von der Leber bestimmt und auf den Proteingehalt bezogen. Die Lipidakkumulation der Leber wurde in histologischen Analysen mittels HE-Färbung gezeigt. Um die Proliferation zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen für die Proliferationsmarker PCNA und Ki67-Färbungen durchgeführt. Der Leberregenerationsindex wurde über das Lebergewicht ermittelt.

In ApoE-defizienten Tieren zeigte sich nach partieller Hepatektomie eine verstärkte hepatische Akkumulation von Lipiden - insbesondere von Triglyzeriden - sowie eine leicht verzögerte Proliferation im Vergleich zu den Wildtyptieren. In Mäusen mit leberspezifischer LRP1-Defizienz wurde eine zeitliche Verzögerung sowohl für die Lipidakkumulation als auch für die Proliferation in der Leber beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde somit eine verstärkte als auch eine verzögerte Lipidakkumulation mit einer verzögerten Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie gemessen. Es kann also zusammengefasst werden, dass zumindest in diesen Mausmodellen die Akkumulation der Lipide keine maßgebliche Rolle für die Leberproliferation nach partieller Hepatektomie spielt. Insbesondere LRP1 scheint jedoch eine wichtige Rolle bei der Leberregeneration einzunehmen, wobei dieser Effekt vermutlich auf die LRP1-vermittelte Regulation von intrazellulären Signalwegen zurückzuführen ist.

7. Abkürzungsverzeichnis

Аро	
•	Apolipoprotein
APP	amyloid precursor protein
AS	Aminosäure, Aminosäuren
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C/EBPβ-Proteine	CCAAT/enhancer binding protein
ca.	circa
CETP	cholesterol-ester-tranfer protein
CML	chronisch-myeloische Leukämie
CR	Chylomikronenremnants
	cysteine-rich complement-type repeats
Cre	cyclization recombination
dd.	Bidestillatus
dl	Deziliter
DNA	deoxyribunucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> , "und andere"
evtl.	eventuell
g	Zentrifugalbeschleunigung
GLUT4	Glucosetransporter 4
h	hora, "Stunde"
HCC	Hepatozelluläres Carcinom
HDL	high density lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	hepatocyte-growth-factor
HSPG	heparin sulfate proteoglycans
Hz	Hertz
et al. evtl. g GLUT4 h HCC	et alii, "und andere" eventuell Zentrifugalbeschleunigung Glucosetransporter 4 hora, "Stunde" Hepatozelluläres Carcinom

II-6	Interleukin-6
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
КНК	koronare Herzkrankheit
T	Liter
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acetyltransferase
LDL	low-density-lipoproteins
LDL-R	low-density-lipoprotein-receptor
Lig.	Ligamentum, Band
loxP	locus of X-over in P1
LpL	Lipoprotein-Lipase
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	LDL-receptor-related-protein
LSR	Lipolysestimulierter Rezeptor
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
μΙ	Mikroliter
μm	Mikrometer
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
NF-ĸB	nuclear factor κB
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PH	partielle Hepatektomie
PIC	protease inhibitor cocktail
red.	reduziert
rpm	revolutions per minute

RT	Raumtemperatur
SMC	smooth muscle cells
SOCS3	suppressor of cytokine signalling 3
SORL1	Sortilin-Related-Rezeptor 1
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TBG	Thryoxin-bindendes Globulin
TGF-β	transforming-growth-factor-β
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
V.	Vena, Vene
V	Volt
VLDL	very-low-density-lipoproteins
VLDL-R	very-low-density-lipoprotein-receptor

8. Literaturverzeichnis

Akerman, P., et al., *Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy.* Am J Physiol., 1992. **163**(4 Pt 1): p. G579-85.

Alison, M.R., et al., *Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly.* J Pathol., 2009. **217**(2): p. 282-98.

Beisiegel, U., et al., *The LDL-receptor related protein, LRP, is an apoE-binding protein.* Nature, 1989. **341**(6238): p. 162-4.

Bellentani, S., et al., *Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease*. Dig Dis., 2010. **28**(1): p. 155-61. Epub 2010.

Bettens, K., et al., *Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future.* Hum Mol Genet., 2010. **19**(R1): p. R4-R11. Epub 2010.

Boucher, P., et al., *LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. Science.*, 2003. **300**(5617): p. 329-32.

Brown, M.S., et al., *Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors.* Science, 1981. **212**(4495): p. 628-35.

Canbay, A., et al., *Lipid metabolism in the liver.* Z Gastroenterol., 2007. **45**(1): p. 35-41.

Costa, R.H., et al., *Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration.* Hepatology, 2003. **38**(6): p. 1331-47.

Cressman, D.E., et al., *Liver Failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice.*, Science., 1996. **274**(5291): p. 1379-83.

Davis, C.G., et al., *Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region.* Nature, 1987. **326**(6115): p. 760-5.

Derynck, R., Zhang, Y.E., *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.* Nature., 2003. **425**(6958): p. 577-84.

Elshourbagy, N.A., et al., Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmorsets. Proc Natl Acad Sci, 1985. **82**(1): p. 203-7.

Fausto, N., et al., *Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration.* FASEB J., 1995. **9**(15): p: 1527-36.

Fazio, S., et al., *Recycling of apolipoprotein E in mouse liver.* J Biol Chem., 1999. **274**(12): p. 8247-53.

Fernández, M.A., et al., *Caveolin-1 ist essential for liver regeneration.* Science., 2006. **313**(5793): p. 1628-32.

Frank, P.G., et al., *Adenovirus-mediated expression of caveolin-1 in mouse liver increases plasma high-density lipoprotein levels.* Biochemestry, 2001. **40**(36): p. 10892-900.

Fukushima, N., et al., *Apolipoprotein A-I, E, C-III and LDL-receptor mRNA expression in liver diseases.* Nippon Rinsho., 1993. **51**(2): p. 407-13.

Gaultier, A., et al., *Regulation of the composition of the extracellular matrix by low density lipoprotein receptor-related protein-1: activities based on regulation mRNA expression.* J Biol Chem., 2006. **281**(11): p. 7332-40.

Grundy, S.M., Cholesterol metabolism in man. West J Med., 1978. **128**(1): p. 13-25.

Grundy, S.M., et al., *Chylomicron clearance in normal and hyperlipidemic man.* Metabolism., 1976. **25**(11): p. 1225-39.

Harris, L., et al., *Patterns of ligand binding to normal, regenerating, preneoplastic rat hepatocytes.* Cancer Res., 1987. **47**(15): 3954-8.

Heeren, J., et al., Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. J Cell Sci, 1999. **112**(Pt3): p. 349-59.

Herz, J., et al., 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 a lipoprotein receptor. EMBO J., 1988. **7**(13): p. 4119-27.

Higgins, G.M., and Anderson, R.M., *Experimental pathology of the liver, 1: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.* Arch Path., 1931. 12: p.186-202.

Hofmann, S.M., et al., Adipocyte LDL receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice. J Clin Invest., 2007. **117**(11): p. 3271-82.

Ji, Z.S., et al., Variable heparan sulfate proteoglycan binding of apolipoprotein *E* variants may modulate the expression of type *III* hyperlipoproteinemia. J Biol Chem., 1994. **269**(18): p. 13421-8.

Kang, D.E., et al., *Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway.* J Clin Invest., 2000. **106**(9): p. 1159-66.

Kolovou, G., et al., *Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Gender.* Ann Clin Lab Sci., 2009. **39**(2): p. 120-133.

Kounnas, M.Z., et al., *LDL* receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. Cell., 1995. **82**(2): p. 331-40.

Kuipers, F., et al., *Altered lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice does not affect cholesterol balance across the liver.* Hepatology, 1996. **24**(1): p. 241-7.

Kuipers, F., et al., *Impaired secretion of very low density lipoprotein-triglycerides by apolipoprotein E- deficient mouse hepatocytes.* J Clin Invest. 1997. **100**(11): p. 2915-22.

Laatsch, A., et al., *Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptorrelated protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance.* J. Atherosclerosis. 2009. **204**(1): p. 105-11. Epub 2008.

Leclercq, I.A., et al., *Defective hepatic regeneration after partial hepatectomy in leptin-deficient mice is not rescued by exogenous leptin.* Lab Invest., 2006. **86**(11): p. 1161-71. Epup 2006.

Li, W., et al., STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. J Biol Chem., 2002. **277**(32): p. 28411-7. Epub 2002.

Lillis, A.P., et al., *LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies.* Physiol Rev., 2008. **88**(3): 887-918.

Linton, M.F., *Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E- deficient mice by bone marrow transplantation.* Science, 1995. **267**(5200): p. 1034-7.

Lund, H., et al., *Lipoprotein binding and endosomal itinerary of the low density lipoprotein receptor-related protein in rat liver.* Proc Natl Acad Sci, 1989. **86**(23): p. 9318-22.

Martins, P. N.A., et al., *Rodent models of partial hepatectomies*. Liver int., 2008. **28**(1): p. 3-11.

März, W., et al., Subspecies of apoA containing lipoproteins: differential turbidmetric determination of lipoproteins LpA and LpAI. Clin Chem Clin Biochem. 1988. 26: p. 573-8.

Mahley, R.W., and Huang, Y., *Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglyans in trapping, transferring, and internalizing.* J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 94-8.

Mastrodonato, M., et al., *Caveolin-1 and mitochondrial alterations in regenerating rat liver.* Microsc Res Tech., 2012. **10.**1002/jemt.22027.

May, P., et al., *Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling.* Cell Mol Life Sci. 2005. **62**(19-29): p. 2325-38.

McLean, J.W., et al., Rat apolipoprotein *E mRNA*. Cloning and sequencing of double-stranded cDNA. J Biol Chem., 1983. **258**(14): p. 8993-9000.

Michalopoulos, G. et al., *Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture.* Cancer Res, 1982. **42**(11): 4673-4682.

Milani, S., et al., *Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver.* Am J Pathol. 1994. **144**(3): p. 528-37.

Mitchell, C., et al., *Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration.* J Biol Chem., 2005. **280**(4): 2562-8. Epup 2004.

Narayan, K.A., et al., *Rat serum lipoproteins after partial hepatectomy.* Proc Soc Exp Biol Med., 1968. **129**(1): p. 6-12.

Neuhauser, H., et al., *Prävalenz des metabolischen Syndroms in Deutschland: eine Sensitivitätsanalyse.* German medical science. 2005. [Online im Internet.]
URL: http://www.egms.de/en/meetings/gmds2005/05gmds183.shtml [Stand: 15.12.2010].

Oertel, M., and Shafritz, D.A., Stem *cells, cell transplantation and liver repopulation.* Biochim Biophys Acta., 2008. **1782**(2): p. 61-74. Epub 2007.

Okada, S.S., et al., Contrasting effects of plasminogen activators, urokinase receptor, and LDL receptor-related protein on smooth muscle cell migration and invasion. Arterioscler Thraomb Vasc Biol., 1996. **16**(10): p. 1269-76.

Orr, A.W., et al., *Thrombospondin signalling through the calreticulin/LDL receptorrelated protein co-complex stimulates random and directed cell migration.* J Cell Sci., 2003. **116**(Pt14): p. 2917-27.

Panduro, A., et al., *Regulation of hepatic and non-hepatic apolipoprotein A-I and E gene expression during liver regeneration.* Biochim Biophys Acta., 1993. **1167**(1): p. 37-42.

Pedreño, J., et al., *Platelet function in patients with familial hypertriglyceridemia: evidence that platelet reactivity is modulated by apolipoprotein E content of very-low-density lipoprotein particles.* Metabolism, 2000. **49**(7): p. 942-9.

Peters, M., et al., *Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration.* Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1663-71. Rail, S.C., et al., *Human apolipoproteinE: The complete amino acid sequence.* J Biol Chem, 1982 **57**: p. 4171-4178.

Riehle, K.J., et al., *Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3.* J Exp Med., 2008. **205**(1): p. 91-103. Epub 2007.

Rohlmann, A., et al., *Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombinant confirms of LRP in clearance of chylomicron remnants.* J Clin Invest., 1998. **101**(3): p. 689-95.

Sato, M., et al., *Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype.* Cell Struct Funct., 2003. **28**(2): p. 105-12.

Schmucker, DL., Sanchez, H., *Liver regeneration and aging: a current perspective.* Curr Gerontol Geriatr Res., 2011. 2011:526379. Epub 2011 Sep 8.

Schwandt, P., Parhofer, K. G., (2007) *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen,* 3. Auflage, Schattauer Verlag.

Shimano, H., et al., Secretion-recapture process of apolipoprotein *E* in hepatic ubtake of chylomicron remnants in transgenic mice. J Clin Invest., 1994. **93**(5): p. 2215-23.

Shteyer, E., et al., *Disruption of hepatic adipogenesisi is associated with impaired liver regeneration in mice.* Hepatology., 2004., **40**(6): p. 1322-32.

Skrtic, S., et al., *Possible roles of insulin-like growth factor in regulation of physiological and pathophysiological liver growth.* Horm Res., 2001. **55** Suppl 1: p. 1-6.

Song, H., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes* cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9. Cancer Res., 2009. **69**(3): p. 879-86. Epub 2009.

Tanoue, S., et al., *Liver regeneration after partial hepatectomy in rat is more impaired in a steatotic liver induced by dietary fructose compared to dietry fat.* Biochem Biophys Res Commun., 2011. **407**(1):163-8. Epub 2011. Taub, R., *Liver regeneration: from myth to mechanism.* Nat Rev Mol Cell Biol., 2004. **5**(10): p. 836-47.

Tiberio, G.A.M., et al., *IL-6 promotes compensatory liver regeneration in cirrhotic rat after partial hepatectomy.* Cytokine, 2008. **42**(3): p. 372-8. Epub 2008.

van den Elzen, P., et al., *Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation.* Nature, 2005. **437**(7060): p. 906-10.

Weisgraber, K.H., et al., *Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms.* J Biol Chem., 1981. **256**(17): p. 9077-83.

Wilson, C., et al., *Three dimensional structure of the LDL-receptor binding domain of human apolipoprotein E.* Science, 1991. 252: p. 1817–22.

Wisse, E., et al., *The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse.* Hepatology, 1985. **5**(4): p. 683-92.

Yin S, et al., *Enhanced liver regeneration in IL-10-deficient mice after partial hepatectomy via stimulating inflammatory response and activating hepatocyte STAT3.* Am J Pathol., 2011. **178**(4): p. 1614-21.

Zhong, Z., et al., *Inhibition of transforming growth factorbeta/Smad signaling improves regeneration of small-for-size rat liver grafts.* Liver Transpl., 2010. **16**(2): p. 181-190.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: http://www.bertelsmannbkk.de/fileadmin/Redakteure/Bilder/gesundheitslexikon/524970.jpg; Stand 25.08.2009

Abbildung 2.2: http://dolly.biochem.arizona.edu/Bioc462b_Honors_Spring_2009/jlarsen/Photos/lip oprotein.jpg; Stand 28.08.2009

Abbildung 2.3: Heeren, J., 2008

Abbildung 2.4: Taub, R., *Liver regeneration: from myth to mechanism.* Nat Rev Mol Cell Biol., 2004. **5**(10): p. 836-47

Abbildung 3.1: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/58/CreLoxP_experiment.png; Stand 17.09.2009

Abbildung 3.2: http://www.zgenebio.com.tw/upload/xrze2rw1m0.jpg; Stand 17.09.2009

Abbildung 3.3:

The Anatomy of the Laboratory Mouse; Margaret J. Cook; 58. Stomach and liver.; http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure58.shtml; Stand 17.09.2009

Abbildung 3.4: Dissertation "Bedeutung von LRP1 für die Differenzierung muriner Osteoblasten", Dr. Laura Ochs

Abbildung 4.1 bis 4.5.4.4: Svenja Mondry

10. Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren bedanken, der mir diese Dissertation und die Teilnahme an Graduiertenkollegs ermöglicht hat und somit verantwortlich für meine wissenschaftliche Ausbildung ist.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. physiol Dr. h.c. Ulrike Beisiegel bedanken, ohne deren Unterstützung die Dissertation ebenfalls nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank geht an Sandra Ehret, die mich tagtäglich durch die Wirren des Labors geführt, mich geduldig in diverse Methoden angeleitet und unterstützt hat.

Zudem möchte ich mich bei PD Dr. rer. nat. Johannes Herkel für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg "Entzündung und Regeneration" des Jahrgangs 2007 sowie für die Unterstützung im Rahmen einer Kooperation mit der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des UKE bedanken. In diesem Rahmen möchte ich auch Nicola Peters und Dipl.-Biol. Dorothee Schwinge ausdrücklich für ihren tatkräftigen Beitrag danken.

11. 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Svenja Mondry