# Physiologische Bedeutung des Adaptorproteins PID1 für die Lipoprotein-Rezeptor-vermittelte Endozytose

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften des Fachbereichs Biologie,

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Kirstin Albers** 

aus Emden

Hamburg 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. J. HEEREN Weitere Gutachterin der Dissertation: Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS Tag der Disputation: 25. April 2014

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Heeren
- 2. Gutachter: Prof Dr. Iris Bruchhaus

Für meine Familie

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.		1
	1.1 Endosom	aler Transport von Proteinen	1
	1.1.1	Die endosomalen Kompartimente der Zelle	1
	1.1.2	Rezeptor-vermittelte Endozytose	2
	1.1.3	Der Retromer Komplex	3
	1.2 Funktion	und Bedeutung von Adaptorproteinen	4
	1.2.1	PTB-Adaptorproteine	6
	1.2.1.1	IRS-1-und Shc- ähnliche PTB-Adaptorproteine	7
	1.2.1.2	Dab-ähnliche PTB-Adaptorproteine	7
	1.2.1.3	Das Adaptorprotein Phosphotyrosine Interacting Domain containing 1	8
	1.3 Lipoprote	in-Stoffwechsel	.10
	1.3.1	Funktion und Bedeutung von Lipoproteinen	.10
	1.3.2	Der Weg der Lipide durch den Organsimus	.11
	1.3.3	Der Low Density Lipoprotein (LDL)-Rezeptor	.14
	1.3.3.1	Regulation des LDL-Rezeptors durch das Adaptorprotein ARH	.16
	1.3.4	Low density liporotein receptor -Related Protein 1 (LRP1)	.17
	1.3.4.1	LRP1 Rezeptor-vermittelte Endozytose von Lipoproteinen	.18
	1.3.4.2	LRP1 als Signaltransduktionsrezeptor	.19
	1.4 Metabolis	che Erkrankungen	.20
	1.4.1	Bedeutung des endosomalen Transports für metabolische	
		Erkrankungen	.22
2. Fragestellung2		.23	
3.	Material un	d Methoden	.25
	3.1 Material		.25
	3.1.1	Chemikalien	.25
	3.1.2	Gebrauchsmaterial	.26
	3.1.3	Arbeitsgeräte	.27
	3.1.4	Kits und Reagenzien	.28
	3.1.5	Konstrukte	.29

	3.1.6	TaqMan Sonden	29
	3.1.7	Medien, Puffer und Lösungen	29
	3.1.8	Antikörper	31
	3.1.9	Software	32
3.2	2 Zellbiolog	gische Methoden	32
	3.2.1	Kultivierung von Zelllinien	32
	3.2.2	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	33
	3.2.3	Isolierung von primären Hepatozyten aus Mauslebern	33
	3.2.4	Kollagen-Beschichtung von Coverslips	34
	3.2.5	Transiente Transfektion von primären Hepatozyten	34
	3.2.6	Transiente Transfektion von HuH7-Zellen	35
	3.2.7	Indirekte Immunfluoreszenz	35
	3.2.8	Stimulation der Zellen mit Insulin	36
	3.2.9	Endozytose und Degradation von 125I-markierten TRL	36
	3.2.10	Endozytose von DiD-markierten TRL in primäre Hepatozyten	37
3.3	3 Biochemi	sche Methoden	38
	3.3.1	Herstellung von Proteinhomogenaten aus Zellen	38
	3.3.2	Membranprotein Präparation aus Gewebe	38
	3.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	39
	3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
	3.3.5	Western-Blot-Analyse	40
	3.3.6	Immunochemischer Proteinnachweis auf der	
		Nitrocellulosemembran	40
	3.3.7	Isolierung von Lipoproteinen aus dem Blut	41
	3.3.8	Markierung der TRL mit DiD	42
	3.3.9	Cholesterol und Triglyzerid-Bestimmung im Plasma	42
	3.3.10	Fast Performance liquid chromatography (FPLC)	43
	3.3.11	ELISA zur Bestimmung von Hormonen im Plasma	43
	3.3.12	<sup>125</sup> I-Iodierung von isolierten TRLs	44
	3.3.13	Radioaktive Markierung von Glukose und Lipiden	44
3.4	4 Molekular	rbiologische Methoden	45
	3.4.1	Generierung einer PID1-Knockout-Maus	.45
	3.4.2	Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben	46

3.4.3	Reverse Transkription	47
3.4.4	Quantitative Realtime-PCR (qPCR)	.48
3.4.5	Genotypisierung von PID1 <sup>-/-</sup> -Mäusen	.48
3.4.6	Agarose-Gelelektrophorese	49
3.5 Metabolis	sche Untersuchungen in der Maus	.50
3.5.1	Hochfettdiät Studie	50
3.5.2	Oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT)	.50
3.5.3	Insulin-Toleranz-Test (ITT)	50
3.5.4	Organ-Aufnahme von Glukose und Lipiden	.51
3.6 Sonstige	Methoden	.51
3.6.1	Gewinnung von Plasma	.51
3.6.2	Tierhaltung	.52
4. Ergebnisse		53
4.1 Interaktio	on von IRP1 und PID1 in primären Henatozyten und	
Hepatom	azellen	53
4 1 1	Endogene Kolokalisation von LRP1 und PID1 in primären	55
	Henatozyten.	53
4.1.2	Kolokalisation nach Überexpression von LRP1-eGFP und	
	PID1-RFP	55
4.2 Die Rolle	e von PID1 für die zelluläre Lokalisation von LRP1	.55
4.2.1	LRP1 Lokalisation nach siRNA-vermitteltem PID1 Knockdown in	
	primären Hepatozyten	.56
4.2.2	Subzelluläre Verteilung von LRP1 in Wildtyp und PID1 knockdown	
	Hepatomazellen	.58
4.2.2.1	LRP1 und frühe Endosomen	.58
4.2.2.2	LRP1 und Lysosomen	60
4.2.2.3	LRP1 und der Golgi-Apparat	.62
4.2.2.4	LRP1 und der Retromerkomplex	.64
4.2.2.5	LRP1 und das Zytoskelett der Zelle	.68
4.2.2.6	LRP1 Lokalisation nach Knockdown des Retromers in PID1-defiziente	en
	Zellen	.69
4.3 Generier	ung einer PID1-Knockout-Maus	.70

	4.3	3.1	Genotypisierung71
	4.3	3.2	Expressionsanalyse der mRNA von PID1 und LRP1 in verschiedenen
			Geweben72
	4.3	3.3	Protein-Expression von PID1, LRP1 und dem LDL-Rezeptor in
			Leberextrakten von Wildtyp und PID1 Knockout Mäusen73
4.	.4	Die Rolle	der LRP1-PID1-Interaktion für die Funktion von LRP174
	4.4	4.1	Insulin-vermittelte Translokation von LRP1 in primären
			Hepatozyten74
	4.4	4.2	Aufnahme von triglyzeridreichen Lipoproteinen76
	4.4	4.3	Abbau von triglyzeridreichen Lipoproteinen78
4.	.5	Hochfette	liät-induzierte Stoffwechselerkrankungen von Wildtyp-und PID1-
		knockout-N	Mäusen79
	4.5	5.1	Auswirkungen der Hochfettdiät auf Körper- und Organgewicht80
	4.5	5.2	Konsequenzen für den Glukosestoffwechsel und Insulinresistenz81
		4.5.2.1	Expressionsanalyse von Genen des Glukosestoffwechsels in der Leber
			und im subkutanen Fettgewebe82
		4.5.2.2	Glukosetoleranz und Insulinwerte nach kombiniertem OGFT83
		4.5.2.3	Adiponektin Konzentrationen im Plasma87
		4.5.2.4	Organaufnahme von radioaktiv-markierter Deoxyglukose nach
			OGFT
	4.5	5.3	Auswirkungen der Hochfettdiät auf den Lipidstoffwechsel90
		4.5.3.1	Plasmalipide und Lipoproteinprofile90
		4.5.3.2	Expressionsanalyse von Genen des Lipidstoffwechsels in der Leber
			und im subkutanem Fett93
		4.5.3.3	Organaufnahme von radioaktiv-markiertem Triolein nach OGFT94
5.	Di	iskussion.	
5.	.1	Rolle des	PID1 für die Lokalisation von LRP1 in der Zelle
5.	.2	Der Retro	omerkomplex ist an der Translokation von LRP1 beteiligt102
5.	.3	Die PID1	-LRP1-Interaktion gewährleistet die postprandiale Translokation von
		LRP1	
5.	.4	Die Rolle	von PID1 bei Diät-induziertem Übergewicht108
			5

7.	Literatur	verzeichnis	123
6.	5. Zusammenfassung		121
	5.4.3	Modell des möglichen Mechanismus	118
	5.4.2	Die Rolle von PID1 im Lipidstoffwechsel	113
		HFD-Mäuse	109
	5.4.1	Die PID1-Defizienz verbessert die Insulinsensitivität der	

# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha 2M$	alpha 2-Macroglobulin
ABCA1	ATP-bindende cassette A1
ABCG1	ATP-bindende cassette G1
Akt	Proteinkinase B
ANGPTL	angiopoietin-like protein
Аро	Apolipoprotein
APP	Amyloid precursor protein
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH-zip	basische Helix-Loop-Helix Leucin-zipper
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
ССР	Clathrin-coated pits
CE	Cholesterylester
CETP	Cholesterylestertransferprotein
ChREBPb	carbohydrate response element binding protein
СМ	Chylomikronen
COP-II	coat protein-II
C <sub>T</sub>	cycle of treshold
D	Asparaginsäure
Dab	Disabled
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNL	de vovo Lipogenese
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	early endosome
Е	Glutaminsäure
EEA1	early endosome antigen 1
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EGFR	epithelial growth factor Rezeptor
ELISA	enzyme-linked-immuno-sorbent assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	et alii (und andere)
φ	große, hydrophobe Aminosäure
FCS	fötales Kälberserum
FPLC	fast performance liquid chromatography
G6P	Glukose-6-Phosphat
Glut2	Glukosetransporter 2
Glut4	Glukosetransporter 4
GM130	<i>cis</i> -Golgi Matrixprotein von 130 kDa

Golgi	Golgi-Apparat
GSV	Glut4 storage vesicle
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid
HDL	high-density lipoprotein
HRP	Merrettich-Peroxidase
HSPG	Heperansulfatproteoglykan
HuH7	humane Hepatomazelllinie
ICD	intracellular domain
IDL	intermediate-density lipoprotein
IGFR	Insulin growth factor Rezeptor
INSIG	Insulin-induced gene
IR	Insulinrezeptor
IRR	Insulin-related Rezeptor
IRS	Insulinrezeptor Substrat
IRV	Insulin responsive vesicle
JIP	JNK-interacting Protein
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kd	knockdown
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L	Leucin
1	Liter
LAMP1	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 1
LDL	low-denstiy lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptor
LE	late endosome
LMF-1	lipase maturation factor
Lpl	Lipoproteinlipase
LRP1	LDL-Rezeptor-related Protein 1
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
1 (777)	
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MPR mTbp	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor murine TATA-Box-binding protein
MPR mTbp MTTP	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor murine TATA-Box-binding protein microsomal TG-Transferproteine
MPR mTbp MTTP N	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor murine TATA-Box-binding protein microsomal TG-Transferproteine Asparagin
MPR mTbp MTTP N NAFLD	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor murine TATA-Box-binding protein microsomal TG-Transferproteine Asparagin Non-Alcoholic-Fatty-Liver-Disease
MPR mTbp MTTP N NAFLD nm	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor murine TATA-Box-binding protein microsomal TG-Transferproteine Asparagin Non-Alcoholic-Fatty-Liver-Disease Nanometer
MPR mTbp MTTP N NAFLD nm NPC	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor murine TATA-Box-binding protein microsomal TG-Transferproteine Asparagin Non-Alcoholic-Fatty-Liver-Disease Nanometer Nieman-Pick.Typ C
MPR mTbp MTTP N NAFLD nm NPC OGFT	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor <i>murine TATA-Box-binding protein</i> <i>microsomal</i> TG-Transferproteine Asparagin <i>Non-Alcoholic-Fatty-Liver-Disease</i> Nanometer Nieman-Pick.Typ C orale Glukose- und Fett-Toleranz
MPR mTbp MTTP N NAFLD nm NPC OGFT OGTT	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor murine TATA-Box-binding protein microsomal TG-Transferproteine Asparagin Non-Alcoholic-Fatty-Liver-Disease Nanometer Nieman-Pick.Typ C orale Glukose- und Fett-Toleranz oraler Glukose-Toleranz-Test

p.A.	pro analysis
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphat gepufferte Saline
Pck1	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFRβ	PDGF-Rezeptor beta
PFA	Parafomaldehyde
PH	Pleckstrin Homology
PI3K	Phosphatidyinositol-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PID1	phosphotyrosine interacting domain containing 1
РКА	Proteinkinase A
PTB	Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne
PtdInsP	Phosphatidylinositolphosphate
РХ	Phox Homology
RE	recycling endosome
RFP	Red Fluorescent Protein
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RV	recycling vesicle
S1P	site-1-protease
S2P	site-2-protease
SCAP	SREBP-cleavage-activating protein
SH2	Src-homology
Shc	Src-homology-2 domain containing
SNX	sortin nexin
SR-A	Scavenger Receptor A
SR-B1	Scavenger Receptor B1
Src	zusammengesetzt aus cellular und sacomar
SRE	sterol regulating element
SREBP	sterol regulating element binding protein
TCA	Trichloressigsäure
Tfn	Transferrin
TG	Triglyzerid
TGFb	transforming growth factor beta
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TRL	Triglyzerid-reiche Lipoproteine
VLDL	very-low-density lipoprotein
Vps	vacuolar protein sorting

Abkürzungsverzeichnis

wt	Wildtyp
Х	beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin

## 1. Einleitung

## 1.1 Endosomaler Transport von Proteinen

Die eukaryotische Zelle hat unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um extrazelluläre Moleküle zu internalisieren. Neben der Phagozytose, über die große Makromoleküle (< 0,5 µm) in die Zelle gebracht werden, gibt es die Pinocytose (Silverstein et al., 1977), die im Allgemeinen als Endozytose bezeichnet wird. Hierbei werden Moleküle und extrazelluläre Flüssigkeit über kleine Vesikel internalisiert. Bei diesem Prozess, der über spezifische Rezeptoren reguliert ist, werden die Vesikel als sogenannte *Clathrin-Coated Pits* (CCP) internalisiert und über endosomale Kompartimente in der Zelle weitergeleitet. Moleküle, die Clathrin-unabhängig endozytiert werden, befinden sich häufig in Caveolae. Dies sind spezialisierte Bereiche in der Membran, so genannte *lipd rafts*, die u.a. auch am Lipidstoffwechsel beteiligt sind. Das strukturgebene Protein der Caveolae ist Caveolin1 (Parton and Simons, 2007).

## 1.1.1 Die endosomalen Kompartimente der Zelle

Die Clathrin-abhängige Endozytose kommt in fast allen tierischen Zellen vor. Hierbei werden die zu internalisierenden Rezeptoren und ihre Liganden über bestimmte Adaptorproteine wie dem Adaptor Protein-2 (AP-2), an Clathrin gebunden. Die durch Abknospung von der Plasmamembran entstehenden Vesikel, werden dann über Dynamin von der Membran abgeschnürt (van der Bliek et al., 1993). Nach der Internalisierung des Vesikels zerfällt das Clathringerüst wieder in einzelne Clathrin-Triskelionen (Pearse and Robinson, 1990) und der dabei entstehende Vesikel wird als frühes Endosom (*early endosome*, EE) bezeichnet. Die frühen Endosomen spielen eine wichtige Rolle für den weiteren Weg ihrer Fracht. Hier wird entschieden, ob der Inhalt zurück an die Plasmamembran recycelt oder zum endgültigen Abbau zu den Lysosmen transportiert werden soll (Sheff et al., 1999). Neben diesen beiden Wegen kann das Cargo an dieser Stelle auch über den retrograden Transport von frühen Endosomen zurück zum Golgi-Apparat (Golgi) transportiert werden (Bonifacino and Rojas, 2006).

Im Falle des Recycling-Weges, kann die Fracht entweder über den direkten Weg von den frühen Endosomen zur Plasmamembran transportiert werden oder über spezielle Recycling-Endosomen (RE), die auch als *recycling vesicles* (RV) bezeichnet werden, ablaufen. Moleküle, die für den Abbau über die Lysosomen bestimmt sind, durchlaufen die späten Endosomen (*late endosomes*, LE). Diese vesikulären Strukturen werden auch als Pre-Lysosomen bezeichnet, da ihr Lumen bereits einen sauren pH-Wert aufweist und einige lysosomale Hydrolasen schon hier aktiv sind. Der Übergang zu den Lysosomen und Lysosomen zu herrschen als ein unidirektionaler Transport (Griffiths et al., 1988). Der nicht abbaubare Inhalt der verschmelzenden Kompartimente, wie die lysosomalen Enzyme oder einige Lipidkomponenten konzentrieren sich in den Lysosomen. Diese werden dann, bis sie die nächste Verschmelzung mit späten Endosomen eingehen, als ruhende (*resting*) Lysosomen bezeichnet (Mellman, 1996).

### 1.1.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose

Bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose werden die zu internalisierenden Liganden über spezifische Rezeptoren, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, in die Zelle geschleust. Eines der bekanntesten Mitglieder dieser Gruppe ist der *low-density lipoprotein*- Rezeptor (LDL-R). Damit der Rezeptor und sein Ligand, das *low density lipoprotein* (LDL), internalisiert werden können, muss das in der Leber hergestellte Adaptorprotein ARH (autosomale rezessive Hypercholesterolemie) die Interaktion zwischen der cytoplasmatischen Domäne des Rezeptors und dem Adaptorprotein AP-2 vermitteln (He et al., 2002). AP-2 bindet an Clathrin und der Komplex aus Rezeptor, Ligand und Adaptorproteinen wird als *Clathrin-coated vesicles* (CCV) endozytiert.

Eine Ansäuerung durch die ATPase, also das Absenken des pH-Wertes in den entstehenden frühen Endosomen, führt zur Dissoziation des Liganden vom Rezeptor (Cain et al., 1989). So wird zum Beispiel der LDL-Rezeptor, nach der Internalisierung nicht in den Lysosomen abgebaut, sondern über *recycling vesicles* zur Plasmamembran zurück transportiert. Diese RVs erscheinen erst als tubuläre Ausläufer der frühen Endosomen, in denen vermehrt Rezeptoren angesammelt werden (Hopkins and Trowbridge, 1983), die dann als Vesikel abgeschnürt werden. Einige Rezeptoren durchlaufen bis zu zehn Endozytoserunden. Es ist beschrieben, dass das sogenannte *Recycling* Kompartiment in perinukleären Bereichen der Zelle, als ein intrazellulärer Pool für einige Plasmamembranrezeptoren, wie dem Tfn-Rezepter (van der Sluijs et al., 1992) oder dem *LDL-receptor-related protein1* (LRP1) dient. Laatsch et al. konnten zeigen, dass nicht nur der Rezeptor, sondern auch das Apolipoprotein (Apo)E, als Ligand, nach der Internalisierung mittels LRP1, in endosomalen Kompartimenten verbleibt. In der Leber produziertes *high-density* Lipoprotein (HDL) wird zu diesen ApoE-enthaltenen Endosomen transportiert und führt zur Sezernierung des ApoE (Heeren et al., 2006).

### 1.1.3 Der Retromer Komplex

Das Retromer ist ein heteropentamerer Komplex (Abb. 1-1), der ursprünglich im Rücktransport von Vakuolenproteinen in der Hefe entdeckt wurde (Seaman et al., 1998). In Säugerzellen besteht er aus den vacuolar protein sorting (Vps) Proteinen Vps35 (Vps35p, Äquivalent in der Hefe), Vps29 (Vps29p) und Vps26 (Vps26p) sowie zwei Mitgliedern aus der Sortin Nexin (SNX)-Proteinfamilie (Cereghino et al., 1995). Der Komplex ist im retrograden Transport von Proteinen, insbesondere Rezeptoren wie dem Vps10p in der Hefe oder dem cation-independent Mannose-6-Phosphat Rezeptor (CI-MPR) in Säugerzellen, vom Endosom zurück zum trans-Golgi-Netzwerk (TGN) tätig. MPR sind am TGN lokalisiert, um lysosomale Hydrolasen, die einen Mannose-6-Phoshat (MP)-Rest tragen, zu binden und sie anschließend in CCV zu den Pre-Lysosomen zu transportieren (Braulke and Bonifacino, 2009). Diese Rezeptoren werden nicht in den Lysosomen degradiert, sondern für die erneute Erkennung von MP-gekennzeichneten Proteinen wiederverwendet. Der Rücktransport der MPR wird durch das Retromer gewährleistet (Seaman et al., 1997; Seaman et al., 1998). Neuere Studien zeigen, dass der Retromerkomplex auch in den Transport von Transmembranproteinen von endosomalen Kompartimenten zur Plasmamembran involviert ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Retromer-assoziierte Protein SNX27 eine Rolle dabei spielt (Temkin et al., 2011).

Die beiden SNX-Proteine tragen eine *Phox homology* (PX) Domäne, womit sie an Phosphatidylinositol-3-Phosphate (PI3P) und somit an endosomale Membranen binden können (Cozier et al., 2002; Yu and Lemmon, 2001). Bei den im Retromer gefundenen SNX Proteinen handelt es sich um SNX1, SNX2, SNX5 oder SNX6, wovon zwei dieser (SNX1/2 mit SNX5/6) über ihre BAR-Domäne dimerisieren und so an die endosomalen

Tubuli bzw. Vesikel binden können. Die trimäre Vps35-Vps29-Vps26-Untereinheit des Retromer-Komplexes ist für die Cargo-Selektion verantwortlich. Vps35 dient als Plattform für die anderen Vps-Proteine und bindet die zu transportierenden Proteine. Das kleinste Protein, das Vps29, sorgt für das *self-assembly* des Komplexes. Vps26 ist für die Interaktion zwischen der Vps-Untereinheit und dem SNX-Dimer zuständig (Nothwehr et al., 1999; Nothwehr et al., 2000).



Abb. 1-1 Das Retromer und seine Interaktionen.

Vps35p interagiert über den N-Terminus mit Vps26p und über den C-Terminus mit Vps29p. Vps35p bindet außerdem das zu transportierende Protein, wie das Vps10p oder den CI-MPR. Vps5p und Vps17p dimerisieren über ihre C-terminalen (BAR)-Domänen. Die entsprechenden Proteine in Säugerzellen sind SNX1 und SNX2, alle vier tragen Phox Homology (PX)-Domänen über die sie an Phosphatidylinositol-3-Phosphate in endosomalen Membranen binden. Vps5p bzw. SNX1 interagiert mit dem Vps35p-Vps26p-Vps29p-Subkomplex, in dem die N-terminale Region des Vps5p/SNX1 mit dem N-Terminus des Vps35p interagiert. Quelle: Seaman, M. N. J, 2005.

## 1.2 Funktion und Bedeutung von Adaptorproteinen

Als Adaptorproteine werden Proteine, meist ohne eigene katalytische Funktion, bezeichnet, die für die Interaktion anderer Proteine notwendig sind. Sie dienen als eine Art Plattform, auf der die Interaktionspartner zusammenkommen. Viele physiologische Vorgänge und Signalwege könnten ohne Adaptoproteine nicht ablaufen (Flynn, 2001). So koppeln Adaptorproteine z.B. Transmembranrezeptoren, die internalisiert werden, an die Endozytosemaschinerie, regulieren den Transport von Vesikeln zwischen endosomalen Kompartimenten über das Cytoskelett, und sind für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität von größter Wichtigkeit.

Um Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln, verfügen Adaptorproteine über besondere Bindungsdomänen, über die sie bestimmte Motive in der Aminosäuresequenz der Zielproteine binden können. Dabei werden die Adaptorproteine anhand ihrer Spezifität in verschiedene Gruppen unterteilt (Uhlik et al., 2005).

Die heterotetrameren Clathrin-Adaptorkomplexe (AP-Proteine), zu denen unter anderen AP-1 und AP-2, gezählt werden (Hirst et al., 2013; Robinson, 2004), sind im endosomalen *Trafficking* von Proteinen von großer Bedeutung. Bei der Clathrin-vermittelten Endozytose des LDL-R stellt das AP-2 (Robinson, 1989) die Interaktion zwischen der Clathrinhülle und dem LDL-R- Adaptorprotein ARH her. AP-2 besteht aus vier Untereinheiten, der  $\alpha$ -,  $\beta$ 2-,  $\mu$ 2- und  $\sigma$ 2-Adaptin-Untereinheit (Kirchhausen, 1999). Dabei interagiert die  $\beta$ -Untereinheit des AP-2 über ein spezielles Clathrin-Box-Motiv (L $\phi$ D/E $\phi$ D/E, Leucin- $\phi$ – Asparaginsäure/ Glutaminsäure, $\phi$ –Asparaginsäure/Glutaminsäure, wobei ein  $\phi$  eine große hydrophobe Aminosäure (AS) darstellt) an Clathrin (Owen et al., 2000; ter Haar et al., 2000). Das  $\mu$ 2-Adaptin bindet über an Yxx $\phi$  (x steht für eine beliebige AS)- und Di-Leucin-Motive im Transmembran-Cargos, die  $\alpha$ -Untereinheit vermittelt die Interaktion des Adaptorproteins mit Phosphatidylinositolphosphaten (PdtInsP) der Plasmamembran. Ein weiteres Mitglied der AP-Proteinfamilie ist das AP-1. Dieses Adaptorprotein befindet sich am TGN und in RE und ist unter anderem an der Sortierung von Transmembranproteinen an die apikale oder basolaterale Oberfläche der Zelle beteiligt (Deborde et al., 2008).

Polarisierte Zellen weisen unterschiedliche Kompositionen ihrer apikalen und basolateralen Membranen auf (Bryant and Mostov, 2008; Mellman and Nelson, 2008). Für den LDL-Rezeptor und auch für LRP1 ist bekannt, dass diese Lipoprotein-Rezeptoren basolateral sortiert werden (Matter et al., 1992). Für die richtige Sortierung tragen die Proteine bestimmte Signalmotive, an die wiederum Adaptorproteine binden können. Bei Patienten, die an der Turku-Variante der familiären Hypercholesterolämie leiden, kommt es durch eine Mutation im Sortierungsmotiv zur Misslokalisation des LDL-Rezeptors. Hierbei wird der Rezeptor an die apikale Oberfläche von Epithelzellen und in Hepatozyten an die Gallen-kanalikuläre Seite transportiert (Koivisto et al., 2001). Durch den damit einhergehenden Verlust des LDL-R an der basolateralen Oberfläche, kommt es zur verminderten Aufnahme von Cholesterol aus dem Blut, was wiederum zur Hypercholesterolämie führt.

## 1.2.1 PTB-Adaptorproteine

Pawson und Kollegen beschrieben die *src-homology* 2 (SH2)-Domäne im Carboxylterminus der Src-Tyrosin-Kinase als eine spezielle Bindungsdomäne. Nicht viel später konnten diese und andere Gruppen weitere Bindungsmodule wie die SH3, die *Pleckstrin homology* (PH) und auch die *phosphotyrosine-binding* (PTB) Domäne in vielen Proteinen, die Protein-Protein-Interaktion vermitteln, identifizieren (Pawson, 1995; Pelicci et al., 1992).

PTB-Adaptorproteine enthalten eine PTB-Domäne, wobei diese die Interaktion mit dem Liganden vermittelt. Die Namensgebung dieser Domäne ist irreführend, da sie ursprünglich als Phosphotyrosin-spezifische Domäne identifiziert wurde. Mittlerweile wurden aber immer öfter PTB-enthaltene Proteine beschrieben, die Phosphotyrosinunabhängig an ihren Liganden binden. Die strukturelle Auflösung der PTB-Domäne zeigte, dass sie eine PH-Domäne beinhaltet. Die Anatomie der PH-Domäne wird auch als superfold bezeichnet und weist im Allgemeinen sieben antiparallele β-Stränge auf, die zwei Weitere Merkmale der PTB-Domäne sind eine Peptidbindungstasche, die durch den  $\beta$ 5-Strang und der C-terminalen  $\alpha$ -Helix geformt wird, sowie eine extrem basische "Krone", die Phospholipide binden kann. Es konnte gezeigt werden, dass PTB-Adaptorproteine wie ARH (Mishra et al., 2002b), Disabled (Dab)-1 (Howell et al., 1999; Yun et al., 2003) und Dab-2 (Mishra et al., 2002a), Insulinrezeptorsubstrat (IRS)-1 (Takeuchi et al., 1998) und auch Shc (Ravichandran et al., 1997) über ihre PH-Domäne mit interagieren. als Phospholipiden PH-Domänen gelten der Prototyp der Phosphoinosidbindedomäne. Diese Beobachtungen begründen, dass PTB-enthaltene Proteine oft in juxtamembranen Bereichen oder direkt an Membranen lokalisiert sind. Die Interaktion von PTB-Proteinen mit Phospholipiden und ihre gleichzeitige Bindung an spezifische Liganden sind zwei unabhängig voneinander ablaufende Prozesse (Yun et al., 2003).

Trotz der beschriebenen konservierten Grundstruktur der PTB-Domäne, werden PTB-Adaptorproteine in drei generelle Untergruppen, die IRS-, die Shc- und die Dab-ähnlichen PTB-Proteine kategorisiert (Uhlik et al., 2005), die im Folgenden näher beschrieben werden.

## 1.2.1.1 IRS-1-und Shc- ähnliche PTB-Adaptorproteine

Den IRS-1- und Shc-ähnlichen ist gemein, dass sie nur phosphoryliertes Tyrosin (Y) in den entsprechenden Motiven ihrer Liganden binden. Diese Motive sind oft NPxY- oder leicht davon abweichende Motive. Sie werden aber anhand ihrer Struktur und der Verwendung unterschiedlicher Aminosäuren in ihrer Bindungstasche unterschieden. Proteine der IRS-1ähnlichen weisen eine kürzere PTB-Domäne auf als die Shc-ähnlichen. Sie werden als Adaptorproteine für die Tyrosin-phosphorylierte cytoplasmatische Domäne des Insulin-Rezeptors (IR), Insulin-*related* Rezeptor (IRR), Insulin-*growth-factor* Rezeptor (IGFR), *epithelial growth factor* Rezeptor (EGFR) und vielen weiteren Rezeptortyrosinkinasen und Tyrosinkinasen beschrieben (Solow et al., 1999).

Shc-ähnliche PTB-Domänen weisen zusätzlich eine SH2-Domäne auf, die es ihnen erlaubt eine Vielzahl von aktivierten Wachstumsfaktorrezeptoren zu binden. Nach der Bindung an den Rezeptor wird Shc selbst Tyrosin-phosphoryliert und rekrutiert wiederum andere Adaptorproteine, wodurch dann beispielsweise der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg stimuliert wird (Lopez-Ilasaca, 1998). Daneben ist bekannt, dass es nach einer Phosphorlierung des NPxY-Motivs in der cytoplasmatischen Domäne von LRP1 durch eine v-Src-Kinase zur Rekrutierung von Shc an den Rezeptor kommt. Diese Interaktion führt dann zur Aktivierung des Ras-Signalweges (Barnes et al., 2001).

## 1.2.1.2 Dab-ähnliche PTB-Adaptorproteine

Charakteristisch für die Gruppe von Dab-ähnlichen PTB-Adaptorproteinen ist, dass sie nicht an phosphoryliertes Thyrosin im NPxY-Motiv ihres Liganden binden können. Dab1ähnliche PTB-Adaptorproteine weisen, genau wie Shc-ähnliche, zwei α-Helices mehr als IRS-1-ähnliche in ihrer PTB-Domäne auf. Dab-1, Dab-2, ARH, Numb oder auch X-11 werden in diese Untergruppe der PTB-Proteine eingeordnet. Die Eigenschaft der PTB Proteine, neben NPxY-Motiven auch PdtInsP zu binden, ist bei dem Dab-ähnlichen ARH bei der Rolle des Adaptorproteins in der Clathrin-vermittelten Endozytose von großer Bedeutung (Garcia et al., 2001; Mishra et al., 2002b). Es ist bekannt, dass viele Dabähnliche PTB-Proteine an Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie binden. Dab-1 bindet zum Beispiel an den LDL-Rezeptor (Hiesberger et al., 1999; Trommsdorff et al., 1999) und wurde im Zusammenhang mit der Bindung von Reelin gefunden. Reelin ist ein von corticalen Neuronen sekretiertes Protein, das an die extrazelluläre Domäne einiger LDL- Rezeptoren (LDLR, LRP, VLDLR, ApoER2) (Gotthardt et al., 2000; Oleinikov et al., 2000) bindet. Weitere Adaptorproteine, wie GULP und Dab-2, binden an LRP1. Ihnen wird eine wichtige Rolle in der Endozytose des Rezeptors zugeordnet (Mishra et al., 2002a). Dab-2 vermittelt dabei die Interaktion mit AP-2 und dem Clathrin-"Käfig" und unterstützt den Komplex bei der Invagination der Vesikel.

## 1.2.1.3 Das Adaptorprotein Phosphotyrosine Interacting Domain containing 1

Das Adaptorprotein *Phosphotyrosine Interacting Domain containing* 1 (PID1) wurde ursprünglich als ein intrazelluläres Protein beschrieben, dass im Fettgewebe von übergewichtigen Personen stärker exprimiert wird als bei Normalgewichtigen (Wang et al., 2006). Das humane PID1-Gen befindet sich auf Chromosom 2 (2q 36.3; Genbank Accession Nr. AY317148) und kommt in drei Isoformen, MWQP, MPRI, MFSL, vor, die anhand der jeweils ersten vier Aminosäuren bezeichnet werden. Caratù und Kollegen (Caratù et al., 2007) konnten PID1 in einem Screeningprojekt als einen Interaktionspartner von LRP1 identifizieren. In dieser Untersuchung wurde PID1 in einem trimären Komplex mit LRP1 und Cubulin gefunden. Aus dieser Entdeckung rührt auch die Bezeichnung PCLI1 (*PTB-containing Cubilin and LRP1 interacting protein 1*) für PID1. Oft wird es auch als NYGGF4 benannt. Das murine PID1 wird nur als MWQP-Isoform exprimiert. Mit 217 Aminosäuren (28 kDa) ist es ein kleines Protein, das hauptsächlich aus einer PTB-Domäne besteht, die an nicht phosphorylierte NPxY-Motive bindet (Doktorarbeit von Britta Hoffzimmer).

Die gefundene Interaktion von PID1 mit LRP1, die durch Yeast two Hybrid und Pulldown-Experimente bestätigt wurde, (Caratù et al., 2007; Kajiwara et al., 2010) lässt darauf schließen, dass PID1 im Lipidstoffwechsel involviert ist. Die Beobachtung, dass die Sequenz von PID1 der des LDL-R assoziierten Adaptorproteins ARH stark ähnelt, weist auf eine mögliche Beteiligung von PID1 an der Endozytose von LRP1 hin. Wang et al. beobachteten eine Förderung der Proliferation von Pre-Adipozyten nach Überexpression von PID1. In dieser Studie konnten gezeigt werden, dass überexprimiertes PID1, welches mit dem green-fluorescent-protein (GFP) gekoppelt war im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. Weiterhin konnten sie zeigen, dass diese Überexpression von PID1 dazu führte, dass sich eine größere Anzahl der Zellen in der S-Phase der Proliferation befand (Wang et al., 2006). PID1 wird auch im Zusammenhang mit Insulinresistenten Patienten ist die Aufnahme Folge von Übergewicht ist, diskutiert. Bei insulinresistenten Patienten ist die Aufnahme von Glukose aus dem Blut gestört. In gesunden Adipozyten oder Myozyten bindet das Insulin, das nach der Nahrungsaufnahme von den  $\beta$ -Zellen des Pankreas ausgeschüttet wird, an den IR. Diese Interaktion bewirkt die Aktivierung einer Signalkaskade über IRS-1, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase B (Akt), die zur Translokation des Glukosetransporters 4 (Glut4) führt. Glut4 enthaltene intrazelluläre Vesikel (GSV, *Glut4 storage vesicle*), die auch auch als *insulin responsive vesicles* (IRV) bezeichnet werden (Bogan and Kandror, 2010), werden daraufhin an die Plasmamembran transportiert, wo die Glukose über den Transporter in die Zelle gelangt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass PID1-überexprimierende 3T3-L1 Adipozyten weniger Glukose auf den Insulin-Stimulus hin aufnehmen (Zhang et al., 2008) als Zellen, bei denen die Expression der PID1-mRNA herunterreguliert war (Zhang et al., 2010). Der *Knockdown* von PID1 führt in kultivierten C2C12 Skelettmuskelzellen zu einer stärkeren Glut4-Translokation und einer erhöhten Glukoseaufnahme (Zeng et al., 2012).

Daneben wurde beschrieben, dass PID1 eine Rolle bei der Produktion von *reactive oxigen species* (ROS) in den Mitochondrien spielt (Zhao et al., 2010) und es dadurch zu einer Fehlfunktion der Mitochondrien kommt. Die durch Übergewicht verursachte verminderte Insulinsensitivität wurde im Zusammenhang mit einer Reduktion der mitochondrialen ATP-Produktion gefunden (Petersen et al., 2003).

Weitere Studien bringen PID1 und seine Interaktion mit LRP1 in Verbindung mit Alzheimer. In den Gehirnen von Patienten wurde eine verminderte Expression von PID1 beobachtet (Kajiwara et al., 2010).

Unabhängig von LRP1 wurde PID1 kürzlich in einer Studie über Gehirntumore als ein Wachstum-inhibierender Faktor beschrieben. Bei Patienten, die an Medulloblastomen und Gliomen leiden, konnte festgestellt werden, dass die Tumore, in denen eine höhere Expression von PID1 vorhanden war, langsamer wuchsen (Erdreich-Epstein et al., 2013).

PID1 scheint somit wie LRP1 an der Regulation pathophysiologisch bedeutsamer Prozesse beteiligt zu sein. Die Funktion der LRP1-PID1-Interaktion wurde bislang jedoch nicht beschrieben und ist Gegenstand dieser Arbeit.

## 1.3 Lipoprotein-Stoffwechsel

## 1.3.1 Funktion und Bedeutung von Lipoproteinen

Lipoproteine sind für den Transport von Lipiden und einigen fettlöslichen Vitaminen durch den Organismus zuständig. Für die Versorgung der Zellen mit Vitamin K sind Lipoproteine von größter Bedeutung, weil dieses Vitamin ausschließlich über Lipoproteine im Blut transportiert wird. Lipoproteine werden in unterschiedliche Klassen unterteilt. So gehören Chylomikronen (CM) und die *very-low-density lipoproteins* (VLDL) zu den triglyzeridreichen Lipoproteinen. LDL sowie HDL werden als cholesterolreiche Lipoproteine eingestuft. Neben der unterschiedlichen Zusammensetzung der zu transportierenden Lipide, sind sie sehr einfach anhand ihrer Größe bzw. Dichte zu trennen. CM variieren in ihrer Größe zwischen 75 und 1200 nm und sind die Lipoproteine mit der geringsten Dichte (<0,95 kg/L). Sie transportieren hauptsächlich Triglyzeride (TG) und kaum Cholesterol oder Cholesterylester (CE).



Abb. 1-2 Aufbau von Lipoproteinen

Lipoproteine sind Mizellen aus einer Phospholipidschicht. Sie tragen Apolipoproteine und transportieren, Triacylglyzerole, Cholesterylester und freies, nicht verestertes Cholesterol (A). Darstellung der unterschiedlichen Lipoproteinklassen. Chylomikronen und VLDL sind triglyzeridreiche Lipoproteine, LDL und HDL werden als cholesterolreiche Lipoproteine eingestuft (B). Quelle: adaptiert aus dem Internet (http://withfriendship.com/user/sathvi/lipoprotein.php)

VLDL beinhalten mehr Cholesterol als CM, der Anteil der TG in diesen Lipoproteinen überwiegt bei weitem dem des Cholesterols. Sie weisen eine Größe zwischen 30 und 80 nm auf und ihre Dichte schwankt zwischen 0,95 und 1,019 kg/L. Freies und verestertes

Cholesterol wird überwiegend mittels LDL durch den Organismus transportiert. Diese Klasse der Lipoproteine ist zwischen 18-25 nm groß und wird als 1,019-1,063 kg/L dichte Partikel beschrieben, die nur wenig TG beinhalten.

Wie der Name schon sagt, weist das HDL die höchste Dichte (1,063-1,210 kg/L) aller bekannten Lipoproteine auf. Es ist gleichzeitig mit seinen gerade einmal 5-12 nm auch das kleinste und transportiert hauptsächlich Cholesterol und nur einen geringen Anteil an TG. Im Vergleich zum LDL sind die Kapazitäten der HDL aber geringer.

Neben den zu transportierenden Lipiden und ihrer Phospholipidmembran beinhalten Lipoproteine spezielle Proteine, die so genannten Apolipoproteine (Apo). Hierbei handelt es sich zum einen um strukturgebende Proteine wie dem ApoB-48 der CM, dem ApoB-100 in VLDL und LDL sowie dem ApoA-I im HDL. Zum anderen sind es funktionelle Apoproteine wie ApoE, das beispielsweise die Bindung von CM an LRP1 vermittelt, worauf später in dieser Arbeit näher eingegangen wird.

### 1.3.2 Der Weg der Lipide durch den Organsimus

Die Organisation von Lipiden ist von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung zellulärer Membranen und die Energiehomöostase des Organismus. Da die hydrophoben Lipide nicht einfach im Blut transportiert werden können, werden sie in Lipoproteinen verpackt (Lehrbuch "The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease). Der Lipoproteinstoffwechsel bescheibt den Transport von Lipiden, wobei zwischen dem exogenen sowie endogenen Transport und dem reversen Cholesterintransport unterschieden wird. Der exogene Weg wird auch als Chylomikronenstoffwechsel bezeichnet. Hierbei werden komplexe Lipide, die über die Nahrung aufgenommen wurden im Dünndarm durch Enzyme (Lipasen und Esterasen) gespalten. Die entstehenden Monoglyzeride, Phosphatide und das Cholesterol, welches über die Niemann-Pick C 1like1 (NPC1L1) Proteine transportiert wird (Wang and Song, 2012), werden von den Epithelzellen der Mucosa aufgenommen und zu TG, Phospholipiden und CE resynthetisiert. Das nur in diesen Zellen synthetisierte ApoB-48 wird mit den synthetisierten Lipiden beladen. Durch die Hilfe des microsomal TG-Transferprotein (MTTP) entstehen Chylomikronen, die über Vesikel in die Lymphe sezerniert werden. Von dort aus gelangen die CMs, die viele Triglyzeride und wenig Cholesterin enthalten, über den Duktus thoracicus in die Blutbahn. Hier werden den CM weitere Proteine, wie das ApoE,

Apolipoproteine der Klasse C (ApoCs), ApoA-V und Cholesterylester vom HDL übertragen. In den Kapillaren peripherer Organe, wie den Fettgeweben und der Skelettsowie Herzmuskulatur, werden die in den Chylomikronen enthaltenen Triglyzeride durch das Endothel-ständige Enzym Lipoproteinlipase (Lpl) hydrolysiert. Die Lpl wird über das glycosylphosphatidy-inositol-anchored high density lipoprotein-binding protein1 (GPIHBPI) an die Oberfläche der Endothelzellen gebracht. Neuere Studien zeigen, dass die Lpl an GPIHBPI (Beigneux et al., 2009) (Gin et al., 2008) (Beigneux et al., 2007) und Proteoglykane gebunden am Endothel der Adipozyten und Myozyten lokalisiert ist, wodurch sie an die Chylomikronen binden kann. Die Aktivität der Lpl wird durch viele Faktoren reguliert. Der essentielle Co-Faktor ist dabei das ApoC-II. Ist dieses Apolipoprotein nicht vorhanden findet die Lipolyse durch die Lpl nicht statt. Weitere Faktoren, die Einfluss auf die Lpl haben, sind das ApoA-IV, der lipase maturation factor 1 (LMF1) oder auch die angiopoietin-like proteins (ANGPTL) 3 und 4 (Nilsson et al., 2012). Die freien Fettsäuren werden über Transmembranrezeptoren wie CD-36 in die Adipozyten und Myozyten aufgenommen, wo sie dann wieder verestert werden. Anschließend werden sie entweder im weißen Fettgewebe gespeichert oder für die direkte Energierversorgung der Zelle über die Mitochondrien genutzt. Das braune Fettgewebe wandelt diese Nahrungs-vermittelte Energie in Wärme um (CANNON and NEDERGAARD, 2004).

Die nun instabilen CM geben einige ihrer Oberflächenmoleküle (Phospholipide, ApoCs) an kleine HDL-Partikel ab und der Rest der CMs wird als Chylomikronen-*Remnant* (CR) bezeichnet. Diese *Remnants* binden dann über das noch enthaltene ApoE an Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie. Insbesondere LRP1 ist an der Erkennung und der Endozytose der CR in die Hepatozyten beteiligt. Jüngere Studien konnten zeigen, das auch das braune Fettgewebe in der Lage ist postprandiale Lipoproteine als Partikel aufzunehmen (Bartelt et al., 2011).

Der endogene Transport von Lipiden beschreibt den Weg der VLDL und LDL durch den Organismus. VLDL wird in der Leber synthetisiert und das Strukturprotein dieser und auch der LDL ist das ApoB-100. VLDL besteht aus TG, CE und Cholesterol und trägt ApoE und ApoCs auf der Oberfläche. Nach der Sezernierung der VLDL ins Blut stellt VLDL die Versorgung der peripheren Organe mit Fettsäuren im nüchternen Zustand sicher. Die TG der VLDL werden, wie die der CM, von der Lpl hydrolysiert. Die entstehenden *Remnants* werden als *intermediate density lipoproteins* (IDL) bezeichnet. In den Lebersinusoiden werden die restlichen TG durch die hepatische Triacylglycerinlipase (HL) hydrolysiert. Nach weiterer Prozessierung durch entsprechende Lipid-Transferproteine wie dem Cholesterylestertransferprotein (CETP) und dem Phospholipidtransferprotein (PLTP) entstehen cholesterolreiche LDL-Partikel. Das ApoB-100 vermittelt dann die Bindung der LDL an den LDL-Rezeptor, der in fast allen Zellen des Organismus exprimiert wird. Nach der LDL-Rezeptor-vermittelten Endozytose über CCP gelangt die LDL über Endosomen in die Lysosomen, in denen Proteasen und Lipasen die Partikel verstoffwechseln. Das durch die Hydrolyse von Cholesterylestern freigesetzte Cholesterol wird über Nieman-Pick-TypC Proteine (NPC) 1 und 2 aus den Lysosomen heraustransportiert und gelangt zum endoplasmatischen Retikulum, wo es regulatorische Funktionen übernimmt. So wird zum Beispiel die Expression des LDL-Rezeptors über intrazelluläres Cholesterol reguliert. Der internalisierte LDL-Rezeptor wird meist mittels Recycling Endosomen an die Plasmamembran zurück transportiert.

Der dritte Weg über den Lipide durch den Organismus transportiert werden, wird als reverser Cholesteroltransport (RCT) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um den Rücktransport von Cholesterol aus der Peripherie zur Leber. Makrophagen besitzen sogenannte Scavenger-Rezeptoren (SR-A, SR-B1). Die Expression dieser Rezeptoren ist nicht vom Cholesterolgehalt der Zelle abhängig. Die Makrophagen können ungehindert oxidativ oder chemisch veränderte LDL aufnehmen und dadurch mit Cholesterol werden. Diese Überbeladung führt wiederum zur Einlagerung überladen von Cholesterylestern in zytoplasmatischen Tröpfchen wodurch die Makrophagen sich zu sogenannten Schaumzellen entwickeln. Die pathogene Einwanderung der Monocyten in die Intima der Arterienwand und die Entstehung von Schaumzellen sind der erste Schritt zur Atherosklerose, die oft zu Schlaganfällen oder Herzinfarkten führt. Beim RCT wird das überschüssige Cholesterol aus den Makrophagen und anderen peripheren Cholesterolenthaltenen Zellen über spezielle ATP-bindende-casette-Transportproteine (ABCA1 und ABCG1) auf HDL übertragen. HDL transportiert die Lipide dann zur Leber, wo SR-B1 an der selektiven Cholesterylesteraufnahme in die Leber beteiligt ist. Daneben sorgt das CETP beim Menschen dafür, dass TG von LDL gegen Cholesterylester der HDL getauscht werden. Die Cholestervester gelangen somit über den LDL-Rezeptor zurück in die Leber (von Eckardstein et al., 2001).

## 1.3.3 Der Low Density Lipoprotein (LDL)-Rezeptor

Der LDL-Rezeptor ist das erste entdeckte Mitglied der LDL-R-Familie und damit der Namensgeber. Goldstein und Brown erhielten 1985 den Nobelpreis für die Entdeckung des LDL-Rezeptors und die damit einhergehende Rezeptor-vermittelte Endozytose (Brown and Goldstein, 1986).

Mittlerweile werden sieben Transmembranrezeptoren als Kernproteine dieser Familie betrachtet. Der LDL-R, der VLDL-Rezeptor (VLDL-R), der ApoE2/LRP8, MEGF (*multiple epidermal growth factor-like domain*)7/LRP4, LRP1, LRP1B und Megalin/LRP2 teilen alle den gleichen strukturellen Aufbau (Dieckmann et al., 2010). Sie weisen alle eine oder mehr Liganden-Bindungs-Domänen und mehr oder weniger wiederholte *epidermal growth factor (EGF)-receptor-like cysteine-rich repeats* mit YWTD (Thyrosin-Tryptophan-Threonin-Asparaginsäure)-β-Propeller-Domänen in ihren extrazellulären Ketten auf. Weiterhin besitzen sie alle eine Transmembrandomäne und beinhalten wenigstens ein NPxY-Motiv in ihrer cytoplasmatischen Kette (Abb. 1-3).

Der LDL-R ist ausschließlich für die Internalisierung von ApoB-enthaltenen Lipoproteinen wie dem LDL zuständig. Mutationen im Gen des LDL-R, die die Funktion des Rezeptors beeinträchtigen, führen zur familiären Hypercholesterolämie (FH). Patienten, die unter FH leiden weisen stark erhöhte LDL-Konzentrationen im Plasma auf, die wiederum das Risiko für Atherosklerose und koronare Herzerkrankungen erhöhen. In Fällen, in denen die LDL-R-Funktion komplett fehlt, werden LDL-Konzentrationen von 1000 mg/dl im Blut detektiert; diese Patienten sterben meist schon im Kindesalter an einem Herzinfarkt.

Die Expression des LDL-R wird durch intrazelluläres Cholesterol, das wiederum auf Membran-gebundene Transkriptionsfaktoren, sogenannte *sterol regulation element binding proteins* (SREBPs) wirkt, reguliert. SREBPs gehören zu einer Familie von Proteinen, die eine basische *helix-loop-helix leucine zipper* (bHLH-Zip) Struktur aufweisen (Brown and Goldstein, 1997) und an der Regulation vieler Gene des Lipidstoffwechsels beteiligt sind (Horton et al., 2002). SREBPs werden als Vorläuferproteine synthetisiert und sind an der ER-Membran gebunden. Das *insulin-induced gene* (INSIG), welches auch in der ER-Membran verankert ist, sorgt durch seine Bindung an das SREBP-*cleavage-activating* Protein (SCAP), dafür, dass dieses Protein im ER zurückgehalten wird (Radhakrishnan et al., 2008). SCAP ist ein Escort-Protein und fungiert gleichzeitig als Sterol-Sensor-Protein (Yang et al., 2002). INSIG bindet dabei an die Sterol-Sensor-Domäne des SCAPs. Der Komplex aus SCAP

und INSIG ist somit unter Cholesterol-reichen Bedingungen im ER lokalisiert. Niedrige intrazelluläre Cholesterolkonzentrationen führen hingegen zur Dissoziation des INSIG vom SCAP, welches dann wiederum mit dem COP-II-Transport-Komplex interagiert und SREBP vom ER zu Golgi transportieren kann. Im Golgi prozessieren dann zwei Membran-gebundene Proteasen, *site-1-protease* (S1P) und *site-2-protease* (S2P), SREBP, wodurch ein N-terminales Fragment des SREBP von der Golgimembran freigesetzt wird und zum Zellkern transloziert. Dort aktiviert es dann als Transkriptionsfaktor Gene, die ein *sterol response element* (SRE) beinhalten. Dadurch wird die Expression des LDL-R und die anderer für die Cholesterolhomöostase wichtiger Gene reguliert (Goldstein and Brown, 2009).



#### Abb. 1-3 LDL-Rezeptor Gen-Familie

Die sieben Kern-Mitglieder der LDLR-Familie wie sie in Säugern vorkommen. Sie sind alle durch eine oder mehr Ligandenbindungsdomänen charakterisiert. Sie weisen alle EGF-Homologie-Domänen auf. Diese EGF-Wiederholungen und YWTD-Propeller ( $\beta$ -Propeller) – Domänen sind in die pH-abhängige Ablösung des Liganden vom Rezeptor in Endosomen involviert. Alle Mitglieder bestehen aus einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Domäne, die mindestens ein NPxY-Motiv beinhaltet. Diese Motive sind wichtig für die Endozytose und die Interaktion mit bestimmten Adaptorproteinen, die die Rezeptoren an Signalwege koppeln. Der LDLR, der VLDLR und Apoer2 tragen eine O-verlinkte Zuckerdomäne. Quelle: Dieckmann et al., 2010

Neben diesem Feedback-Mechanismus, der für die regulierte Aufnahme von Cholesterol über den LDL-Rezeptor sorgt, gibt es viele weitere Proteine, die für die Funktion des LDL-R unabdinglich sind. So zum Beispiel PCSK9. Dieses Protein ist eine Konvertase, die als molekulare Schere für die gewebespezifische Degradation des LDL-R zuständig ist. PCSK9 bindet an die EGF-ähnliche *repeat* Domäne der extrazellulären Kette des LDL-R (Rashid et al., 2005) und arbeitet wie ein Chaperon, indem es den lysosomalen Abbau des Rezeptors bewirkt. Studien zeigen, dass die Depletion von PCSK9 in Mäusen zu einer Erhöhung der LDL-R Konzentration führt. (Rashid et al., 2005) (Chan et al., 2009). Die damit einhergehende Senkung der LDL-Cholesterol Konzentration im Blut um fast 50 % verhindert die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen. Verschiedene PCSK9-Inhibitoren werden zur Zeit in klinischen Studien getestet und werden vermutlich demnächst zur Therapie von Hypercholesterolämien eingesetzt (Lee and Hegele, 2013).

## 1.3.3.1 Regulation des LDL-Rezeptors durch das Adaptorprotein ARH

Ein weiteres, für die Funktion des LDL-R wichtiges Protein, ist das Adaptorprotein ARH. Dieses Protein wird der Klasse von PTB-Proteinen zugeordnet. ARH wird ubiquitär exprimiert und vermittelt die für die Endozytose wichtige Interaktion zwischen dem Rezeptor und der Clathrin-Maschinerie (Mishra et al., 2002b). Dabei bindet die PTB-Domäne des ARHs Phosphotyrosin-unabhängig an das NPxY Motiv der intrazellulären Kette des LDL-Rezeptors. Gleichzeitig interagiert ARH über eine spezielle Clathrin Box-Konsensus-Sequenz (LLDLE), welche sich in der carboxyterminalen Region des Proteins befindet, mit der schweren Kette des Clathrin-Triskelions. ARH assoziiert auch mit der  $\alpha$ und  $\beta$ -Untereinheit des Clathrin-Adaptoprotein AP-2 (He et al., 2002; Mishra et al., 2002b). Nach erfolgter Endozytose dissoziiert ARH mit den Clathrin-*Coat*-Proteinen vom Endosom und steht erneut für die Interaktion mit AP-2 an der Plasmamembran zur Verfügung.

Bei Patienten, die an der autosomal rezessiven Form der Hypercholesterolämie leiden, ist die Funktion des ARHs gestört. Eine oder mehrere Mutationen im Gen des Adaptorproteins führen dazu, dass ARH nicht mehr an die intrazelluläre Domäne des LDL-R binden kann. Dadurch kann die Interaktion mit AP-2 nicht vermittelt werden und die Endozytose des LDL-R und seines Liganden, der LDL, findet nicht statt. Betroffene Patienten weisen stark erhöhte LDL-Konzentrationen im Blut auf, die bei Patienten mit frühzeitiger Atherosklerose und koronarer Herzerkrankung assoziiert sind. LRP1 (Beisiegel et al., 1989) ist eines der größten Mitglieder der LDL-R-Familie und bewältigt neben seiner Funktion als endozytierender Rezeptor im Lipoproteinstoffwechsel, viele weitere Aufgaben. LRP1 wird ubiquitär exprimiert. Strukturell weist LRP1 die fünf in 1.3.3 beschriebenen, typischen Domänen der LDL-R-Familie auf. LRP1 besitzt im Gegensatz zum LDL-R vier Ligandenbindungsdomänen, die als Cluster I-IV bezeichnet werden. Bis heute sind über 40 unterschiedliche LRP1-Liganden bekannt (Lillis et al., 2005), wobei die meisten an Cluster II oder IV binden (Springer, 1998) (Willnow et al., 1994b). LRP1 erkennt und bindet Lipoproteine, Proteinasen, Proteinase-Inhibitor-Komplexe, Proteine der extrazellulären Matrix, bakterielle Toxine, Viren und viele weitere Liganden über diese Cluster (Lillis et al., 2008). Die intrazelluläre Domäne von LRP1 enthält zwei NPxY Motive, die für die Interaktion des Rezeptors mit Adaptorproteinen der Endozytosemaschinerie wichtig sind und den Rezeptor an viele Signaltransduktionswege knüpfen. Daneben weist LRP1 weitere Phosphorylierungs-, zwei Di-Leucin (LL)- Motive und ein sich mit dem distalen NPxY-Motiv überlappendes Yxx\$-(Tyrosin-x-x-\$, x=beliebige AS, \$=hydrophobe AS) Motiv auf (Li et al., 2000).

LRP1 wird als ein 600 kDa großes Vorläuferprotein synthetisiert und vom ER-ständigen Rezeptor-assoziiertem Protein (RAP) gebunden. RAP begleitet LRP1 als Chaperon vom ER zum Golgi. Der niedrige pH-Wert im Golgi führen zur Dissoziation des RAP von LRP1 (Willnow et al., 1996) (Bu et al., 1995). Der Rezeptor wird im TGN von Furin proteolytisch gespalten wodurch eine 515 kDa große  $\alpha$ - und eine 85 kDa große  $\beta$ -Kette entstehen, die nicht-kovalent assoziiert sind. Dabei beinhaltet die a-Kette ausschließlich einen großen Teil der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne. Die B-Kette besteht hingegen aus einem kleinen extrazellulären Bereich, der Transmembrandomäne und dem cytoplasmatischen Teil von LRP1 (Herz et al., 1990) (Reekmans et al., 2010). Das "reife" LRP1 wird in perinukleären Kompartimenten lokalisiert und aufgrund von bestimmten extrazellulären Stimuli unter Mithilfe von Adaptorproteinen wie z.B. dem sortin nexin 17 (SNX17) oder anderen an die Membran transportiert (van Kerkhof et al., 2005). In polarisierten Zellen übt LRP1 seine Funktionen in der Endozytose von vielen unterschiedlichen Liganden und als Signaltransduktionsrezeptor an der basolateralen Plasmamembran aus (Donoso et al., 2009) (Marzolo et al., 2003). Neben seiner Rolle im Lipoproteinstoffwechsel bei der Aufnahme von CR, ist LRP1 von großer Bedeutung für

den Metabolismus vieler Plasmaproteine. a2-Macroglobulin (a2M) ist ein Proteinase-Inhibitor, der sich von der Zielproteinase an einer bestimmten "bait" ("Beute")-Region schneiden lässt. Es kommt zu einer Konformationsänderung des so aktivierten  $\alpha 2M^*$ wodurch die Proteinase in einer Art Käfig gefangen gehalten wird. Gleichzeitig präsentiert  $\alpha 2M^*$  eine Rezeptorbindungsdomäne, die spezifisch von LRP1 erkannt wird (Sottrup-Jensen, 1989) (Ashcom et al., 1990) (Moestrup and Gliemann, 1989). Weiterhin ist LRP1 an der Regulation der Plasmalevel des Faktor VIII beteiligt (Bovenschen et al., 2003) (Lenting et al., 2007). Faktor VIII zirkuliert zusammen mit dem von Willebrand Cofaktor. Patienten, die an der Bluterkrankheit Hämophilie A leiden, weisen einen Defizienz des Faktor VIII auf (Fay and Jenkins, 2005). Daneben ist LRP1 an der Aktivierung der Matrixmetalloproteinasen (MMP) 2 und 9 beteiligt, die wiederum bei der Migration von Krebszellen eine Rolle spielen (Song et al., 2009). Es ist bekannt, dass LRP1 mit Dab 1, welches für die Aktivierung der Src-Kinasen wichtig ist, interagieren kann. Fe65 (Trommsdorff et al., 1998), das im Zusammenhang mit der APP-Prozessierung bei Alzheimer gefunden wurde, bindet an LRP1. Weiterhin wurden JNK-interacting Protein 1/2 (JIP1/2), die an der Regulation von mitogen-activated protein (MAP) Kinasen, stress-activated phospho (SAP)-Kinasen beziehungsweise c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) beteiligt sind, als

Adaptorproteine von LRP1 beschrieben. Die Wichtigkeit dieses Rezeptors wird zusätzlich zu seinen vielen unterschiedlichen Funktionen auch dadurch deutlich, dass LRP1-*knockout*-Mäuse schon in der frühen embryonalen Entwicklung sterben (Herz et al., 1992).

## 1.3.4.1 LRP1 Rezeptor-vermittelte Endozytose von Lipoproteinen

LRP1 ist, wie auch der LDL-R an der Endozytose von Lipoproteinen beteiligt. LRP1 wird sehr stark in der Leber exprimiert (Herz, 1988) und ist dort für die Aufnahme von triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) zuständig. Bei der Lpl-vermittelten hydrolytischen Umwandlung von CM zu CR werden die Lipoproteine mit ApoE angereichert (Mahley et al., 1989). CR erreichen nach dem Verlassen der Lebersinusoide den Space of Dissé durch das fenestrierte Endothel. Dort angekommen werden sie durch zuerst Zelloberflächenstrukturen wie den Heparansulfatproteogykanen (HSPGs) an die Hepatozyten gebunden (Havel and Hamilton, 2004). LRP1 ist in den Hepatozyten in perinukleären Kompartimenten lokalisiert. Erst der postprandiale Stimulus durch das anabol-wirkende Hormon Insulin vermittelt die Translokation an die Plasmamembran und ermöglicht die effiziente Aufnahme der Lipoprotein-Partikel (Descamps et al., 1993) (Laatsch et al., 2009). Ist LRP1 an der Plasmamembran lokalisiert, übernimmt der Rezeptor die TRL von den HSPG und bindet diese über das ApoE, das an der Oberfläche der TRL lokalisiert ist. Gleichzeitig vermittelt auch Lpl, die nach der Hydrolyse an den TRL gebunden bleibt, die Bindung an LRP1. Das Clathrinadaptorprotein AP-2 kann direkt über das YxxL-Motiv an die cytoplasmatische Kette des Rezeptors binden. Dadurch wird die direkte Interaktion mit der Clathrinmaschinerie hergestellt und der Rezeptor wird mitsamt Liganden internalisiert. Die TRL-Komponenten werden dann in peripheren Endosomen unterschiedlich sortiert (Heeren et al., 1999), wobei die meisten in den TRL enthaltenen Lipide zu den Lysosomen dirigiert werden. ApoE und auch Cholesterol werden in spezialisierte Recyling-Endosomen sortiert (Heeren et al., 2003) (Swift et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das ApoE zurück an die Plasmamembran transportiert wird und in Assoziation mit HDL gefunden wird (Heeren et al., 2003). LRP1 fördert das HDLstimulierte Recycling von ApoE durch die Sortierung von ApoE in spezialisierte Endosomen (Heeren et al., 2003) (Laatsch et al., 2012). Auch LRP1 wird über spezielle Recycling Endosomen in perinukleären Kompartimenten lokalisiert und für die erneute Endozytose von ApoE enthaltenen TRL bereitgehalten. Die Endozytoseaktivität von LRP1 wird teilweise über den Energiegehalt reguliert, wobei LRP1 im gefasteten Zustand an Serin- und Threoninresten phosphoryliert vorliegt. In Abhängigkeit des Hunger-Signals cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) wird LRP1 durch die aktivierte Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zu einer Veränderung der Bindungsaffinität bestimmter Adaptorproteine des distalen NPxY-Motivs wie dem AP-2 (Ranganathan et al., 2004), was wiederum die Endozytoserate erheblich reduziert (Li et al., 2000).

## 1.3.4.2 LRP1 als Signaltransduktionsrezeptor

Neben seiner Funktion in der Rezeptor-vermittelten Endozytose spielt LRP1 eine große Rolle bei Signaltransduktionsprozessen. Der Rezeptor ist nicht nur dafür zuständig aktive Proteasen aus dem Extrazellulärraum zu entfernen und somit ihren Metabolismus zu regulieren, auch LRP1 selbst wird durch Metalloproteasen an der Zelloerfläche geschnitten. Durch diese Spaltung entsteht ein Rezeptor, der einen extrazellulären Anteil der  $\beta$ -Kette, die Transmembrandomäne und den intrazellulären Teil umfasst. Durch den Einsatz einer  $\gamma$ -Secretase in der Plasmamembran kommt es zur Ablösung der intrazellulären Domäne. Diese Domäne kann wiederum in den Zellkern gelangen, um dort die transkriptionelle Aktivität bestimmter Gene zu modulieren (May et al., 2002). Dieses *Shedding* der  $\alpha$ -Kette von LRP1 hat Einfluß auf die Signalkaskaden von PDGF (*platelet derived growth factor*) oder auch TGF $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$ ) und spielt somit bei der Regulation der Zellproliferation eine wichtige Rolle (Loukinova et al., 2002) (Huang and Huang, 2005).

Im Falle des PDGF-Rezeptors  $\beta$  (PDGFR $\beta$ ) ist die Aktivität des Rezeptors in Abwesenheit höher. Die Stimulation des PDGFRB durch PDGF führt zur von LRP1 Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors, wodurch PDGF-abhängige Signalwege aktiviert werden. Dadurch kommt es zur einer Erhöhung der Proliferation und Migration von vaskulären glatten Muskelzellen (Boucher et al., 2003) (Takayama and Takezawa, 2006). Ist LRP1 an der Plasmamembran vorhanden, bindet PDGF an LRP1 und PDGFRB. Es kommt zur Komplexbildung zwischen LRP1 und PDGFR $\beta$  (Boucher et al., 2002) und die cytoplasmatische Domäne von LRP1 wird am Tyrosin des NPxY-Motivs phosphoryliert. Dadurch wird das Adaptorprotein Shc rekrutiert und aktiviert die Migrations- und Proliferationsignalwege der Zelle. Die Tyrosinphosphorylierung des LRP1 kann durch die gleichzeitige Bindung von ApoE-enthaltenen Lipoproteinen an den Rezeptor verhindert werden. In der nicht phosphorylierten Situation bindet z.B. das Adaptorprotein Dab-2 an das NPxY-Motiv, welches wiederum in Endozytoseprozesse involviert ist. Die Bindung von ApoE an LRP1 kann so zum Schutz vor PDGF-induzierter Migration der glatten Muskelzellen bei der Atherosklerose beitragen (Linton and Fazio, 1999) (Boucher et al., 2007).

Weiterhin wird LRP1 auch in Verbindung mit Morbus Alzheimer gebracht. Dabei ist der Rezeptor an der Bindung des APP und der Prozessierung des APP zu Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) beteiligt (Knauer et al., 1996). Fehlt LRP1 sind die A $\beta$ -Produktion, die APP-Sekretion und die APP-Internalisierung beeinträchtigt (Pietrzik et al., 2002).

## 1.4 Metabolische Erkrankungen

In der westlichen Welt stellt das Überangebot an Nahrung ein großes Problem dar. Die erhöhte Energiezufuhr, die nicht mehr für harte körperliche Arbeit benötigt wird, führt dazu, dass die Bevölkerung immer fettleibiger wird. Die Betroffenen leiden an Übergewicht, das durch einen *Body Mass Index* (BMI), der größer als 25 ist, deutlich wird. Sie entwickeln oft eine Adipositas (BMI > 30) und nicht wenige Patienten weisen eine schwere Adipositas mit einem BMI über 40 auf. Viele metabolische Erkrankungen gehen mit dem erhöhten Gehalt an Körperfett, dabei im Speziellen dem abdominalem Fett, einher. Insulinresistenz und Typ2 Diabetes Mellitus sind u.a. als Folgen des Übergewichts zu sehen (Boden and Shulman, 2002) (Despres, 1993). In der postprandialen Phase, also nach einer Mahlzeit, sekretieren die B-Zellen des Pankreas Insulin. Dieses Hormon zirkuliert schnell durch den Organsimus und stimuliert die Aufnahme der Glukose über den Glukosetransporter4 (Glut4) in z.B. Adipozyten und Muskelzellen. Glut4 ist in intrazellulären Glut4 storage vesicles (GSV) lokalisiert. Durch die Bindung des Insulins an den Insulinrezeptor kommt es zur Aktivierung einer Signalkaskade, die zur Verschmelzung der GSV und somit zur Translokation von Glut4 an die Plasmamembran der Adipozyten führt. Neben Glut4 enthalten diese Vesikel viele weitere Proteine, u.a. auch LRP1. Glukoseaufnahme führt indirekt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors ChREBP (carbohydrate response element binding protein). Dieser Glukose-responsive Transkriptionsfaktor reguliert die Fettsäuresynthese und die Glykolyse (Iizuka et al., 2004). ChREBP wird als sensibler Schlüsselfaktor für die systemische Insulinsensitivität und Glukosehomöostase beschrieben (Herman et al., 2012) (Eissing et al., 2013). Die Aufnahme von Glukose über Glut4 induziert die de novo Lipogenese (DNL) im Fettgewebe, die wiederum mit einer verbesserten Insulinsensitivität verbunden ist (Roberts et al., 2009) (Ranganathan et al., 2006).

Insulinresistente Individuen weisen eine erniedrigte Expression des Glut4 (Shepherd and Kahn, 1999) und eine Herunterregulation einer ChREBP-Isoform, der ChREBPβ (Herman et al., 2012) (Eissing et al., 2013) im Fettgewebe auf. Daneben ist die Übergewichtsinduzierte Insulinresistenz mit einer gestörten Adipokinsekretion, einer erhöhten Fettsäuresekretion und dem Auftreten von proinflammatorischen Zytokinen verbunden (Attie and Scherer, 2009) (Boden, 2008). Insulinresistenz ist einer der Hauptfaktoren, die zu Typ2 Diabetes führen.

Damit einhergehend wird auch die Einlagerung von Lipiden in die Leber beobachtet. Es ist bekannt, dass die hepatische Lipogenese, die stark mit der Synthese von Triglyzeriden assoziiert ist, in übergewichtigen und insulinresistenten Patienten erhöht ist (Eissing et al., 2013) (Donnelly et al., 2005). Dies kann dann, neben weiteren Mechanismen zur Nichtalkoholischen *Fatty Liver Disease* (NAFLD). Die NAFLD ist eng mit einer veränderten Leberfunktion, Hyperlipidämie und der Entstehung von Leberzirrhose verbunden (Mukuddem-Petersen et al., 2005) (Roden, 2006).

## 1.4.1 Bedeutung des endosomalen Transports für metabolische Erkrankungen

Atherosklerose und als Folge dessen Herzinfarkt oder Schlaganfälle gelten als die weltweit häufigste Todesursache (Kurth et al., 2005) (Nordestgaard et al., 2007). Die Leber sorgt normalerweise nach jeder Mahlzeit für eine schnelle und effektive Aufnahme von TRL *remnants* aus dem Plasma. Ist diese Funktion durch Übergewicht, Insulinresistenz oder Typ 2 Diabetes gestört, kommt es zur ständigen Zirkulation dieser Lipoproteine im Blut (Williams, 2008). Diese dauerhaften *Remnants* tragen nicht zu vernachlässigende Mengen an Cholesterol und trotz der Lpl-vermittelten Hydrolyse substantieller Mengen von Triglyzeriden. Die zirkulierenden *Remnants* können chemisch (Acetylierung) oder durch Oxidation modifiziert und von Makrophagen aufgenommen werden. *Remnants* können somit, genau wie LDL, in der Arterienwand einwandern und eingelagert werden (Proctor et al., 2002). So führt die unzureichende Aufnahme von postprandialen Lipoproteinen zur Entwicklung von atherosklerotischen Plaques.

Die fehlerhafte Endozytose von LDL über den LDL-R führt durch Akkumulation von Cholesterol im Plasma zur Hypercholesterolämie. Im Zusammenhang mit der Aufnahme von TRL Re*mnants* über LRP1 in die Hepatozyten wird beschrieben, dass die postprandiale Absenkung des hepatozellulären cAMP-Spiegels die Endozytosaktivität von LRP1 steigert. Dies führt zu einer Steigerung der Aufnahme von TRL in die Leber (Laatsch et al., 2009).

Die hormonell kontrollierte endozytotische Aktivität der hepatischen Lipoprotein-Rezeptoren, LDL-R und LRP1, regulieren somit die Konzentration atherogener Lipoproteine im Plasma. Die Regulation der Endozytose wird maßgeblich durch Adaptorproteine kontrolliert, wobei die Rolle von Adaptoren für die Funktion von LRP1 weitestgehend unklar ist.

## 2. Fragestellung

Übergewicht und die damit assoziierten Stoffwechselveränderungen sind ursächlich an der Entstehung von Typ 2 Diabetes mellitus und der Entwicklung kardiovaskulärer Komplikationen wie Atherosklerose beteiligt. Neben einen Mangel an körperlicher Bewegung spielt die heutige energieüberladene Ernährung eine wesentliche Rolle für die übermäßige Speicherung von Energie und verursacht damit die pathophysiologisch bedeutsame Vergrößerung des Fettgewebes. Nach der Nahrungsaufnahme werden die energiereichen Triglyzeride in den Dünndarmzellen zu postprandialen Lipoproteinen, den Chylomikronen, assembliert und gelangen anschließend über die Lymphe in die Blutzirkulation. In der postprandialen Phase werden die Trigyzeride der Chylomikronen mittels Endothel-ständiger Lipoproteinlipase hydrolysiert und in periphere Energiespeichernde bzw. verbrauchende Gewebe wie Fett- und Muskelgewebe aufgenommen. Nach der Lipolyse verbleiben so genannte Lipoprotein-Remnants im Blutkreislauf, die durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Leber aufgenommen werden. Dabei spielen Lipoprotein-Rezeptoren, wie der LDL-Rezeptor und das LDL-Rezeptor-related Protein 1 (LRP1) eine wichtige Rolle. LRP1 ist paradoxerweise im Ruhezustand nicht an der Plasmamembran, sondern in perinukleären Kompartimenten lokalisiert. Insulin, welches in der postprandialen Phase von der Bauchspeicheldrüse sezerniert wird, ist in der Lage die Translokation von LRP1 aus intrazellulären Kompartimenten an die Plasmamembran zu vermitteln. Bei der Untersuchung der zellulären und molekularen Mechanismen zur Funktion von LRP1, rückte das Adaptorprotein Phosphotyrosin interacting domain containing 1 (PID1), in den Vordergrund. Zu Beginn des Promotionsvorhabens war bekannt, dass PID1 spezifisch an das distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 bindet und dass der Verlust von PID1 in vitro zu einer veränderten LRP1-Lokalisation führt.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Relevanz der PID1-LRP1-Interaktion auf molekularer Ebene analysiert und die subzelluläre Lokalisation von LRP1 in Hepatoma-Zellen und primären Hepatozyten definiert werden. Weiterhin sollte die Rolle von PID1 in Bezug auf die Insulin-vermittelte LRP1-Translokation und die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Lipoproteinen untersucht werden. Da eine gestörte Funktion von LRP1 zu erhöhten Plasmalipiden und folglich zu Atherosklerose führen kann, sollte außerdem die
pathophysiologische Bedeutung von PID1 für die LRP1-vermittelte Aufnahme von Lipoprotein-Remnants in vivo studiert werden. Zu diesem Zweck sollte zunächst eine transgene Maus etabliert werden, bei der durch genetische Manipulation die funktionelle PID1-Expression inaktiviert ist. In diesen genetisch-modifizierten Mäusen sollte mit Hochfettdiät-Fütterungsstudien ermittelt werden, ob die PID1-Defizeinz einen Einfluss auf die Entstehung von Übergewichts-induzierten Stoffwechselveränderungen hat. Dabei sollten im Besonderen metabolische Parameter des Lipid- und Glukosestoffwechsels untersucht werden, die mit den vielfältigen Funktionen von LRP1 im Zusammenhang stehen könnten.

# 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

<sup>125</sup>Iod <sup>14</sup>C-Triolein <sup>3</sup>H-Deoxyglukose Agarose Borsäure BSA (bovine serum albumin) Calziumchlorid Chloroform DiD Dimethylsulfoxid (DMSO) EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure Ethanol 96% Ethonol 70 % Glukose Glycin Kalimchlorid Kaliumbromid Kaliumdihydrogenphosphat Ketamin Kollagen Kollagenase I Kupfersulfatpentahydrat Laktat Magnesiumchlorid+6H2O Methanol Milchpulver Natriumcarbonat Natriumchlorid (Nacl) Natriumdihydrogenphosphat Natriumhydrogencarbonat Natriumhydroxid Natriumiodid Natriumkaliumtartrat

Perkin-Elmer, USA Perkin-Elmer, USA Perkin-Elmer, USA Invitrogen, USA Merck, Darmstadt Serva, Heidelberg Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Molecular Probes, USA Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt selbst verdünnt aus 96 % Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, München Albrecht, Aulendorf Serva, Heidelberg Worthingen Biochemical Corporation, USA Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt J.T.Baker, Niederlande Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München

Natriumpyruvat Proteinase K Puromycin Rompun Saccharose Salzsäure (37 %) Saponin SDS, Natriumdodecylsulfat Trichloressigsäure Tris Triton X-100 Tween20 Wasserstoffperoxid

#### 3.1.2 Gebrauchsmaterial

6-/12-/24-Well-Zellkultur-Platten Coverslips, Glas Filterpapiere Hyperfilm ECL Detektion Kanülen Kollagen-beschichtete 12-/24-Well Platten Kryoröhrchen Maxisorp-Immuno Moduls Mikrotiterstreifen Mikrotiterplatten (96-Well-Format) Nitrocellulose Transfer-Membran NuPage Probenpuffer (4xSB) NuPage Proteingele (4 -12 % Bis-Tris-Gel) NuPage Reducing buffer Objektträger, superfrost Parafilm **PCR-Tubes** PD10-Säule Pipetten Pipettenspitzen Polyallomer-Röhrchen Protein Marker, RPN800E Reaktionsgefäß 15 ml Spritzen Stabpipetten Ultrazentrifugationsrörchen Verschließbare Reaktionsgefäße Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup>

Sigma-Aldrich, München Invitrogen, USA Sigma-Aldrich, München Bayer, Lverkusen Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, München Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, München Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München

Nunc<sup>™</sup>, VWR, Darmstadt MENZEL Gläser, Braunschweig Whatman GmbH, Dassel GE Healthcare, München Braun, Melsungen Nunc<sup>™</sup>, VWR, Darmstadt Sarstedt, Nümbrecht Nunc<sup>™</sup>, VWR, Darmstadt Nunc<sup>™</sup>, VWR, Darmstadt Whatman GmbH, Dassel Invitrogen, by life technologies, USA Novex by life technologies, USA Invitrogen by life technologies, USA MENZEL Gläser, Braunschweig Brand GmbH, Wertheim Sarstedt, Nümbrecht GE Healthcare, München Greiner, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht Beckmann, Counter, Krefeld GE Healthcare, München BD Falcon, Heidelberg Braun, Melsungen Sarstedt, Nümbrecht Beckmann Counter, Krefeld Eppendorf, Hamburg Nunc<sup>™</sup>, VWR, Darmstadt

Zellschaber	Tissue Culture Laboratory
Zellsieb 70 μm	BD Falcon, Heidelberg
Zentrifugationsrörchen	Beckmann Counter, Krefeld
β-Counter-Szintillations-Röhrchen	Perkin Elmer, Waltham, USA

#### 3.1.3 Arbeitsgeräte

ABI Prism, 7900 HT Sequence Detection System Absaugpumpe AccuCheck Aviva Messgerät+Teststreifen Ätka FPLC-Apparatur  $\beta$ -Szintillationscounter CASY Cell Counte, Model TT CO2-Inkubator für Zellkultur Douncer Elektrophoresekammer Filmentwickler Freezing Container γ-Counter Horizontalschüttler Lichtmikroskop Magnetrührer Mikrotitelplatten Reader und Software Mikrowelle Nanodrop Nikon A1 Laser Scanning Mikroskop Operationsbesteck Peristaltikpumpe pH-Meter Pipettierhilfe Spannungsquelle SDS-PAGE sterile Werkbank Stickstoff-Einfriertank Superose-6-Säule (FPLC) Thermocycler Thermomixer Tischzentrifuge Tissue Lyser Transferkasette Westernblot Ultrazentrifuge Videodokumetationsgerät für Agarosegel Vortexer Waage

Applied Biosystems Inc., USA SMT Roche, Mannheim GE Healthcare, München Perkin Elmer, Waltham, USA Schärfe System, Reutlingen Binder, Tuttlingen B. Braun, Melsungen Bio-Rad, München Konica Minolta, Deutschland NALGENE<sup>TM</sup>Cryo, USA Perkin-Elmer, USA Heidolph, Schwabach Zeiss, Aalen IKA, Labortechnik, Staufingen i. Br. GE Healthcare, München Sharp, Japan Peqlab, Erlangen Nikon, Japan Aesculap, Braun, Melsungen Gilson, Frankreich Mettler, Toledo, Schwerzenbach, Schweiz AccuJet, Brand, Wertheim Bio-RAD, München Hera Safe, Thermo Scientific, USA Cryotherm, Euteneuen Pharmacia LKB, Cambridge, UK Biometra Göttingen Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg QIAGEN, Hilden Bio-RAD, München Beckmann Counter, Krefeld Intas, Göttingen Heidolph, Schwabach Sartorius, Göttingen

Wasserbad Westernblotapparatur Zentrifuge oben Zeiss LSM710, Laser Scanning Mikroskop

#### 3.1.4 Kits und Reagenzien

Anti/Anti Blocking Buffer I BSA-Lösung (Proteinstandard) Cholesterol-Bestimmungs Kit DAPI-Lösung DMEM DNA Ladder ECL-Lösungen A und B ELISA Adiponektin ELISA Ultra Sensive Rat Insulin FCS (fötales Kälberserum) Folin's Reagenz **FuGENE** Heparin High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Insulin Zellkultur Insuman Rapid Human Rapid Kollagenlösung I Lipofectamin2000 Mastermix TaqMan Natriumchlorid 0,9 % NucleoSpin RNA II Opti-MEM TM Paraformaldehyde-Lösung (20 %) PBS Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml) Percoll Ponceau S ProLong® GoldAntifade Reagent Proteaseinhibitorcocktail Tabletten Proteinmarker (RPN800E) siRNA (esiRNA) PID1/ EGFP siRNA Vps29 Solvable™ Szintillationsflüssigkeit Triglyzerid-Bestimmungs Kit

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel Bio-Rad, München Hettich, Mühlheim a.d. Ruhr Zeiss, Aalen

GIBCO/BRL, Eggenstein AppiChem, Darmstadt PAA Laboratories, Pasching Roche, Mannheim Sigma-Aldrich, München GIBCO/BRL, Eggenstein Thermo Scientific, USA GE Healthcare, München R&D Systems. Abingdon, UK CRYSTAL CHEM INC GIBCO/BRL, Eggenstein Merck, Darmstadt Promega, USA Braun, Melsungen Applied Biosystems Sigma-Aldrich, München Sanofi-Aventis, Deutschland Sigma-Aldrich, München Invitrogen by life technologies, USA Eurogentec, Deutschland Braun, Melsungen Macherey und Nagel, Düren GIBCO/BRL, Eggenstein Electrom Microscopy Science, USA GIBCO/BRL, Eggenstein GIBCO/BRL, Eggenstein Sigma-Aldrich, München SERVA, Heidelberg Molecular Probes, USA Roche, Mannheim GE Healthcare, München Signma-Aldrich, München Prof. David Owen Perkin Elmer, Waltham, USA Perkin Elmer, Waltham, USA Roche, Mannheim

TRIzol Trypsin/EDTA Universal PCR MasterMix

#### 3.1.5 Konstrukte

PID1-RFP LRP1-eGFP

#### 3.1.6 TaqMan Sonden

<u>Gen</u>	<u>Assay</u>
mApoe	Mm00437573_m1
mCHREBPβ	AIVI4CH
mG6pc	Mm00839363_m1
mIns1	Mm01259683_g1
mInsr	Mm00439693_m1
mLdlr	Mm00440169_m1
mLpl	Mm00434764_m1
mLrp1	Mm00464608_m1
mPck1	Mm01247058_m1
mPid1	Mm01545237_m1
mSlc2a4 = mGlut4	Mm01245502_m1

#### 3.1.7 Medien, Puffer und Lösungen

#### Kulturmedium

DMEM+GlutaMax<sup>™</sup>, 4,5 g/l Glukose 10 % FCS 1 % P/S (HuH7-Zellen) bzw. 2 %Anti-Anti (primäre Hepatozyten)

#### Narkose-Lösung

2,3 ml Rompun (2%) 1 ml Ketanest (10 mg/ml) 6,7 ml NaCl (0,9 %)

#### <u>10 x PBS</u>

400 g NaCl 10 g KCl 10 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O ad 51H<sub>2</sub>Odest., pH 6,9 Invitrogen by life technologies, USA GIBCO/BRL, Eggenstein Applied Biosystems Inc., USA

in der AG Heeren etabliert in der AG Heeren etabliert

#### Hungermedium

DMEM+GlutaMax<sup>™</sup>, 1 g/l Glukose 0,1 % BSA 1 %P/S bzw 2 % Anti-Anti (primäre Hepatozyten)

#### <u>10 x TBS</u>

121g Tris 400 g NaCl ad 5 l, pH 7,6

#### **Einfriermedium**

80 % FCS 20 % DMSO

#### 10 x Perfusionspuffer

81,1 g/l NaCl 3,73 g/l KCl 1,63 g/l MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 2,85 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,543 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sterilfiltrieren, pH 7,4

#### PGS (Immunfluoreszenz)

0,5 g Glycin 0,05 g Saponin ad 100 ml PBS

#### Lysispuffer

50 mM Tris-HCl pH 7,5 50 mM NaCl 1% Triton X-100 1 x Mini Complete Proteaseinhibitor (PIC) in PBS

#### Homogenisierungspuffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,4 2 mM MgCl<sub>2</sub> 0,25 M Saccharose ad 500 ml H<sub>2</sub>O dest

## Lowry-Lösung A

2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,02% Natriumkaliumtartrat in 0,1 M NaOH

#### Transferpuffer

56,2 g Glycin 12,1 g Tris 1 l Methanol ad 4 l H<sub>2</sub>O dest.

#### Blockierpuffer1 (WB) 1 x 1 x TBS

0,1 % Tween20

#### <u>1 x Perfusionspuffer</u>

100 ml 10 x Perfusionspuffer 2,1 g/l NaHCO<sub>3</sub> 0,745 g/l EDTA 2,970 g/l Glukose 0,846 g/l Laktat 0,022 g/l Pyruvat sterilfiltrieren, anwärmen auf 37°C

# Blockierpuffer (Immunfluoreszenz)

PGS 2 % BSA

### PFA-Lösung

4 % PFA (Stocklösung 20 %) in PBS

#### Resuspensionspuffer

50mM Tris-HCl, pH 8,8 2 mM CaCl<sub>2</sub> 80 mM NaCl 1% Triton X-100 ad 10 ml

#### Lowry-Lösung B

0,5% CuSO<sub>4</sub> Pentahydrat 5% SDS in  $H_2O$  dest

#### <u>TBST</u>

1 x TBS 0,1 % Tween-20

Blockierpuffer 2 (WB) 1 xTBS 0,1 %Tween20 10~% Milchpulver

#### Dichtelösung $\rho = 1,033 \text{ g/ml}(\text{A})$

KBr in 0,9 %w/w NaCl 10 mM Tris/HCl pH 8,6

#### <u>10 x FPLC-Puffer</u>

100 mM Tris/HCl pH 8 1,5 M NaCl 100 mM EDTA in H<sub>2</sub>Odest.

#### Waschpuffer Adiponektin

0,05 % Tween20 in PBS

#### STE-Puffer

100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 10mM EDTA 1 % SDS

#### 5 x TBE-Puffer

54 g Tris 27,5 g Borsäure 3,7 g EDTA ad 11 H2O dest

#### 3.1.8 Antikörper

### Primäre Antikörper

α-Tubulin β-Aktin EEA1 GM130 LAMP1 LDL-R LRP1 MPR PID1 SNX1 SNX27 5 % BSA

<u>Dichtelösung ρ = 1,006 g/ml (B)</u> KBr in 0,9 % w/w NaCl 10mM Tris/HCl pH8,6

#### 1 x FPLC-Puffer

100 ml 10 x FPLC-Puffer ad  $11 \text{ H}_2\text{Odest.}$ sterilfiltrieren

#### Blockierlösung Adiponektin

1 %BSA in PBS

#### 1 x TBE-Puffer

100 ml 5 x TBE-Puffer $900 \text{ ml} \text{H}_2\text{O}$ 

#### Verdünnunug

IF 1:500 WB 1:20000 IF 1:250 IF 1:300 IF 1:300 WB 1:1000 WB 1:20000, IF 1:400 If 1:300 WB 1:200, IF 1:100 IF 1:250 IF 1:200

#### <u>Herkunft</u>

BD, Pharmingen BD, Pharmingen Abcam, Cambridge, UK Abcam, Cambridge, UK BD, Pharmingen Epitomics, Österreich Epitomics, Österreich Santa Cruz, USA Sigma-Aldrich, München Santa Cruz, USA

Vps35	IF 1:500	Santa Cruz, USA	
Sekundäre Antikörper	<u>Verdünnunug</u>	<u>Herkunft</u>	
Esel a Mouse Alexa Fluor 555	IF 1:1000	Jackson Immuno Research, UK	
Esel a Mouse Alexa Fluor 647	IF 1:1000	Jackson Immuno Research, UK	
Esel a Mouse Cy3	IF 1:500	Jackson Immuno Research, UK	
Ziege a Kanninchen HRP	WB 1:5000	Jackson Immuno Research, UK	
Ziege a Mouse Alexa Fluor 488	IF 1:1000	Jackson Immuno Research ,UK	
Ziege a Mouse HRP	WB 1:5000	Jackson Immuno Research, UK	
3.1.9 Software			

#### Software

Microsoft Office Standard Edition 2010 Nikon NIS-Elements Confocal A1 Software Zeiss Confocal Software

Microsoft, Redmond, USA Nikon, Japan Zeiss, Aalen

#### 3.2 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1 Kultivierung von Zelllinien

In allen Experimenten in dieser Arbeit in denen Zelllinien untersucht wurden, wurde die humane Hepatoma-Zelllinie HuH7 verwendet. Dabei wurden zum einen Wildtyp-HuH7-Zellen und zum anderen PID1 knockdown (kd)-HuH7-Zellen verwendet. Die PID1 kd-HuH7 wurden vor Beginn meiner Arbeit in der AG Heeren etabliert. Damals wurde der stabile Knockdown von PID1 durch eine lentivirale shRNA-Transfektion hergestellt (siehe Doktorarbeit Britta Hoffzimmer). Dem Kulturmedium der PID1kd-HuH7-Zellen wurde Puromycin zur Selektion der Zellen hinzugefügt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Bei einer Konfluenz von etwa 90 % wurden die Zellen passagiert. Dafür wurden zunächst das Kulturmedium entfernt, die Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend für 5 min bei 37°C mit 3 ml 0,05% (w/v) Trypsin/EDTA inkubiert, wodurch die Zellen sich langsam von der Kulturflasche ablösten. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 3 ml des vorgewärmten Kulturmediums gestoppt. Die Zellen wurden vom Kulturflaschenboden abgespült, in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Falcon) überführt und für 3 Minuten bei 900 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in Nährmedium aufgenommen, durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in der gewünschten Dichte ausgesät.

#### 3.2.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen auf 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 90% kultiviert. Die Zellen wurden wie in 3.2.1 beschrieben von den Flaschen gelöst und sedimentiert. Im Anschluss wurden die Zellen einer Kulturflasche in je 1 ml Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und in einem *Freezing Container* bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen aus dem Stickstoff-Container entnommen, es wurde 1 ml des vorgewärmten Kulturmediums zu den eingefrorenen Zellen gegeben und diese somit zügig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen bei 900 rpm für 3 Minuten sedimentiert, der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 10 ml frischem, vorgewärmten Nährmedium aufgenommen. Durch Auf- und Abpipettieren wurde eine gleichmäßige Zellsuspension hergestellt, die dann auf 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät wurde.

#### 3.2.3 Isolierung von primären Hepatozyten aus Mauslebern

Die Generierung von primären Hepatozyten aus Mauslebern erfolgte nach einem Protokoll von Meredith (Meredith, 1988). Zur Isolation wurden Mäuse verwendet, die zwischen acht und 13 Wochen alt waren. Zunächst wurden die Mäuse mittels intraperitonealer Injektion einer Narkose-Lösung betäubt. Im Anschluss wurde der mit 70% Ethanol desinfizierte Bauchbereich der Maus geöffnet und das Gedärm zur Seite geschoben, so dass die Leber und die Pfortader gut zu erreichen waren. Die Leber wurde über die Pfortader mit einer Sauerstoff-gesättigten, EDTA-haltigen Perfusionslösung für etwa eine Stunde perfundiert. Dabei ist es wichtig, dass die Lösung mit einer Geschwindigkeit von 7-8 ml pro Minute durch die Leber fließt. Im Anschluss an die Perfusion wurde die Leber entnommen und in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Von diesem Zeitpunkt an wurden alle Arbeiten unter der sterilen Werkbank durchgeführt. Die Leber wurde in insgesamt 25 ml Kulturmedium aufgenommen. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Zellen aus der Leber "herausgeschüttelt" und die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) hindurch in ein 50 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden anschließend für 4 Minuten bei 28 g (langsame Beschleunigung und Bremsung) mittels Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und die pelletierten Zellen in 8 ml vorg

ewärmtes Nährmedium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde dann mit 13,9 ml Percoll-Dichtegradienten-Lösung und 2,1 ml 10 x Perfusionspuffer versetzt. Für die Durchmischung wurde das Reaktionsgefäß vorsichtig 2-3 Mal invertiert. Anschließend erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt für 6 min bei 855 g in derselben Zentrifuge wie im ersten Schritt. Im Anschluss an diesen Schritt befand sich oben auf dem Gradienten ein schwimmender Zellkuchen, der nicht-parenchymale und tote Zellen enthält und zusammen mit der Gradientenlösung verworfen wurde. Die parenchymalen Zellen lagen im Pellet vor. Dieses wurde in 10 ml Nährmedium aufgenommen und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Zellen wurden dann in der für das jeweilige Experiment gewünschten Dichte auf entsprechenden Kollagen-beschichteten Zellkulturplatten oder Coverslips (für die Immunfluoreszenz-Analysen) ausgesät. Eine Stunde nach dem Aussetzen wurde das Medium gewechselt. Die Hepatozyten konnten vier Stunden nach dem Aussäen für Experimente verwendet werden.

#### 3.2.4 Kollagen-Beschichtung von Coverslips

Für die Kultivierung von primären Hepatozyten ist es wichtig, dass ihnen Kollagenbeschichtete Kulturplatten angeboten werden. Für Experimente, in denen die Hepatozyten auf 6-, 12- oder 24-Well-Platten kultiviert wurden, wurden kommerzielle erwerbliche Kollagen-beschichtete Platten verwendet. Sollten die Zellen auf Glas-Coverslips für die spätere Betrachtung mittels konfokaler Mikroskopie ausgesät werden, wurden sterile Ø13 mm Coverslips in 24-Well-Platten gelegt und mit einer Kollagen-Lösung beschichtet. Diese Arbeiten wurden unter der sterilen Werkbank durchgeführt. Anschließend wurden die Platten mit den Coverslips bei 37°C für mindestens 30 min inkubiert. Der Überschuss an Kollagen-Lösung wurde mittels Vakuumpumpe abgesaugt und die Coverslips unter der Sterilbank für etwa 1 h im UV-Licht sterilisiert und gleichzeitig getrocknet.

#### 3.2.5 Transiente Transfektion von primären Hepatozyten

Um die Expression des Adaptorproteins PID1 in primären Hepatozyten herunter zu regulieren, wurde eine Transfektion mit siRNA durchgeführt. Dafür wurden primäre Hepatozyten auf 4 x10<sup>5</sup> Zellen je 6-Well ausgesät, 1 Stunde nach der Aussaat wurde das Nährmedium gewechselt, so dass die Zellen anschließend in 1 ml vorlagen. Für die Transfektion, die 4 h nach dem Aussetzen der Zellen durchgeführt wurde, wurde zunächst

ein Komplex aus Lipofectamin2000 und esiRNA hergestellt. Dafür wurden pro 6 Well (1 ml DMEM) 2 µl der entsprechenden esiRNA (PID1 oder EGFP als Kontrolle) in 100 µl Opti-MEM<sup>TM</sup> und 4 µl Lipofectamin2000 in 100 µl Opti-MEM<sup>TM</sup> verdünnt und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Anschließend wurden beide Verdünnungen in einem Reaktionsgefäß vereint, vorsichtig gemixt und für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden 200 µl des esiRNA-Lipofectamin2000-Komplexes zu den Zellen pipettiert. Die Kulturplatte wurde vorsichtig hin-und hergeschwenkt und die Zellen wurden bei 37° und 5 %CO<sub>2</sub> für 24 bzw. 36 Stunden kultiviert.

#### 3.2.6 Transiente Transfektion von HuH7-Zellen

Um Fluoreszenz-markierte Proteine in die humanen Hepatomazellen HuH7 zu bringen, wurden diese transient transfiziert. Dafür wurden die Zellen zunächst in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  pro Coverslip ausgesät und 6 h später mit PID1-RFP und LRP1-eGFP transfiziert. Die Transfektion wurde mittels Fugene6 durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein Komplex aus Fugene6 und der gewünschten DNA bzw. Vps29-siRNA hergestellt. Dafür wurden pro 24 Well (500 µl DMEM) 0,5 µg der entsprechenden DNA (PID1-RFP oder LRP1-eGFP) bzw. Vps29-siRNA in 20 µl Opti-MEM<sup>TM</sup> und 0,9 µl Fugene6 in 20 µl Opti-MEM<sup>TM</sup> verdünnt und für 5 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden beide Verdünnungen in einem Reaktionsgefäß vereint, vorsichtig gemixt und für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden 40 µl des DNA-Fugene6-Komplexes zu den Zellen pipettiert. Die Kulturplatte mit den Coverslips wurde vorsichtig hin-und hergeschwenkt und die Zellen wurden bei 37° und 5 %CO<sub>2</sub> für 36 Stunden kultiviert.

#### 3.2.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Diese Methode wurde dazu genutzt, die Lokalisation bestimmter Proteine in Zellen zu visualisieren. Dabei wurden die Zellen zunächst auf Glas-Coverslips in einer Dichte von 7x10<sup>4</sup> -1,5x10<sup>5</sup> Zellen pro Coverslip ausgesetzt. Die Dichte richtete sich danach, welche Zellen verwendet wurden. Primäre Hepatozyten sind größer als HuH7-Zellen, somit wurden sie in einer geringeren Zellzahl ausgesät als die HuH7-Zellen.

Die Zellen auf den Coversplips wurden zunächst zwei Mal kurz mit PBS gewaschen und anschließend fixiert. Für die Fixierung wurde entweder eine Paraformaldehyd (PFA)-Lösung oder Methanol genutzt. Bei der PFA-Fixierung wurden die Zellen für mindestens 25 min mit PFA bei RT inkubiert und anschließend 5 x für 5 min mit PBS gewaschen. Bei der Methanol-Fixierung wurde eiskaltes Methanol auf die Zellen gegeben, diese für 5 min bei -20°C inkubiert und 2 x für 5 min mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung wurden die Zellen 5 min lang mit PGS permeabilisiert und anschließend für 20 min mit einem Blockierpuffer (entweder mit dem selbst hergestellten oder dem kommerziellen *Blocking Buffer* I inkubiert. Die darauf folgende Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte im jeweils verwendeten Blockierpuffer für 1 h bei 37°C. Die Zellen wurden danach zwei Mal kurz mit PBS, dann 2 x für 10 min mit PGS gewaschen und anschließend für 45 min bei 37°C mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser wurde ebenfalls im jeweiligen Blockierpuffer verdünnt. Die Färbung der Zellkerne mittels DAPI geschah im gleichen Inkubationsschritt. Die DAPI-Lösung wurde in einer 1:1000 Verdünnung in die Lösung des sekundären Antikörpers gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen mindestens 5 x für 5 min mit PBS gewaschen und mittels ProLong GoldAntifade auf Objekträgern luftdicht eingedeckelt. Das Trocknen erfolgte über Nacht bei RT. Alle verwendeten Antikörper sind in Abschnitt 3.1.8 aufgelistet.

#### 3.2.8 Stimulation der Zellen mit Insulin

Für diese Untersuchung wurden zunächst primäre Hepatozyten aus Wildtyp, und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen generiert (Abschnitt 3.2.3), und in einer Dichte von 1 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml auf Coverslips ausgesät. 12 Stunden später wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und für 10 min mit 100 nM Insulin in Kulturmedium inkubiert. Direkt danach wurde das Medium zügig entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für die darauf folgende indirekte Immunfluoreszenz (Abschnitt 3.2.7) mit PFA fixiert.

#### 3.2.9 Endozytose und Degradation von <sup>125</sup>I-markierten TRL

Um die Aufnahme und die Degradation von Lipoproteinen in Zellen zu untersuchen, wurden zunächst primäre Hepatozyten aus Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, isoliert und in einer Dichte von 2 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml auf 12-Well-Platten ausgesetzt. <sup>125</sup>I-markierte triglyzeridreiche Lipoproteine wurden vorher wie in Abschnitt 3.3.12 hergestellt und in Hungermedium entsprechend verdünnt. 12 Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit Hunger-Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den <sup>125</sup>I-markierten TRL bei

37°C in einem CO2-Inkubator für 1 (nur Aufnahme) bzw. 4 Stunden (Aufnahme und Degradation). Nach der Inkubation wurden die Zellen zunächst 2 x für 5 min mit eiskaltem PBS-Heparin (10 U/ml), dann 1 x für 5 min mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden 250 ml Collagenase (10 mg/ml in PBS) und 250  $\mu$ l Trypsin/EDTA in jedes Well gegeben und die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Aufund Abpipettieren von der Platte gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 3000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und die Zentrifugation (5 min, 3.000 rpm) wiederholt. Daraufhin wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 500  $\mu$ l 0,1 M NaOH lysiert. Je 400  $\mu$ l der Lysate wurden anschließend in ein spezielles Counter-Röhrchen überführt und die Radioaktivität mittels  $\gamma$ -Szintillationscounter gemessen.

Um die Degradation der <sup>125</sup>I-markierten TRL in den Hepatozyten zu untersuchen, wurde das Kulturmedium (etwa 500 μl) der für 4 Stunden mit <sup>125</sup>I-TRL inkubierten Zellen abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 125 μl eiskalter TCA versetzt, gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, nicht degradierte <sup>125</sup>I-TRL zu präzipitieren. Daraufhin wurden die Proben für 5 min bei 8.000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand, der noch freies <sup>125</sup>Iodid und <sup>125</sup>I-Tyrosin enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das bereits 5 μl Natriumiodid enthielt. Nach dem Mischen wurden 30 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugegeben, um die <sup>125</sup>Iodid-Ionen zu <sup>125</sup>Iod zu oxidieren. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei RT inkubiert, dann mit 1 ml Chloroform versetzt, gevortext und für 5 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Chloroform extrahiert dabei freies <sup>125</sup>Iod in die Chloroform-Schicht. Im Anschluss wurden 250 μl der oberen, wässrigen Phase, die hauptsächlich <sup>125</sup>I-Monoiodo-Tyrosin, das Abbauprodukt der <sup>125</sup>I-TRL, enthält, in ein Counter-Röhrchen überführt und die Radioaktivität mittels γ-*Counter* bestimmt.

#### 3.2.10 Endozytose von DiD-markierten TRL in primäre Hepatozyten

Für dieses Experiment wurden DiD-markierte TRL, wie in Abschnitt 3.3.8 beschrieben, hergestellt. Primäre Hepatozyten wurden aus Mäusen generiert (Abschnitt 3.2.3) und in einer Dichte von 1 x  $10^5$  Zellen/ml auf Coverslips ausgesät. 12 Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen mit PBS gewaschen, zunächst für eine Stunde mit Hungermedium (siehe 3.2.9) und anschließend mit DiD-markierten TRL in Hungermedium für eine Stunde bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Medium entfernt, die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und für die darauf folgende indirekte Immunfluoreszenz (Abschnitt 3.2.7) mit PFA fixiert. Wichtig hierbei ist, die Zellen lichtgeschützt weiter zu verarbeiten. Analysiert wurde die Aufnahme mittels konfokaler Mikroskopie.

#### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung von Proteinhomogenaten aus Zellen

Die konfluenten Zellen wurden auf Eis gestellt und 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 500 µl PBS mit einem Zellschaber von der Platte abgeschabt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppi) überführt und für 10 min bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen für 30 min in Zelllysispuffer inkubiert. Dabei ergab sich das Volumen des Lysispuffers (100-250 µl) aus der Größe des Pellets. Im Anschluss wurden die Zellen für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die gelösten Proteine enthielt, wurde für die anschließende Proteinbestimmung nach Lowry verwendet.

#### 3.3.2 Membranprotein Präparation aus Gewebe

Dafür werden mindestens 200 mg des zu untersuchenden Gewebes benötigt und es ist wichtig immer auf Eis zu arbeiten. Das Gewebe wurde zunächst im Ultra Turrax in 6 Homogenisierungspuffers 200 mg Gewebe Volumeneinheiten des (für 1,2 ml) homogenisiert. Der Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) wurde frisch in einer Verdünnung von 1:1000 zum Homogenat hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zentrifugation wiederholt. Im Pellet befindet sich jeweils nicht gelöstes Protein, welches verworfen wurde. Im Anschluss wurde der Überstand in spezielle Ultrazentrifugations-Gefäße (dickwandige Röhrchen) überführt und für 1 h bei 100.000 g und 4°C zentrifugiert (Beckmann TL100, 100.2 Rotor). Nach der Zentrifugation befinden sich lösliche cytosolische Proteine im Überstand und Membranproteine im Pellet. Die cytosolische Fraktion wurde bei -20°C eingefroren.

Das Pellet wurde vollständig mit einer 2"G Kanüle in 0,2 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Auch hier wurde PIC wieder frisch in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugegeben. Die resuspendierten Membranproteine wurden dann für 30 min bei 100.000 g und 4°C zentrifugiert (Beckmann TL100, 100.2 Rotor). Nach diesem zweiten Zentrifugationsschritt befinden sich Proteine der Plasmamembran, Golgi- und ER-Membranen und endosomaler Membranen im Überstand. Das Pellet enthält die Kernmembranen und die Mitochondrien. Die Proben wurden anschließend entweder bei - 20°C eingefroren oder direkt für die Proteinbestimmung nach Lowry weiter verwendet.

**<u>PIC</u>**: eine Tablette des MiniComplete Protease Inhibitor Cocktails wurde in 10 ml PBS gelöst und den Puffern jeweils direkt vor dem Gebrauch (frisch) in einer Verdünnung von 1:1000 zugefügt.

#### 3.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die Methode nach Lowry durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die Lösung A und die Lösung B in einem Verhältnis 50:1 gemischt. Dabei werden für jede zu bestimmende Probe 500 µl dieser Mischlösung benötigt. Jeweils 10 µl der Proben und des Protein-Standards (BSA-Lösung) wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit jeweils 40 µl NaOH (0,1 M) versetzt. Dazu wurden je 500 µl der Mischlösung aus Lösung A und B gegeben, leicht gemixt und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl Folin-Reagenz hinzugegeben, gut gemixt und für 20-30 min im Dunkeln inkubiert. Die Extinkion wurde in einem Mikrotiterplatten-*Reader* bei 760 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden dann mittels Standardreihe berechnet.

#### 3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dabei werden die Proteine anhand ihrer Größe voneinander getrennt (Laemmli, 1979). Für diese Methode wurden die Proben zunächst mit 4 x Probenpuffer (NuPAGE, Invitrogen) und gegebenenfalls mit einem Reduzierungspuffer (NuPAGE, Invitrogen) versetzt, mit 1 x Probenpuffer auf das gleiche Volumen aufgefüllt und für 10 min bei 80°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde ein Gradienten-Gel (NuPage 4-12% Bis-Tris Gel) in eine Gelkammer gespannt und diese wurde mit 500 ml 1 x Laufpuffer (NuPage MES SDS *Running Buffer*) befüllt. Der kommerziell erworbene Puffer ist 20-fach konzentriert und wurde vor dem Gebrauch mit H<sub>2</sub>O dest. zu einem einfachen Puffer verdünnt. Danach wurden jeweils gleiche Proteinmengen der Probe in die Taschen des Gels pipettiert, wobei in die erste Tasche 5 µl eines Proteinmarkers (RPN800E, GE Healthcare) gegeben wurde. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 170 V für 100 min.

#### 3.3.5 Western-Blot-Analyse

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden durch die Western-Blot-Methode in einem elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, um die Proteine anschließend mittels Antikörper-Detektionsnachweisen zu untersuchen. Dafür wurden zunächst eine Nitrocellulosemembran, zwei Schwämme und vier Whatman-Filterpapiere in Transferpuffer eingelegt. Anschließend wurden das Gel aus der SDS-PAGE und die Nitrocellulosemembran luftblasenfrei zwischen zwei Filterpapiere auf der einen und zwei auf der anderen Seite und jeweils einem Schwamm auf jeder Seite in einer Transferkassette zu einem sogenannten Sandwich zusammengebaut. Die Transferkassette wurde so in die Transferkammer überführt, dass die Nitrocellulosemembran zwischen dem Gel und der Anode der Kammer liegt. So konnten die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld vom Gel auf die Membran wandern. Zur gleichmäßigen Kühlung wurde eine Kühlschleife mit in die Transferkassette gehängt. Die Kammer wurde vollständig mit Transferpuffer befüllt und der Transfer der Proteine erfolgte bei entweder 400 mA für zwei Stunden oder bei 200 mM über Nacht. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurden die Proteine auf der Membran mit dem sauren Azofarbstoff Ponceau S angefärbt. Dieser bindet reversibel an Proteine. Dafür wurde die Nitrocellulosemembran für 2-5 min mit Ponceau S Lösung inkubiert und anschließend mit H2Odest. gespült, bis die proteinfreien Bereiche der Membran vollständig entfärbt und die Proteinbanden sichtbar waren. Der Farbstoff wurde durch erneutes Waschen mit TBST auf dem Taumler von den Proteinbanden entfernt.

#### 3.3.6 Immunochemischer Proteinnachweis auf der Nitrocellulosemembran

Der Nachweis der Proteine auf der Nitrocellulosemembran erfolgte mittels Antikörperinkubation und anschließender Detektion chemilumineszierender Signale der Proteinbanden mittels *Amersham* Hyperfilm. Alle Inkubations- und Waschschritte dieser Methode erfolgten unter ständiger Bewegung auf einem Schüttler. Dafür wurde die Membran nach der Ponceau S- Färbung für 5 min mit TBST gewaschen und daraufhin für 30 min mit Blockierpuffer inkubiert. Die genaue Zusammensetzung dieses Puffers wurde durch die zu detektierenden Proteine bestimmt, weshalb zwei unterschiedliche Puffer verwendet wurden, um unspezifische Antigenbindungstellen zu sättigen. Die anschließende Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper erfolgte im Blockierpuffer bei 4°C über Nacht oder für 1 h bei RT. Im Anschluss an die Antikörperinkubation wurde die Membran 3 x für 15 min bei RT mit TBST gewaschen und für 45 min bei RT mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper in Blockierpuffer inkubiert. Darauf folgten wieder drei Waschschritte à 15 min mit TBST. Die verwendeten Antikörper sind in Kapitel 3.1.8 aufgelistet.

Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels ECL (*enhanced chemiluminescence*). Dafür wurden die ECL-Lösung A mit der ECL-Lösung B im Verhältnis 1:1 gemischt und für 3 min auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Nach der Inkubation wurde die Membran 1 x kurz mit PBS gewaschen und in eine Detektionskammer überführt. Bei dieser Methode setzt die HRP, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, Luminol aus der ECL-Lösung um, wodurch Chemilumineszenz entsteht. In der Dunkelkammer wurde ein Film auf die Membran gelegt, der nach der Belichtung mittels Entwicklermaschine entwickelt und fixiert wird.

#### 3.3.7 Isolierung von Lipoproteinen aus dem Blut

Die Isolierung von triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) erfolgte aus dem Blut von murinen und humanen Spendern. Bei der Aufreinigung von murinen TRL wurde das Plasma von sechs LDL-R<sup>-/-</sup>/hepatischen LRP1<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen durch Punktion des Herzens und anschließender Zentrifugation des Blutes, gewonnen. Lipoproteine lassen sich entsprechend ihrer Dichte über Dichtegradienten und Ultrazentrifugation auftrennen. Dafür wurde das gewonnene Plasma zunächst mit KBr auf eine Dichte von 1,21 g/ml in einem Volumen von 3,5 ml eingestellt. Für die Schichtung des Gradienten wurden Polyallomer-Röhrchen (Beckman) mit einem Volumen von ca. 11,5 ml verwendet, die für den SW41 Ultrazentrifuge passend Rotor, Beckman waren. Bei der Gradientenherstellung wurde zunächst 1 ml der  $\rho$ =1,006 g/ml Lösung in das Röhrchen gegeben. Anschließend wurden erst 3,5 ml der  $\rho = 1,019$  g/ml Lösung, dann 3,5 ml der  $\rho = 1,063$  g/ml Lösung und zuletzt mit 3,5 ml des  $\rho = 1,021$  g/ml Plasmas unter Zuhilfenahme einer langen Kanüle unterschichtet. Unter Verwendung der zwei

Dichtelösungen A und B im entsprechenden Mischungsverhältnis wurden die anderen Dichtelösungen hergestellt.

Die Proben wurden anschließend für 20 Stunden bei 38.000 rpm und 4°C im SW41 Rotor in einer Beckman Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnten die TRL, die aufgrund ihrer geringen Dichte oben auf dem Gradienten schwammen vorsichtig mit einer umgebogenen Kanüle abgenommen werden. Die TLR- enthaltene Lösung wurde im Anschluss mittels PD10-Säule nach Angaben des Herstellers in PBS umgepuffert.

Für die Isolierung von TRL aus humanem Plasma wurden dem Spender, nachdem er ein fetthaltiges Frühstück zu sich genommen hatte, etwa 120 ml Blut entnommen und das Plasma durch anschließende Zentrifugation gewonnen. Die TRL (Dichte  $\rho \leq 1.006 \text{ mg/ml}$ ) wurden durch 45 min Zentrifugation bei 28.000 rpm und 4°C in einem *swing-out* Rotor (SW41 Beckman) isoliert. Für die weitere Aufreinigung wurden die TRL vom Plasma herunter pipettiert und im Verhältnis 6:1 mit 60 % Succrose versetzt. Diese TRL-Succrose-Mischung wurde unter PBS geschichtet und erneut wie zuvor zentrifugiert.

#### 3.3.8 Markierung der TRL mit DiD

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahme-Experimente wurden die murinen TRL (Kapitel 3.3.7) zur späteren Visualisierung mit DiD markiert. Dazu wurde den isolierten TRL eine DiD-Lösung (10 mg/ml DMSO) im Verhältnis 10:1 zugegeben. Die TRL wurden für mindestens 3 Stunden oder auch über Nacht bei 30°C und 300 rpm im Thermomixer mit DiD inkubiert. Danach wurde die Lösung über eine PD10-Säule gegeben, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die eluierten DiD-markierten TRL konnten dann für Aufnahme-Experimente in Zellen verwendet werden.

#### 3.3.9 Cholesterol und Triglyzerid-Bestimmung im Plasma

Für die Bestimmung wurde den Mäusen nach einer vierstündigen Fastenzeit Blut abgenommen und das Plasma mittels Zentrifugation gewonnen. Die Cholesterol- und Triglyzerid-Konzentrationen im Plasma der Mäuse wurden mit kommerziellen Kits (Roche) bestimmt. Dafür wurden die Proben in verschiedenen Verdünnungen und ansteigende Konzentrationen eines Lipid-Standards (Precipath) auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Je verdünnter Probe wurden 5 µl eingesetzt, die mit 95 µl PBS aufgefüllt und mit 200 µl des Cholesterol- bzw. Triglyzerid-Reagenz versetzt wurden. Von den StandardVerdünnungen wurden jeweils 100 µl mit den 200 µl des entsprechenden Reagenz inkubiert. Die Reagenzien führen zu einer Hydrolyse der in den Plasmaproben vorhandenen Cholesterylester und Triglyzeride, wobei nach Oxidationsreaktionen ein rötlicher Farbstoff entsteht. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion im Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen und die jeweilige Konzentration unter Verwendung der Standardreihe berechnet.

#### 3.3.10 Fast Performance liquid chromatography (FPLC)

Um die Cholesterol- und Triglyzeridkonzentrationen in den unterschiedlichen Lipoproteinen zu bestimmen wurde ein Lipoproteinprofil mittels FPLC erstellt. Dafür wurden zunächst 150 µl der jeweiligen Plasmaprobe mit 150µl 1 x FPLC-Puffer versetzt. Von dieser Lösung wurden 200 µl in den Probenloop der FPLC injiziert und das Programm für die Fraktionierung in 96-Well–Platten gestartet. Für die Auftrennung der unterschiedlich großen Lipoproteine wurde eine S6-FPLC-Säule verwendet. Im Anschluss an die Fraktionierung wurden die Triglyzerid- sowie die Cholesterol-Konzentration der aufgetrennten Fraktionen, wie in Abschnitt 3.3.9 beschrieben, bestimmt.

#### 3.3.11 ELISA zur Bestimmung von Hormonen im Plasma

Der ELISA (*Enzyme-linked immunosobent assay*) wird genutzt, um die Konzentration von Proteinen mittels spezifischer Antikörper zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurden ein ELISA spezifisch für Insulin und einer spezifisch für Adiponektin durchgeführt. Für den Insulin-ELISA wurde das *Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit* (Crystal Chem) verwendet. Bei diesem kommerziell erwerblichen Kit war der *Capture*-Antikörper schon auf der Mikrotiterplatte immobilisiert und war somit gebrauchsfertig. Für die Detektion von Adiponektin wurde das *DuoSet*®*ELISA monse Adiponectin Acrp30* (R&D) verwendet. Dabei wurde der Capture-Antikörper 1:180 in PBS verdünnt und über Nacht auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte immobilisiert. Am nächsten Tag wurde die Platte 3 x mit Waschpuffer (siehe Kit) gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurden unspezifische Bindestellen mit 1 % Blockierlösung für eine 1,5 h bei RT blockiert. Nach dem Blockieren wurde die Lösung abgenommen und die Platte wurde erneut 3 x mit Waschpuffer gewaschen. Für den Insulin-ELISA wurden auch alle Lösungen und Puffer als *ready-to-use* aus dem Kit verwendet. Anschließend wurden die Proben und der jeweilige Standard in geeigneter Verdünnung in die Platte gegeben und für 2 h bei RT (Adiponektin) bzw. 4°C (Insulin) inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Platten je 3 x mit dem entsprechendem Waschpuffer gewaschen und mit einem weiteren spezifischen Biotingebundenen Detektionsantikörper bei RT für 2 h (Adiponektin) bzw. 30 min (Insulin) inkubiert. Nach einem nächsten Waschschritt wurden die Platten mit Merrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem Streptavidin (entsprechende Lösung aus dem Kit für Insulin) für 20 min (Adiponektin) bzw. 30 min (Insulin) lichtgeschützt inkubiert. Streptavidin bindet während der Inkubation an Biotin. Es folgte ein weiterer Waschschritt, woraufhin die Proben dann mit einer Substratlösung für etwa 20 min inkubiert wurden. Hierbei kommt es zu einer Reaktion zwischen der HRP und dem Substrat, welche als Farbumschlag gemessen werden konnte. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit einer 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde der Farbumschlag photometrisch bei 450 nm im Mikrotiterplatten-Reader bestimmt. Die Konzentration der Hormone wurde mittels Standardreihe berechnet.

#### 3.3.12 <sup>125</sup>I-Iodierung von isolierten TRL

Zur Quantifizierung der aufgenommenen Lipoproteine in Zellen wurden die Apolipoproteine der isolierten TRL radioaktiv mit <sup>125</sup>-Iod markiert. Dabei wurden die Proteine der TRL wie von McFarlane beschrieben, markiert (McFarlane, 1958). In dem Zusammenhang beschreiben Heeren et al., dass bei der Markierung von Lipoproteinen mit <sup>125</sup>Iod hauptsächlich das ApoE sowie ApoC's und nur wenig ApoB der TRL durch die verwendete Methode iodiert werden (Heeren et al., 2002). Iodiert werden bei der Methode die Tyrosinreste der Proteine.

#### 3.3.13 Radioaktive Markierung von Glukose und Lipiden

Für die Aufnahmeexperimente von Glukose und Lipiden in die Organe der Mäuse wurde den Mäusen eine Mischlösung aus <sup>3</sup>H-Deoxyglukose und <sup>14</sup>C-Triolein verabreicht. Für die Herstellung wurden zunächst triglyzeridreiche Lipoproteine aus dem Plasma eines ApoC-II-defizienten Spenders wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben, isoliert. Anschließend wurde der Triglyzeridgehalt in der Probe, wie in Kapitel 3.3.9 beschrieben, bestimmt und die Probe wurde auf eine Triglyzerid-Konzentration von 5 mg/ml eingestellt. Dafür wurde eine Mischlösung aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 8/5 (w/w) verwendet. Die verdünnte Probe wurde kräftig mittels Vortexer gemischt und daraufhin für 10 min bei 13.000 rpm zentrifuguiert. Im Pellet befanden sich dann die Proteine des Plasmas, die so vom Überstand, der Lösung in denen die TRL enthalten sind, getrennt wurden. In einem letzten Schritt dieser so genannten Delipidierung wurde die Lösung über Nacht "abgepustet". Das bedeutet, die Lösung wurde so lange mit Stickstoff begast, bis sie trocken und somit das Chloroform/Methanol-Gemisch entfernt war. Am nächsten Tag wurde 3 x 2 ml der TRL-Lösung (5 mg/ml) mit je 1 ml Chloroform und 150 µl <sup>14</sup>C-Triolein (0,0037 MBq; Perkin Elmer) versetzt und erneut "abgepustet" bis das Chloroform entfernt war. Daraufhin wurde je 2 ml 60°C warmes PBS hinzugegeben und jede Probe mit Ultraschall sonifiziert. Dabei wurde jede Probe 3 x für 3 min 20 sec sonifiziert, zwischen denen jeweils eine Pause von 1 min lag. Im Anschluss daran wurde die Lösung aus TRL und <sup>14</sup>C-Triolein warm filtriert (0,45 μm). Die Lösung wies eine Konzentration von 10 mg Lipid/ml auf. Das von dieser Lösung einzusetzende Volumen wurde so auf das Körpergewicht der Maus berechnet, dass jedem Tier 50 µg TRL/g Körpergewicht gavagiert wurden.

Für die <sup>3</sup>H-Deoxyglukose wurden zunächst 10 g Glukose in 11 ml NaCl gelöst. 2 ml dieser nun 0,90909 g/ml konzentrierten Glukoselösung wurden anschließend mit 300 μl <sup>3</sup>H-Deoxyglukose (0,037 MBq; Perkin Elmer) gemischt. Letztendlich wurde eine <sup>3</sup>H-Deoxyglukose-Lösung mit einer Konzentration von 0,79 g/ml Glukose erhalten. Diese wurde so eingesetzt, dass jeder Maus 2 mg Glukose/g Körpergewicht gavagiert wurden.

Bei der Gavage wurden die entsprechenden Volumina der <sup>14</sup>C-Triolein und <sup>3</sup>H-Deoxyglukose als Mischlösung in einem Gesamtvolumen von 300 µl (ad NaCL) gavagiert.

#### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 Generierung einer PID1-Knockout-Maus

Für die Generierung der PID1-Knockout-Maus wurde das Knockout-first-Modell der Firma KOMP Respiratory genutzt. Dafür wurden embryonale Stamm(ES)-zellen bei der KOMP Respiratory gekauft, die dann am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) von Frau Irm Hermans-Borgmeyer in Mäuse, die als Leihmutter dienten, transferiert wurden, woraus chimäre Nachkommen entstanden. Die Nachkommen wurden dann mit C57BL/6-Wildtyp-Mäusen gekreuzt und es wurden heterozygote Mäuse erhalten. Durch Verpaarung dieser Heterozygoten wurden so homozygote PID1-Knockout-Mäuse

gerneriert. Bei diesem *Knockont-first*-Modell wurden die ES-Zellen so kloniert, dass sie im Gen des PID1 eines "Kassette" tragen (Abb. 3-1).



Abb. 3-1 Knockout-first-Selektionskassette zur Generierung einer PID1-Knockout-Maus Selektionskassette zur Generierung einer PID1-Knockout-Maus über die von KOMP Respiratory generierten ES-Zellen. Die Kassette wurde zwischen das zweite und dritte Exon des PID1-Gen kloniert und beinhaltet FRT- und loxP-Sites für Flipper-Deleter- und Cre-Rekombinase. Außerdem trät die Kassette eine lacZ und eine Neomycin-Resistenz zur Selektion. Verändert nach <u>http://www.mousephenotype.org</u>

Dieses Konstrukt wurde zwischen das zweite und dritte Exon des PID1-Gens kloniert und trägt das lacZ-Gen, welches für die β-Galaktosidase kodiert. Weiterhin beinhaltet die Kasette eine Neomycin (neo)-Resistenz, die zur Selektion dient. Daneben sind FRT- und loxP-Sequenzen in der Kassette vorhanden. Die Rekombinasen Flippase (Flp) und Cre binden an diese spezifischen Sequenzen und schneiden den dazwischen liegenden Bereich des Gens entsprechend heraus. Das Besondere des Knockout-first-Modells ist, dass das Produkt des Gens der Mäuse, die diese Kassette tragen nicht funktional ist, bevor die Mäuse mit entsprechenden Rekombinase-exprimierenden Mäusen verpaart werden. Beim alternativen Splicen verhindert der Splicing-Akzeptor der Kassette die Entstehung einer funktionalen mRNA. Somit tragen diese Mäuse bereits den Knockout. Die Verpaarung mit Mäusen, die eine Cre- bzw. Flp-Rekombinase exprimieren, sorgt dann im Weiteren dafür, dass diese Enzyme das Gen des PID1 vollständig herausschneiden. Der Vorteil dabei ist, dass das von loxP-Sequenzen flankierte Protein mittels gewebespezifischer Cre-Rekombinasen, nur in einem Organ ausgeschaltet werden kann. Da der totale Knockout vieler Proteine letal ist, ist es von Vorteil, den Einfluss des Proteins somit gewebespezifisch zu untersuchen.

#### 3.4.2 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

Die Isolierung der RNA erfolgte entweder aus kultivierten primären Hepatozyten, die auf 6-Well-Kulturplatten vorlagen oder aus Mausgewebe. Die Zellen wurden für die Isolation 1 x mit PBS gewaschen, für 5 min mit 1 ml TRIzol-Reagenz bei RT inkubiert, anschließend von der Platte heruntergespült und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Für die Isolation der RNA aus Gewebe wurde diesem 1 ml TRIzol hinzugefügt und es wurde mittels TissueLyser (3 x für 30 sec und 20 Hz) homogenisiert. Die in TRIzol vorliegenden Zellen bzw. das Gewebe wurde anschließend mit 200 μl Chloroform (1/5 vol) versetzt, für 15 sec mitels Vortexer gut gemischt und 15 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das Gemisch trennte sich in drei Phasen, eine untere milchige TRIzol-haltige, in der die DNA vorlag, eine sehr dünne, weiße Protein-haltige Zwischenphase und eine obere klare Phase, in der sich die RNA befand. Diese klare Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen (~600 µl) an 96 % Ethanol p.A. versetzt, um die RNA zu fällen. Im Anschluss daran wurde die RNA mittels RNA Purification Kit isoliert, es wurden somit alle vom Hersteller gelieferten Puffer vewendet. Hierbei wurde die in Ethanol vorliegende RNA auf eine Säule gegeben, 2 min bei 12.000 rpm und RT zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die RNA lag anschließend an die Säule gebunden vor. Es wurden 350 µl des MDB (membrane desalting buffer) aus dem Kit auf die Säule gegeben, 2 min bei 12.000 rpm und RT zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurden 1 µl rDNAse mit 90 µl DNase-Puffer versetzt, 95 µl des Gemischs auf die Säule gegeben und für 15-30 min bei RT inkubiert. Es folgten 3 Waschritte: 1. 200 µl des Waschpuffers RA2 zur Inaktivierung der DNase; 2. 600 µl Waschpuffer RA3; 3. 250 µl Waschpuffer RA3. Zwischen den Waschritten wurde jeweils für 2 min bei 12.000 rpm und RT zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach dem letzten Schritt wurde ein zusätzlicher Zentrifugationschritt durchgeführt, um sämtliche Pufferrückstände von der Säule zu entfernen. Zum Eluieren wurden 40 µl RNase-freies H2O auf die Säule gegeben, die RNA mindestens 5 min darin inkubiert und dann mittels Zentrifugation (5 min, 12.000 rpm, RT) in ein RNase-freies Reaktionsgefäß eluiert. Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop bei 260/280 nm bestimmt.

#### 3.4.3 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese wurde mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* für RTqPCR nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 1 µg RNA eingesetzt und in 50 µl des Reaktionsvolumes zu cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente ausschließlich als Matrize für die quantitative *Realtime*-PCR.

#### 3.4.4 Quantitative *Realtime*-PCR (qPCR)

Die quantitative Realtime-PCR (qPCR) ermöglicht es, die Menge einer bestimmten cDNA, zu quantifizieren. Dabei kann die Produktentwicklung über den gesamten Verlauf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) detektiert und anschließend quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurden ein 7900HT Detektionssystem (Applied Biosystems) genutzt und alle qPCRs mittels TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay, bei dem die Messung über Fluoreszenzsignale der TaqMan<sup>®</sup>-Sonden erfolgt, durchgeführt. Diese speziellen Sonden sind an eine Reporterfluorophor (3'-Ende) und einen Quencher (5'-Ende) geknüpft. Da sie sich räumlich sehr nahe sind unterdrückt der Quenscher das Signal des Fluorophors. Wird die Sonde durch die endonukleolytische Aktivität der Taq-DNA-Polymerase hydrolysiert, kommt es zu einer räumlichen Trennung von Quencher und Fluorophor, wobei das Signal des Fluorophors nach einer Anregung fluorometrisch gemessen werden kann. Steigt die Konzentration des Amplifikats mit steigender Zykluszahl, wird auch das Fluoreszenzsignal proportional stärker. Das Signal des Fluorophors ist in den ersten PCR-Zyklen nur sehr schwach und nicht vom Hintergrundsignal abzugrenzen. Für die Auswertung wird der Schwellenwert, C<sub>T</sub> (cycle of treshold)-Wert, genutzt. Der C<sub>T</sub>-Wert liegt in der exponentiellen Phase der Amplifikation und entspricht dem PCR-Zyklus, bei dem sich das Fluoreszenzsignal der Probe vom Hintergrund abhebt. Die Berechnung der Genexpression erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C}$  -Methode ((Livak and Schmittgen, 2001)) und unter Verwendung des Referenzgens Tbp (TATAbox binding protein, murine Gene).

Der PCR-Ansatz für eine Probe:	15 µl	Universal Mix
	8,5 µl	DNase-freies H <sub>2</sub> O
	5 µl	template cDNA (100 ng)
	1,5 µl	TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assay

#### 3.4.5 Genotypisierung von PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen

Für die Genotypisierung der PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden die Tiere zunächst in der Tierhaltung des UKEs biopsiert, anschließend wurde die DNA isoliert. Dafür wurde die Schwanzbiopsie in ein Reaktionsgefäß gegeben, mit 700 μl STE-Puffer und 12,5 μl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 70 μl 10 % SDS hinzugegeben, die Probe wurde invertiert und für 2-5 min ruhen gelassen. Anschließend wurden 275 μl 5 M NaCl hinzugegeben und 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. 500  $\mu$ l des Überstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1000  $\mu$ l 70 % ig Ethanol versetzt und für 30 min mit 14.000 rpm bei 4°C zentrifugiert, um die DNA zu fällen. Das Pellet wurde bei 30-45°C getrocknet und anschließend in 50-70  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (ad inject.) resuspendiert. Die gelöste DNA wurde dann für die PCR genutzt oder zunächst bei -20°C aufbewahrt.

Für die PCR wurde 5  $\mu$ l der DNA mit 10,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 2,5  $\mu$ l PCR-Puffer GREEN (10x), 2,5  $\mu$ l DMSO, 1  $\mu$ l MgCl (25 mM), 1  $\mu$ l dNTP (10 mM) und je 1  $\mu$ l des forward (10  $\mu$ M) und reverse (10  $\mu$ M) Primers versetzt. Hinzu kamen 0,5  $\mu$ l der Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l). Anschließend erfolgte die Amplifikation im *Thermocycler* nach folgendem Programm:

1.	95°С	2 min		
2.	95°C	30 sec	٦	
3.	60°C	30 sec	}	35 x
4.	72°C	2 min	J	
5.	72°C	7 min		
6	4°C	gehalten		

Die Primer wurden so gewählt, dass sich nach der Amplifikation, für den jeweiligen Genotyp, spezifisch große DNA-Produkte ergeben, die dann mittels Agarose-Gelelekrophorese aufgetrennt wurden.

#### 3.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Um die mittels Genotypisierung amplifizierten DNA-Produkte in einem Gel zu analysieren, wurde zunächst ein Agarosegel gegossen. Dafür wurden 2 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer durch Erhitzen in einer Mikrowelle aufgelöst, die Lösung wurde mit 4  $\mu$ l  $\mu$ l des DNA-Farbstoff Roti-Safe (Roth) versetzt, und in eine entsprechende Elektrophorese-Kammer gegossen. In die noch flüssige Agarose wurde ein "Kamm" gehängt, der dafür da war, die Taschen, in die die Proben hinein pipettiert wurden, zu formen. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel mit der DNA-Leiter und den Proben beladen. Die Elektrophorese erfolge bei 90 V und 50°min. Im Anschluss wurden die DNA-Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und fotographiert.

#### 3.5 Metabolische Untersuchungen in der Maus

#### 3.5.1 Hochfettdiät Studie

Für die Untersuchung der Auswirkungen einer Hochfettdiät auf den Metabolismus der Mäuse wurden Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse im Alter von fünf Wochen für insgesamt 20 Wochen mit einer Hochfettdiät (HFD) gefüttert. Eine weitere Gruppe von Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>- Mäusen wurde für den gleichen Zeitraum mit einem Kontrollfutter (Chow) gefüttert. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in einem 12 h Hell-/ Dunkelrythmus gehalten. Als HFD wurde die *High fat Diet with 35,5 % lard, 10 mm* (Ssniff, #3282) verwendet. Die Mäuse und ihr Futter wurden einmal wöchentlich gewogen, um die Gewichtszunahme und die Menge der Futteraufnahme zu dokumentieren. Nach dem wöchentlichen Wiegen wurden die Käfige gereinigt und das Futter gegen frisches ausgetauscht.

#### 3.5.2 Oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT)

Für den oralen Glukose-Toleranz-Test (OGTT) wurden die Mäuse zunächst für 4 Stunden durch Wegnahme des Futters gefastet und ihr Körpergewicht für die Berechnung der einzusetzenden Glukosemenge bestimmt. Zu Beginn des Experiments wurde die Glukosekonzentration im Blut der Mäuse mittels AccuCheck-Aviva-Teststreifen gemessen. Dieser Wert diente als Nullwert für die späteren Berechnungen. Anschließend wurde den Mäusen die Glukoselösung (2 g/kg Körpergewicht in 200 µl 0,9 % NaCl) unter Zuhilfenahme einer Schlundsonde als Gavage verabreicht. Die Blut-Glukosekonzentration wurde 15, 30, 60 und 120 min nach der Gavage bestimmt. Nach dem Test erhielten die Tiere ihr Futter zurück.

#### 3.5.3 Insulin-Toleranz-Test (ITT)

Für den Insulin-Toleranz-Test (ITT) wurden die Mäuse auch zunächst für 4 Stunden gefastet und ihr Körpergewicht für die Berechnung der einzusetzenden Insulinmenge bestimmt. Zu Beginn des Experiments wurde die Glukosekonzentration im Blut der Mäuse mittels AccuCheck-Aviva-Teststreifen gemessen. Dieser Wert dient als Nullwert für die späteren Berechnungen. Anschließend wurde den Mäusen 1 U/kg Körpergewicht Insulin (Insuman Rapid) in NaCl intraperitoneal injiziert und die Blut-Glukosekonzentration

wurde 15, 30, 60 und 120 min nach der Injektion gemessen. Nach dem Test erhielten die Tiere ihr Futter zurück.

#### 3.5.4 Organ-Aufnahme von Glukose und Lipiden

Um die Aufnahme von Glukose und Lipiden in die Organe von PID1<sup>-/-</sup>-und Wildtyp-Mäusen genauer zu untersuchen, wurden Chow- bzw. Hochfettdiät-gefütterte Mäuse genutzt. Im Alter von 25 Wochen wurden diese männlichen Mäuse zunächst für 4 h gefastet, anschließend wurde ihnen eine Mischlösung aus <sup>3</sup>H-Deoxyglukose und <sup>14</sup>C-Triolein, die in Kapitel 3.3.13 hergestellt und berechnet wurde, mittels Schlundsonde verabreicht. Die Blut-Glukosekonzentration wurde vor und 15, 30, 60 und 120 min nach der Gavage mittels AccuCheck Aviva Teststreifen gemessen. 2 h nach der Gavage wurden die Tiere mittels Ketamin/Rompun-Narkose betäubt und das Blut wurde durch Herzpunktion entfernt. Dann wurde das rechte Atrium geöffnet und der Körper der Maus über den linken Ventrikel mit 10 ml PBS-Heparin-Lösung (10 U/ml) perfundiert. Die Organe wurden entfernt und ihr Gewicht wurde bestimmt. Bevor die Organe in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden, wurden jeweils etwa 150 mg des Organs separiert und für die Radioaktivitätsbestimmung verwendet.

Damit die in das entsprechende Organ aufgenommene Radioaktivität gemessen werden konnte, musste das Gewebe zunächst vorbereitet werden. Dafür wurden die etwa 150 mg der Organe in Reaktionsgefäße überführt, im 10-fachen Volumen *Solvable* aufgenommen und über Nacht bei 60°C bei 250 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 400 μl jeder Probe in spezielle Szintillationsröhrchen überführt, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität wurde mittels β-Szintillationscounter gemessen.

#### 3.6 Sonstige Methoden

#### 3.6.1 Gewinnung von Plasma

Zur Gewinnung des Plasmas aus Vollblut wurde das Blut mit einer Kanüle entnommen. In diese Kanüle wurden vor der Blutentnahme 5 µl EDTA (0,5 M, pH 8) gegeben, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Nach der Entnahme wurde das Blut in ein eiskaltes Reaktionsgefäß überführt und direkt für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss konnte das Plasma von den zellulären Bestandteilen des Blutes getrennt in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für Lipid- und Hormonbestimmungen verwendet werden.

#### 3.6.2 Tierhaltung

Die in dieser Arbeit verwendeten PID1<sup>-/-</sup> und Wildtypmäuse wurden in der Versuchstierhaltung (VTH) des Universitätsklinkums Hamburg-Eppendorf unter standardisierten Bedingungen in einem 12 h Hell-/ Dunkelrythmus gehalten. Die Mäuse wurden in der VTH für die Genotypisierungen (Abschnitt 3.4.5) biopsiert. Tiertötungen erfolgten über eine Ketamin-/Rompun-Narkose und einer anschließenden zervikalen Dislokation.

# 4. Ergebnisse

# 4.1 Interaktion von LRP1 und PID1 in primären Hepatozyten und Hepatomazellen

Als ein Rezeptor, der an der Endozytose und der Signaltransduktion beteiligt ist, spielt LRP1 eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von Zellen. So ist LRP1 speziell in der Leber maßgeblich an der Aufnahme von triglyzeridreichen Lipoproteinen in Hepatozyten beteiligt. Nach der Bindung des Liganden werden Rezeptor und Ligand gemeinsam internalisiert. Dieser erste Schritt der Endozytose findet an der Plasmamembran statt. Im Folgenden werden Rezeptor und Ligand über die einzelnen Komponenten des endosomalen Weges weitergeleitet und entweder dem lysosomalen Abbau zugeführt oder über spezielle Recycling-Endosomen wieder zurück an die Plasmamembran geführt.

Damit die vielen unterschiedlichen Aufgaben, die LRP1 in einer einzigen Zelle übernimmt, gewährleistet sind, muss die Lokalisation und Funktion von LRP1 streng reguliert werden. Diese Regulation ist sehr komplex und viele Mechanismen sind noch unbekannt. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass Adaptorproteine eine wichtige Rolle spielen und an spezielle Motive in der zytoplasmatischen Kette von LRP1 binden. So erkennt das kleine PTB-Adaptorprotein PID1 (Caratù et al., 2007) das distale NPxY Motiv der intrazellulären Domäne des Rezeptors. Im Folgenden soll die bisher noch ungeklärte physiologische Bedeutung von PID1 für die Regulation des LRP1 untersucht werden.

#### 4.1.1 Endogene Kolokalisation von LRP1 und PID1 in primären Hepatozyten

Um die Funktion des Adaptorproteins PID1 für die LRP1-rezeptorvermittelte Aufnahme von Lipoproteinen in die Leber zu untersuchen, wurde zunächst die Lokalisation sowohl von LRP1 als auch PID1 bestimmt. Dafür wurden primäre Hepatozyten durch Perfusion der Leber und anschließender Dichtezentrifugation aus Wildtyp-Mäusen isoliert und auf Coverslips ausgesät. Vier Stunden danach wurden die Zellen fixiert, mittels indirekter Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen LRP1 inkubiert und anschließend die Lokalisation mit dem konfokalen Nikon A1 *Laser Scanning* Mikroskop analysiert. In Abbildung 4-1A sind die Hepatozyten im Differentialinterferenzkontrast (DIC) dargestellt. Man erkennt deutlich die für Hepatozyten typische Struktur, u.a. zwei Zellkerne (blau). LRP1 (grün) als endozytierender Rezeptor, ist interessanterweise in perinukleären Bereichen zu finden.

In der in Abb. 4-1B dargestellten Immunfluoreszenz wurden Wildtyp-Hepatozyten mit Antikörpern gegen LRP1 (rot) und PID1 (grün) inkubiert. In der Überlagerung beider Aufnahmen (merge) ist deutlich zu erkennen, dass sich das endogene PID1 in den gleichen perinukleären Kompartimenten wie das endogene LRP1 befindet (Pfeile) und es zu einer Kolokalisation (gelb) kommt.





#### Abb. 4-1 Lokalisation von LRP1 und PID1 in primären Hepatozyten

Primäre Wildtyp Hepatozyten im DIC. LRP1 (grün) ist in perinukleären Kompartimenten lokalisiert. Die Zellen zeigen die hepatozyten-typischen zwei Zellkerne. Maßstab 10 µm (A). Immunfluoreszenzanalyse von endogenem LRP1 (rot) und PID1 (grün) in primären Wildtyp Hepatozyten. Beide Proteine kolokalisieren (gelb, Pfeile) im gleichen perinukleärem Kompartiment in der Zelle. Maßstab 5 µm (B).

#### 4.1.2 Kolokalisation nach Überexpression von LRP1-eGFP und PID1-RFP

Nachdem in den primären, murinen Hepatozyten beobachtet wurde, dass sich endogenes PID1 und LRP1 in den gleichen Strukturen in der Zelle befinden, sollte im Folgenden untersucht werden, ob diese Beobachtung nach einer Überexpression beider Proteine in humanen Hepatoma-Zellen (HuH7) zutrifft. Hierfür wurden Wildtyp-HuH7-Zellen subkonfluent ausgesetzt und 36 Stunden vor der Fixierung mit einem LRP1-eGFP- und einem PID1-RFP-Plasmid cotransfiziert. LRP1-eGFP (grün) und PID1-RFP (rot) werden in den HuH7 exprimiert und befinden sich im selben Kompartiment (Abb. 4-2). Die Kolokalisation der beiden Proteine ist deutlich anhand der Überlagerung beider Aufnahmen (merge, gelb) und in der Vergrößerung zu erkennen. Die Zellkernfärbung mit DAPI (blau) zeigt außerdem, dass noch weitere Zellen in dem gewählten Ausschnitt vorhanden sind, diese aber nicht erfolgreich transfiziert wurden, da sie weder LRP1-eGFP noch PID1-RFP exprimieren.



Abb. 4-2 Überexpression von LRP1-eGFP und PID1-RFP in humanen Hepatomazellen.

HuH7 Zellen nach Transfektion mit LRP1-eGFP (grün) und PID1-RFP (rot). Beide Proteine werden in den Zellen exprimiert und sind in denselben, perinukleären Kompartimenten lokalisiert. Die Kolokalisation ist in der Überlagerung (*merge*) und in der Vergrößerung deutlich an den gelben punktuellen Strukturen zu erkennen. Maßstab 20 µm, Maßstab der Vergrößerung 10 µm.

#### 4.2 Die Rolle von PID1 für die zelluläre Lokalisation von LRP1

Im Verlauf der Rezeptor-vermittelten Endozytose durchlaufen die Rezeptoren und ihre Liganden unterschiedliche endosomale Kompartimente. Nach erfolgreicher Internalisierung des Rezeptors und seinem gebundenen Liganden in sogenannte *Clathrin-Coated-Pits*, verlieren diese Vesikel ihre Clathrin-Hülle und es entstehen frühe Endosomen. Durch die Fusion mit weiteren Vesikeln (Sortierungsvesikel) und Azidifizierung des Vesikellumens, dissoziiert der Ligand vom Rezeptor. Der Rezeptor kann nun in kleineren, sich abschnürenden Vesikeln recycelt werden. Anschließend verschmilzt das verbleibende Vesikel -das sogenannte späte Endosom- mit dem Lysosom, wo der Ligand abgebaut wird. Die unterschiedlichen Kompartimente dieses endosomalen Weges lassen sich anhand von bereits bekannten, spezifischen Markerproteinen charakterisieren.

Um die spezifischen Aufgaben bestimmter Adaptorproteine, die für die Regulation und Lokalisation von Rezeptoren notwendig sind, definieren zu können, muss bekannt sein, in welchem Kompartiment der Zelle die beteiligten Adaptorproteine und die entsprechenden Rezeptoren zu finden sind. Im nächsten Abschnitt sollte deshalb untersucht werden, ob eine PID1-Defizienz in Zellen einen Einfluss auf die Verteilung von LRP1 in der Zelle hat.

# 4.2.1 LRP1 Lokalisation nach siRNA-vermitteltem PID1-*Knockdown* in primären Hepatozyten

Um die physiologische Rolle der LRP1-PID1-Interaktion für die LRP1-Lokalisation und dessen Funktion näher zu untersuchen, wurde die PID1-mRNA-Expression mittels siRNA herunterreguliert. Für dieses Experiment wurden primäre Hepatozyten aus Wildtyp-Mäusen generiert. Die Zellen wurden vier Stunden nach dem Aussäen entweder mit unspezifischer siRNA (scrambled siRNA) oder siRNA, die spezifisch für PID1 ist (PID1 siRNA) transfiziert. Weitere 24 bzw. 36 Stunden später wurden Zellen, die auf 6-Well-Platten ausgesät wurden, in TRIzol aufgenommen, um die RNA zu isolieren und deren Menge mittels quantitativer TaqMan<sup>®</sup> Realtime-PCR (qPCR) zu bestimmen. Zellen, die auf Coverslips ausgesät waren, wurden 36 Stunden nach der siRNA-Transfektion mit Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem für LRP1 spezifischen Antikörper durchgeführt und mittels konfokaler *Laser Scanning* Mikroskopie analysiert.

Die Analyse der mRNA zeigte 24 Stunden nach der siRNA-Behandlung eine um 60 % reduzierte PID1-mRNA-Menge in den PID1 siRNA behandelten Hepatozyten im Vergleich zu den mit unspezifischer siRNA behandelten Zellen. 36 Stunden nach der Transfektion war 90 % weniger PID1 mRNA in den Zellen mit PID1-*Knockdown* (PID1 siRNA) zu detektieren (Abb. 4-3A). Die Menge der PID1-mRNA wurde auf ein Referenzgen (*TATA-box-binding protein*, Tbp) bezogen, um die relative Menge der PID1 mRNA zu bestimmen.

Die visuelle Analyse mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie zeigt, dass der *Knockdown* von PID1 (PID1 siRNA) zu einer veränderten Lokalisation von LRP1 in den Zellen führt. In den kontroll-transfizierten Hepatozyten ist LRP1, wie schon in 4.1.1 beschrieben, hauptsächlich in perinukleären Kompartimenten lokalisiert. In den PID1 *knockdown* Zellen (PID1 siRNA), die nur noch 10 % der PID1-mRNA der Kontrollzellen aufweisen (Abb. 4-3A), befindet sich LRP1 hauptsächlich an der Plasmamembran (Abb. 4-3B). Interessanterweise ist in diesen Zellen keine perinukleäre Lokalisation des Rezeptors vorhanden. Diese stark veränderte LRP1-Verteilung in PID1-defizienten Zellen sollte im Folgenden näher untersucht werden.







Analyse der Transfektionseffiziens des PID1-*Knockdowns* in primären Wildtyp-Hepatozyten. Die PID1 siRNA behandelten Zellen weisen 24 Stunden nach der Transfektion 60 % weniger PID1 mRNA auf als die mit unspezifischer (scrambled) siRNA behandelten Zellen. 36 Stunden nach der Transfektion sind nur noch 10 % der in den Kontrollzellen vorhandenen PID1 mRNA vorhanden (A). Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der LRP1 (grün) Verteilung. In kontroll-transfizierten Hepatozyten (*scrambled* siRNA) ist LRP1 in perinukleären Kompartimenten lokalisiert. In PID1 siRNA behandelten (PID1 siRNA) befindet sich der größte Teil des LRP1 an der Plasmamembran, ein kleiner Teil ist diffus in die Zelle verteilt (B). Maßstab 20 µm.

# 4.2.2 Subzelluläre Verteilung von LRP1 in Wildtyp- und PID1-*knockdown* Hepatomazellen

Wie in 4.2 erwähnt, befinden sich bestimmte Endozytose-vermittelnde Rezeptoren und ihre entsprechenden Adaptorproteine in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle. Im Folgenden wurde die Verteilung von LRP1 in humanen Hepatoma-Zellen im Zusammenhang mit spezifischen Markerproteinen für bestimmte Kompartimente der Zelle untersucht. Dafür wurden Wildtyp (wt)- und PID1*knockdown* (PID1*kd*)-HuH7-Zellen auf Coverslips ausgesetzt und 24 Stunden später mit Paraformaldehyd fixiert. Im Anschluss daran wurde jeweils eine indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern spezifisch für LRP1 und für das jeweilige charakteristische Markerprotein des zu analysierenden Zellkompartiments durchgeführt. Die Zellen wurden mittels konfokalem Zeiss LSM710 *Laser Scanning* Mikroskops analysiert.

#### 4.2.2.1 LRP1 und frühe Endosomen

Frühe Endosomen sind die Vesikel des endosomalen Transports, in denen der internalisierte Rezeptor und sein gebundener Ligand nach Abbau der Clathrinhülle vorliegen. Diese Kompartimente lassen sich mittels Detektion des sogenannten frühen-Endosom-Antigen1 (*early endosom antigen 1*, EEA1) charakterisieren. EEA1 bindet Phospholipid-Vesikel, die Phosphatidylinositol-3-Phosphate beinhalten und ist essentiell für die Fusion und den Transport von frühen Endosomen (Mu et al., 1995).

In den Wildtyp-Zellen ist LRP1 (rot) wie zuvor schon in HuH7-Zellen und primären Hepatozyten beobachtet, fast ausschließlich in perinukleären Kompartimenten lokalisiert (Abb. 4-4, wt). EEA1 (grün) zeigt mit seiner punktuellen Färbung in Kernnähe ein ähnliches Verteilungsmuster. In der Überlagerung (merge) der Fluoreszenzsignale beider Proteine ist außerdem zu erkennen, dass es zu einer teilweisen Kolokalisation in diesen Kern-nahen Strukturen kommt (gelb). In PID1kd-Zellen ist LRP1 völlig anders lokalisiert (Abb. 4-4, kd). Hier liegt LRP1 diffus in punktuellen Vesikeln in den Zellen verteilt vor. Interessanterweise ist auch EEA1 in diesen Zellen verstreut in der Zelle zu finden. Die Kolokalisation zwischen LRP1 und EEA1 ist allerdings auch in den PID1kd-Zellen vorhanden (merge). Die Überlagerung wird in den vergrößerten Abbildungen deutlich (Abb. 4-4, rechts).



Abb. 4-4 Lokalisation von LRP1 und EEA1 in Wildtyp und PID1-defizienten HuH7 Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Verteilung von LRP1 (rot) und frühen Endosomen (EEA1, grün) in Wildtyp und PID1-defizienten (PID1kd) HuH7-Zellen. In Wildtyp-Zellen ist LRP1 in Kern-nahen Strukturen, die positiv für den EEA1-Antikörper sind, lokalisiert. In PID1kd-Zellen liegt LRP1 diffus in der Zelle verteilt vor. Es ist kaum eine perinukleäre Lokalisation zu erkennen. EEA1 folgt diesem Verteilungsmuster. Dieses Protein ist, wie LRP1, diffus verteilt und kolokalisiert auch teilweise in diesen Zellen mit dem Rezeptor. Die Überlagerung der Signale beider Proteine (merge) und auch die Vergrößerung zeigen dies durch die gelben punktuellen Strukturen. Maßstab 20 µm. Maßstab Vergrößerung 10 µm.

Um zu verdeutlichen, dass LRP1 und PID1 tatsächlich in den gleichen Kompartimenten vorliegen, ist im Folgenden erneut die Abbildung 4-2 dargestellt (Abb. 4-5). Zusätzlich zu den Fluoreszenzsignalen der beiden überexprimierten Proteinen LRP1-eGFP und PID1-RFP, die zuvorher schon gezeigt wurden und die gleiche Lokalisation aufwiesen wie die nativen Proteine in Wildtyp-Zellen, ist hier der dritte Fluoreszenzkanal mit angeführt. Dieser zeigt die Lokalisation des EEA1 (violett) in den mit LRP1-eGFP und PID1-RFP kotransfizierten HuH7-Zellen.

Durch die Überlagerung von LRP1-eGFP (grün), PID1-RFP (rot) und dem EEA1-Signal (violett) wird deutlich, dass sich alle drei Proteine in den gleichen frühen endosomalen Kompartimenten befinden (Abb. 4-5). Die Kolokalisation des überexprimierten LRP1eGFP und PID1-RFP mit EEA1 wird in der Überlagerung (merge) und der Vergrößerung bestätigt (weiß).


Abb. 4-5 Kolokalisation von LRP1-eGFP und PID1-RFP mit dem frühen Endosomenmarker EEA1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von überexprimiertem LRP1-eGFP (grün) und PID1-RFP (rot) mit einem Marker für frühe Endosomen (EEA1, violett) in HuH7-Wildtyp-Zellen. Alle drei Proteine befinden sich in den gleichen zellulären Strukturen. Die Kolokalisation wird durch die weißen Punkte in der Überlagerung (merge) und in der Vergrößerung deutlich. Maßstab 20 µm. Maßstab Vergrößerung 10 µm.

## 4.2.2.2 LRP1 und Lysosomen

Lysosomen bauen zellfremde und zelleigene Makromoleküle ab und stellen so für viele internalisierte Proteine den Endpunkt des endosomalen Transportweges dar. Ein typisches Markerprotein für diesen Zellorganelltyp ist das Lysosomen-assoziierte Membranprotein LAMP1 (Saftig et al., 2010). LAMP1 ist ein Membranprotein, welches meist stark glykosyliert in der Lysosomen-Membran vorliegt. Die Glykosylierung schützt das Protein vor dem Abbau durch Hydrolasen im Lysosom (Kundra and Kornfeld, 1999). Speziell für LRP1 ist bereits bekannt, dass es nach der Internalisierung von seinem Liganden dissoziiert und über spezielle endosomale Vesikel recycelt werden kann (Donoso et al., 2009) und somit nicht bis zu den Lysosomen gelangt.

Interessanterweise konnte in 4.2.2.1 festgestellt werden, dass die frühen Endosomen in PID1-defizienten Hepatomazellen anders verteilt sind als in den Wildtyp Kontrollzellen. Daher stellt sich nun die Frage, ob der Verlust von PID1 auch einen Einfluss auf die Verteilung der Lysosomen hat. Außerdem sollte untersucht werden, ob LRP1 in PID1defizienten HuH7-Zellen möglicherweise in Lysosomen vorhanden ist. Die Wildtyp-Zellen weisen erneut das perinukleäre Verteilungsmuster von LRP1 (rot) auf (Abb. 4-6, wt), das schon in den voran gegangenen Abbildungen dieser Arbeit beobachtet wurde. Außerdem liegt einen ähnliche Verteilung von LAMP1 (grün) vor, es ist in den Wildtyp-Zellen auch vorwiegend in Kern-nahen Bereichen zu finden. Allerdings ist keine Kolokalisation zwischen LRP1 und den punktförmigen Lysosomen in der Überlagerung dieser Abbildungen (merge) und auch nicht in der Vergrößerung festzustellen. In den PID1*kd*-Zellen liegt LRP1 wie zuvor detektiert, diffus in der Zelle verteilt vor. Hier ist sehr interessant, dass auch LAMP1 sein Verteilungsmuster im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen ändert. In den PID1-defizienten Zellen sind die LAMP1-positiven Lysosomen verstreut über die ganze Zelle verteilt. Weiterhin kommt es in diesen Zellen teilweise zu einer Kolokalisation von LRP1 und LAMP1 (merge). In der Vergrößerung sind die gelben Lysosomen in den Kern-nahen Bereichen gut zu detektieren. Somit scheint der PID1-Verlust zum einen für eine veränderte Lokalisation der Lysosmen verantwortlich zu sein. Zum anderen befindet sich LRP1 in PID1-defizienten Zellen teilweise in späten Endosomen bzw. in Lysosomen.



#### Abb. 4-6 Lokalisation von LRP1 und LAMP1 in Wildtyp und PID1-defizienten HuH7 Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Verteilung von LRP1 (rot) und der Lysosomen (LAMP1, grün) in Wildtyp- und PID1-defizienten HuH7 Zellen. In Wildtyp-Zellen (wt) ist LRP1 in Kern-nahen Strukturen lokalisiert. LAMP1 ist ebenfalls in Kern-nahen punktuellen Kompartimenten zu finden, doch die Überlagerung (merge) der LRP1- und LAMP1-Signale zeigt keine Kolokalisation. In PID1-defizienten Zellen (PID1*kd*) liegt LRP1 diffus in der Zelle verteilt vor. LAMP1 folgt diesem Verteilungsmuster, es ist ähnlich diffus verteilt und kolokalisiert aber in einigen wenigen Vesikeln mit LRP1 (gelb). Maßstab 20 µm. Maßstab Vergrößerung 10 µm.

#### 4.2.2.3 LRP1 und der Golgi-Apparat

Der Golgi-Apparat (Golgi) ist ein Zellorganell, das unter anderem für die Bildung und Speicherung von sekretorischen Vesikeln zuständig ist. Er empfängt meist Vesikel vom Endoplasmatischen Retikulum, in denen Proteine enthalten sind, die posttranslational modifiziert werden sollen. Anschließend werden sie mit Signalproteinen, sogenannten SNARE Proteinen (Rothman, 1994), versehen, über Golgi-Vesikel abgeschnürt und über zellinterne Transportmechanismen an ihren Bestimmungsort transportiert.

In den vorangegangenen fluoreszenzmikroskopischen Analysen von LRP1 wurde deutlich, dass der Rezeptor in Wildtyp-Zellen in Kern-nahen Kompartimenten vorliegt. Diese Kompartimente ähneln in ihrer Form dem Golgi. Da LRP1 für seine Funktion als endozytierender Rezeptor zunächst an die Plasmamembran transportiert werden muss, soll im Folgenden untersucht werden, ob LRP1 im Normalzustand der Zelle möglicherweise im Golgi lokalisiert ist. Hierfür wurden erneut Kolokalisationstudien mittels Immunfluoreszenz durchgeführt. Zuerst wurden die Zellen sowohl mit einem Antikörper für LRP1 als auch mit einem Antikörper spezifisch für ein Golgi-typisches Markerprotein, das *cis*-Golgi-Matrixprotein (GM130), inkubiert. GM130 ist ein 130 kDa großes Protein, das in der Matrix des *cis*-Golgis lokalisiert ist und für dessen Struktur wichtig ist (Nakamura et al., 1995).

In der folgenden Abbildung (Abb. 4) ist die für LRP1 (rot) typische in den Wildtyp-Zellen (wt) perinukleäre und in den PID1kd-Zellen diffuse, vesikulär verteilte Lokalisation, zu erkennen. Der GM130-Antikörper (grün) zeigt die Position des Golgis im Kern-nahen Bereich jeder Zelle im jeweils ausgewählten Ausschnitt. In den überlagerten (merge) und den vergrößerten Abbildungen von den Wildtyp- sowie den PID1kd-Zellen ist keine Kolokalisation zwischen LRP1 und dem *cis*-Golgi-Markerprotein GM130 zu erkennen.



Abb. 4-7 Lokalisation von LRP1 und dem cis-Golgi-Markerprotein GM130 in HuH7-Zellen

Indirekte Immunfluoreszenz zur Lokalisation von LRP1 (rot) und dem *cis*-Golgi-Netzwerk (GM130, grün) in Wildtyp und PID1-defizienten HuH7 Zellen. In Wildtyp-Zellen (wt) ist LRP1 in Kern-nahen Strukturen lokalisiert. In PID1*kd*-Zellen liegt LRP1 diffus in der Zelle verteilt vor. GM130 zeigt in beiden Zelltypen die für den Golgi-Apparat typische Lokalisation und Struktur in perinukleären Bereichen. Weder in der Überlagerung der Signale der beiden Proteine (merge) noch in der Vergrößerung ist eine Kolokalisation festzustellen. Maßstab 20 µm. Maßstab Vergrößerung 10 µm.

Nachdem keine Überlagerung von LRP1 und dem cis-Golgi detektiert werden konnte, wurde ein Antikörper gegen den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR) in der Immunfluoreszenz verwendet. Dieser Rezeptor ist im trans-Golgi lokalisiert. Hier binden lysosomale Enzyme spezifisch an den MPR, um dann als Rezeptor-Ligand-Komplex zu prä-lysosomalen Strukturen transportiert zu werden. Der MPR gilt als gutes Markerprotein für das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und wurde aus diesem Grund verwendet, um eine mögliche Kolokalisation von LRP1 und dem TGN untersuchen. Die zu fluoreszenzmikroskopische Analyse dieses trans-Golgi-Markerproteins zeigte eine teilweise Kolokalisation mit LRP1 in Wildtyp- und PID1-defizienten Zellen (Abb. 4-7). Zusätzlich veränderte der Knockdown des LRP1-Adaptorproteins PID1 weder die Lokalisation vom cis-Golgi noch die des trans-Golgis in der Zelle.



Abb. 4-7 Lokalisation von LRP1 und dem trans-Golgi-Markerprotein MPR in HuH7-Zellen

Indirekte Immunfluoreszenz zur Lokalisation von LRP1 (rot) und dem *trans*-Golgi-Netzwerk (MPR, grün) in Wildtyp (wt)- und PID1-defizienten (PID1*kd*)-HuH7-Zellen. In Wildtyp-Zellen ist LRP1 in Kern-nahen Strukturen lokalisiert. In PID1*kd*-Zellen liegt LRP1 diffus in der Zelle verteilt vor. MPR zeigt in beiden Zelltypen die für den Golgi-Apparat typische Lokalisation und Struktur in perinukleären Bereichen. Wildtypund PID1*kd*-HuH7 weisen in der Überlagerung der Signale der beiden Proteine (merge) und in der Vergrößerung eine teilweise Kolokalisation (gelb) auf. Maßstab 20 µm. Maßstab Vergrößerung 10 µm.

## 4.2.2.4 LRP1 und der Retromerkomplex

Der Retromerkomplex ist ein pentamerer Komplex aus drei *Vacular protein sorting* (Vps)-Proteinen, dem Vps35, Vps29 und Vps26, und zwei *Sortin Nexin* (SNX)-Proteinen, SNX1 und SNX2 oder auch SNX5 und SNX6 (Seaman, 2005). Der Komplex ist an endosomalen Membranen assoziiert und vermittelt den retrograden Transport von Protein zwischen Endosomen und dem Golgi-Apparat und auch zwischen Endosomen und der Plasmamembran. LRP1 ist bei allen bisher durchgeführten Experimenten in den Wildtyp-Zellen in perinukleären, frühen endosomalen Strukturen zu detektieren. In Abwesenheit von PID1 befindet LRP1 sich dagegen vorwiegend diffus in der Zelle verteilt und an der Plasmamembran lokalisiert. Im Folgenden soll geklärt werden, ob der Retromerkomplex für die Translokation von LRP1 von den intrazellulären Endosomen an die Plasmamembran verantwortlich ist.

Für die Untersuchung des Retromerkomplexes wurden Wildtyp (wt)- und PID1-defiziente (PID1*kd*)-HuH7-Zellen auf Coverslips ausgesetzt. 24 Stunden später wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und in einer indirekten Immunfluoreszenz mit Antikörpern spezifisch für LRP1 und Vps35, für LRP1 und SNX1 und für LRP1 und SNX27 inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die eingebetteten Zellen im konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM710) analysiert.



Abb. 4-8 Kolokalisation von LRP1 und dem Retromerprotein Vps35 in HuH7- Zellen

Immunfluoreszenzanalyse von LRP1 (rot) und dem Retromerprotein Vps35 (grün) in Wildtyp- und PID1defizienten HuH7-Zellen. In den Wildtyp-Zellen ist LRP1 in perinukleären Strukturen, die ebenfalls positiv für den Vps35-Antikörper sind, lokalisiert. In PID1kd-Zellen liegt LRP1 diffus in der Zelle verteilt vor. Es ist kaum eine perinukleäre Lokalisation zu erkennen. Vps35 folgt diesem Verteilungsmuster, es ist ähnlich diffus verteilt und kolokalisiert auch in diesen Zellen mit LRP1. Allerdings kolokalisieren nicht alle Vps35-positiven mit allen LRP1-positiven Vesikeln. Dies ist in beiden Zelltypen der Fall. Die Überlagerung der Signale beider Proteine (merge) und die Vergrößerung zeigen die Kolokalisation durch die gelben punktuellen Strukturen. Maßstab 20 µm. Maßstab Vergrößerung 10 µm.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (Abb. 4-8) zeigt, dass LRP1 (rot) in den Kontrollzellen (wt) wieder in den typischen Kern-nahen Kompartimenten und in den PID1*kd*-Zellen diffus in Vesikeln verteilt vorliegt. In den Wildtyp-Zellen befindet sich Vps35 (grün) in den gleichen perinukleären Kompartimenten wie LRP1, was die gelben Vesikel in der Überlagerung (merge) und in der Vergrößerung zeigen. Interessanterweise folgt Vps35 dem Verteilungsmuster von LRP1 auch in Abwesenheit von PID1 in den PID1*kd*-HuH7-Zellen. Hier sind die gelben Vesikel, die eine Kolokalisation zwischen LRP1 und dem Retromerprotein Vps35 deutlich machen, ebenfalls überall in den Zellen zu finden. Allerdings kolokalisieren nicht alle Vps35-positiven mit den LRP1-positven Vesikeln in den beiden untersuchten Zelltypen.

Nachdem eine starke Veränderung in der Lokalisation des Vps35 beobachtet wurde, wurde ein weiteres Protein des Retromerkomplexes näher betrachtet. SNX1 ist eines von zwei Strukturproteinen des Komplexes, welche die Bindung an Phosphatidylinositol-3Phosphate der endosomalen Membran über die, in ihrer dimerisierten BAR (*Bin-Amphiphysin-Rvs*)-Domäne lokalisierten *Phox homology* (PX)-Domäne, vermitteln (Seaman, 2005). In der folgenden Abbildung (Abb. 4-9) ist erneut die schon zuvor mehrfach detektierte Lokalisation von LRP1 (rot) in den perinukleären Bereichen in den Kontrollzellen und dessen diffuse, vesikuläre Verteilung in Abwesenheit von PID1 zu erkennen.





Immunfluoreszenzanalyse von LRP1 (rot) und dem Retromerprotein SNX1 (grün) in Wildtyp- und PID1defizienten HuH7-Zellen. In Wildtyp-Zellen ist LRP1 in perinukleären Strukturen, die positv für den SNX1-Antikörper sind, lokalisiert. In PID1kd-Zellen liegt LRP1 diffus in der Zelle verteilt vor. Es ist kaum eine perinukleäre Lokalisation zu erkennen. SNX1 folgt diesem Verteilungsmuster, es ist genau so diffus verteilt und kolokalisiert auch in diesen PID1kd-Zellen mit LRP1. Allerdings kolokalisieren nicht alle SNX1positiven mit allen LRP1-positiven Vesikeln. Dies ist in beiden Zelltypen der Fall. Die Überlagerung der Signale beider Proteine (merge) und auch die Vergrößerung zeigt diese Kolokalisation durch die gelben punktuellen Strukturen. Maßstab 20 µm. Maßstab Vergrößerung 10 µm.

Die Beobachtung, die schon für Vps35 gemacht wurde, traf auch auf SNX1 zu. Dieses Protein kolokalisierte in HuH7-Wildtyp und PID1kd-Zellen mit LRP1 und folgte dem veränderten Verteilungsmuster von LRP1 in den PID1kd-Zellen. Die vorhandene Kolokalisation zwischen LRP1 und SNX1 in Kernnähe (wt) und in der Peripherie bei den Zellen (PID1kd) ist im merge und der Vergrößerung zu erkennen. Zusätzlich ist auch die unterschiedliche Lokalisation von SNX1 zwischen den beiden untersuchten Zelltypen festzustellen. Allerdings kolokalisieren auch hier nicht alle SNX1-positiven mit den LRP1positven Vesikeln in beiden Zelltypen. So führte der *Knockdown* von PID1 in HuH7-Zellen interessanterweise zu einer veränderten Verteilung von zwei Proteinen, die dem Retromerkomplex zuzuordnen sind: VPS35 und SNX1. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde im Folgenden noch ein weiteres *Sortin Nexin*-Protein, SNX27, analysiert. SNX27 interagiert nicht direkt mit dem Retromer, ist aber mit diesem assoziiert und gewinnt in der Literatur immer mehr an Bedeutung für den Recycling-Transport von endozytotischen Rezeptoren (Temkin et al., 2011).



#### Abb. 4-10 Lokalisation von LRP1 und Sortin Nexin 27 (SNX27) in HuH7-Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Analyse von LRP1 (rot) und dem *Sortin Nexin* SNX27 (grün) in Wildtyp- und PID1-defizienten HuH7-Zellen. In Wildtyp-Zellen ist LRP1 in perinukleären Strukturen lokalisiert und es kann einen geringe Kolokalisation mit SNX27 beobachtet werden. In PID1kd-Zellen liegt LRP1 diffus in der Zelle verteilt vor. Hier ist keine perinukleäre Lokalisation zu erkennen und SNX27 zeigt keine veränderte Lokalisation im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. Die PID1kd-Zellen weisen auch nur eine schwache Kolokalisation der beiden Proteine (*merge*) auf. Auch die Vergrößerung zeigt nur eine geringfügige Überlagerung der Proteine in PID1kd-Zellen. Maßstab 20 µm. Maßstab Vergrößerung 10 µm.

Interessanterweise kann nur eine sehr schwache Kolokalisation zwischen LRP1 und dem SNX27 in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse (Abb. 4-10) beobachtet werden. LRP1 (rot) weist, wie schon in den vorherigen Analysen, eine veränderte Verteilung in PID1*kd*-Zellen auf, während der Rezeptor in den Wildtyp-Zellen erneut in Kern-nahen Kompartimenten zu finden ist. SNX27 (grün) kolokalisiert in Wildtyp-Zellen nur sehr gering mit LRP1 (merge und Vergrößerung). Dies ist in den PID1*kd*-Zellen ebenfalls zu erkennen. Außerdem ändert sich die Lokalisation von SNX27 in den Zellen, die kein PID1 exprimieren im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht.

#### 4.2.2.5 LRP1 und das Zytoskelett der Zelle

In den vorherigen Kapiteln wurde beobachtet, dass die PID1kd-Zellen starke Veränderungen in wichtigen Kompartimenten der Zelle aufweisen. Endosomen, und damit einhergehend auch der Retromerkomplex und die Lysosomen werden über das Zytoskelett der Zelle transportiert und somit auch dort lokalisiert. Aus diesem Grund wurde im nächsten Abschnitt untersucht, ob auch der Aufbau des Zytoskeletts von dem der Wildtyp-Zellen abweicht, wenn die Zellen kein PID1 exprimieren.



#### Abb. 4-11 Lokalisation von LRP1 im Cytoskelett der HuH7-Wildtyp- und PID1kd-Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Analyse von LRP1 (rot) und dem Mikrotubuli-Netzwerk, das mittels eines  $\alpha$ -Tubulin-Antikörpers (grün) visualisiert wurde. LRP1 ist in Wildtyp-Zellen in Kern-nahen Bereichen lokalisiert. In PID1-defizienten Zellen liegt LRP1 in vesikulären Strukturen diffus in der Zelle verteilt vor. Die Analyse des  $\alpha$ -Tubulins zeigt keine Unterschiede im Aufbau des Cytoskeletts zwischen Wildtyp- und PID1*kd*-Zellen. Maßstab 20 µm.

Zur Analyse des Zytoskeletts wurde hier ein Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin eingesetzt, da die aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin aufgebauten Mikrotubuli ein Bestandteil des Zytoskeletts sind. Zusätzlich wurde LRP1 in den Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert (Abb. 4-11). LRP1 ist auch hier, wie schon zuvor gezeigt, in perinukleären Bereichen lokalisiert (Abb. 4-11 wt). Ebenso ist in der Überlagerung der Färbung von LRP1 und dem Mikrotubuli-Netzwerk (merge) auch wieder deutlich zu erkennen, dass LRP1 in den PID-defizienten Zellen diffus in den Zellen verteilt vorliegt (Abb. 4-11 PID1*kd*). Der *Knockdown* von PID1 führt dagegen zu keiner Veränderung in der Struktur der Mikrotubuli im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen mit normaler PID1-Expression.

# 4.2.2.6 LRP1-Lokalisation nach *Knockdown* des Retromers in PID1-defizienten Zellen

In Kapitel 4.2.2.4 konnte gezeigt werden, dass LRP1 und zusätzlich Proteine des Retromerkomplexes, Vps35 und SNX1, nach dem Knockdown von PID1 in HuH7-Zellen verteilt vorliegen als in PID1-exprimierenden Wildtyp-Zellen. anders Der Retromerkomplex, der unter anderem Proteine von intrazellulären, endosomalen Kompartimenten zur Plasmamembran geleitet, ist möglicherweise an der Translokation von LRP1 beteiligt. Speziell das Retromerprotein Vps29 spielt eine wichtige Rolle in der Assoziation der fünf Retromerproteine. Es ist bereits gezeigt worden, dass sowohl Mutationen im Vps29-Gen als auch der Knockdown des Proteins zu einer Dissoziation der Retromerproteine führt (Steinberg et al., 2013). In diesem Fall kann der Retromerkomplex seine Rolle im retrograden Transport nicht mehr erfüllen.

Aus diesem Grund sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich die Lokalisation von LRP1 in den PID1kd-Zellen ändert, wenn zusätzlich die Expression des Retromerproteins Vps29 durch einen siRNA-vermittelten *Knockdown* herunterreguliert wird. Hierzu wurden PID1kd-HuH7-Zellen auf Coverslips ausgesät und 24 Stunden später mit Paraformaldehyd fixiert. In der anschließenden indirekten Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit Antikörpern spezifisch für LRP1 und das Retromerprotein Vps35 inkubiert und deren Lokalisation in der Zelle mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Abbildung 4-13 zeigt, dass LRP1 (rot) und Vps35 (grün) in den PID1-defizienten Zellen (PID1kd) erneut diffus verteilt in den Zellen zu finden sind. Außerdem kolokalisieren beide Proteine, was durch die gelbe Färbung in der Überlagerung (merge) deutlich zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu finden sich in den sowohl für PID1- als auch Vps29-defizienten HuH7-Zellen (Abb. 4-12, PID1kd+Vps29kd) sowohl Zellen, die den Phänotyp der PID1kd-Zellen zeigen, als auch Zellen, die kaum Vps35 exprimieren (Pfeile). In diesen Zellen befindet sich LRP1 wieder in den aus den Wildtyp-Zellen bekannten perinukleären Kompartimenten. In der

Vergrößerung ist gut zu erkennen, dass die Zelle links unten im Bild (Pfeil 1) den diffusen, vesikulären Phänotyp der LRP1-Lokalisation zeigt, der typisch für die PID1kd-Zellen ist. In der Zelle rechts im Bild (Pfeil 2) ist dagegen die Kern-nahe Lokalisation des LRP1 zu beobachten, die typisch für die Wildtyp-Zellen ist. Vermutlich ist Vps29 nur in diesen Zellen mittels siRNA erfolgreich herunterreguliert. Diese Beobachtung wird durch die kaum noch vorhandene Färbung von Vps35 in genau diesen Zellen unterstützt. So scheint es, als ob der, durch den *Knockdown* von Vps29, nicht-funktionelle Retromerkomplex, die Translokation von LRP1 zur Plasmamembran verhindert.



Abb. 4-12 Lokalisation von LRP1 nach Knockdown des Retromers in PID1kd-HuH7-Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Analyse von LRP1 (rot) und Vps35 (grün) in PID1kd-Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen Vps29. In den PID1-defizienten Zellen (PID1kd) liegt LRP1 in vesikulären Strukturen diffus in der Zelle verteilt vor. In den Zellen, in denen zusätzlich Vps29 herunter reguliert ist, sind Zellen mit diffuser aber auch Zellen mit perinukleärer LRP1-Lokalisation zu erkennen. Maßstab 20 µm. Maßstab Vergrößerung 10 µm.

## 4.3 Generierung einer PID1-Knockout-Maus

In den vorherigen Kapiteln konnte bereits der Einfluss von PID1 auf die Lokalisation von LRP1 und die Verteilung von Proteinen des Retromerkomplexes *in vitro* in murinen und humanen Zellen gezeigt werden. Um die physiologische Rolle von PID1 *in vivo* untersuchen zu können, wurde eine PID1-*Knockout* (PID1<sup>-/-</sup>)-Maus generiert. Ein Mausmodell hat den Vorteil, dass zum einen nicht mehr auf siRNA-Transfektionen zurück gegriffen werden muss, um gewünschte Proteine herunter zu regulieren, zum anderen kann der Einfluss des Proteins auf den gesamten Metabolismus der Maus untersucht werden.

Hierzu wurde das sogenannte *Knockout first*-Modell der Firma KOMP Repository genutzt. Nach erfolgreicher Verpaarung der vitalen Nachkommen der ersten heterozygoten Nachkommen wurden die daraus hervor gegangenen homozygoten PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse näher analysiert.

#### 4.3.1 Genotypisierung

Um sicher zu stellen, dass die zu untersuchenden Mäuse den gewünschten Genotyp tragen, wurden alle Tiere wenige Tage nach ihrer Geburt genotypisiert. Dafür wurden Schwanzbiopsien genommen, hieraus die DNA isoliert, mittels spezifischer Primer und PCR die entsprechenden Gensequenzen amplifiziert und mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese analysiert. Abbildung 4-14 zeigt ein Beispiel-Gel mit den PCR-Amplifikationen je einer Wildtyp (+/+)-, einer für PID1 heterozygoten (+/d) und einer für PID1 homozygoten (d/d)-Maus. Zusätzlich können anhand des DNA-Markers (Ladder) die Größen der Amplifikate in Basenpaaren (bp) bestimmt werden. Destilliertes Wasser (dest. H<sub>2</sub>O) dient als Negativ-Kontrolle und zeigt entsprechend kein Amplifikat.



#### Abb. 4-13 Genotypisierung von PID1-Knockout-Mäusen

Agarosegel mit DNA-Banden nach erfolgter Genotypisierung der PID1-*Knockout*-Mäuse. In der ersten Bahn ist die DNA-Leiter (Ladder) für die Bestimmung der Bandengröße aufgetragen. In den folgenden Bahnen sind dest. H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle, eine DNA-Probe einer Wildtyp-Maus (+/+)-, eine Probe eines heterozygoten Tieres (+/d) und eine Probe einer homozygoten PID1-defizienten Maus (d/d) zu erkennen. Eine Bande bei 405 Basenpaaren (bp) bedeutet, dass es sich um den Wildtyp handelt. Die heterozygoten Mäuse zeigen zwei Banden, eine bei 405 bp und eine bei 462 bp. Homozygote Nachkommen weisen nur eine Bande bei 462 bp auf.

Eine Bande bei 405 Basenpaaren(bp) ist charakteristisch für die Wildtyp-Mäuse (+/+). Zwei Banden, eine bei 405 und eine bei 462 bp zeigen das Muster eines heterozygoten Genotyps (+/d) und eine einzelne Bande bei 462 bp bedeutet, dass es sich um einen homozytogen *Knockout* (d/d) von PID1 handelt.

# 4.3.2 Expressions analyse der mRNA von PID1 und LRP1 in verschiedenen Geweben

Um die Organ-spezifische Expression zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression von PID1 in verschiedenen Organen dieser Tiere mittels qPCR analysiert. Neben der PID1mRNA wurde auch die mRNA-Expression von LRP1 bestimmt (Abb. 4-14).



Abb. 4-14 Expressionsmuster der mRNA von PID1 und LRP1 in Wildtyp- und PID1-/--Mäusen

mRNA-Expression von PID1 und LRP1 in den Organen von Wildtyp (wt)- und PID1-/--Mäusen. Aufgetragen ist jeweils die auf Tbp normalisierte Anzahl der Kopien. In Wildtyp-Mäusen zeigt PID1 (A) das gleiche Verteilungsmuster wie LRP1 (B). In den PID1-/--Mäusen ist die mRNA-Expression von PID1 in allen Geweben deutlich herunter reguliert, hingegen gibt es keine Änderung in der der mRNA-Expression von LRP1.

Abbildung 4-15 zeigt die mRNA-Kopien von PID1 (A) und LRP1 (B) in verschiedenen Organen der Wildtyp (wt)- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse. Es ist zu erkennen, dass die mRNA-Menge von PID1 in den verschiedenen Organen der Wildtyp-Tiere variiert und dabei aber dem Verteilungsmuster der LRP1-mRNA ähnelt. Speziell in der Leber (~20x10<sup>5</sup>) und in den Fettgeweben (subWAT und epiWAT, ~15x10<sup>5</sup>) der Wildtyp-Mäuse konnten die höchste mRNA-Konzentration sowohl von PID1 als auch von LRP1 nachgewiesen werden. Hingegen lagen viel weniger mRNA-Kopien von PID1 und von LRP1 in Niere und Milz  $(\sim 4x10^5)$  vor.

Der Vergleich der mRNA-Kopie-Mengen der Wildtyp-Tiere mit denen der PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigt eine deutlich reduzierte Expression der PID1-Expression, wobei residuale Mengen der PID1-mRNA nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu ist die Expression von LRP1 in den PID1<sup>-/-</sup>-Tieren nicht beeinträchtigt und entspricht denen der Wildtyp-Tiere. Der Grund für die Detektion geringer Mengen an PID1-mRNA-Kopien in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen ist wahrscheinlich ein Effekt des sogenannten alternativen *Splicings*, die von den Herstellern des Konstrukts (KOMP Repository) ebenfalls beschrieben werden (Ryder et al., 2014). Aufgrund der geringen PID1-Expression können jedoch metabolische Studien in Abhängigkeit der PID1-Expression durchgeführt werden. Diese Mauslinie wird im Folgenden aufgrund der geringen PID1-mRNA-Expression als PID1<sup>-/-</sup>

# 4.3.3 Protein-Expression von PID1, LRP1 und dem LDL-Rezeptor in Leberextrakten von Wildtyp und PID1 *Knockout* Mäusen

Nachdem eine deutliche Reduktion der PID1-Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde, sollte diese auch auf Proteinebene mittels Westernblot übergeprüft werden. Da PID1 und LRP1 in großem Maße in der Leber exprimiert werden, wurde speziell dieses Gewebe näher betrachtet (Abb. 4-15). Hierzu wurde eine Membranpräparation durchgeführt, um die zytosolischen (A) von den membranständigen Proteinen (B) zu trennen. Bei der Membranpräparation werden nicht nur die plasmamembranständigen Proteine, sondern auch Proteine, die in intrazellulären Membranen lokalisieren, von denen im Zytosol getrennt. β-Aktin dient als Referenz-Protein, um den Vergleich von jeweils gleichen Proteinmengen in jeder Probe zu gewährleisten. Es sind jeweils vier Proben von Wildtyp (WT) und PID1<sup>-/-</sup>-Lebergewebe auf dem Gel gezeigt.

In den Proben der Wildtyp-Mäuse sind klare Banden des PID1-Proteins sowohl in der zytosolischen (A) als auch in der Membranfraktion (B) zu erkennen. Im Gegensatz dazu sind diese in Proben der PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht vorhanden. Außerdem scheint LRP1 in den zytosolischen Fraktionen der Leberextrakte der PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse in etwas geringerer Menge vorhanden zu sein als in den Wildtyp-Extrakten (A). Es ist zu erkennen, dass der LDL-Rezeptor (LDL-R) in den Membranfraktionen der PID1<sup>-/-</sup>-Präparationen etwas mehr

vorhanden ist als in denen der Wildtyp-Mäuse (B). Dies könnte auf eine Kompensation einer gestörten LRP1 Funktion durch den LDL-R hindeuten.



Abb. 4-15 Westernblot-Analyse von Lebergewebe aus Wildtyp- und PID1-/--Mäusen

Detektion von LRP1, PID1 und  $\beta$ -Aktin (als Referenz-Protein) mittels Westernblot der zytosolischen Fraktionen (A) und zusätzlich dem LDL-Rezeptor (LDL-R) in den Membranfraktionen (B) von Wildtyp (WT) und PID1-/-- Lebergewebe nach einer Membranpräparation.

## 4.4 Die Rolle der LRP1-PID1-Interaktion für die Funktion von LRP1

#### 4.4.1 Insulin-vermittelte Translokation von LRP1 in primären Hepatozyten

LRP1 spielt eine wichtige Rolle in der Rezeptor-vermittelten Endozytose und ist interessanterweise im Normalzustand der Zelle nicht an der Plasmamembran, sondern in perinukleären Kompartimenten zu finden (Laatsch et al., 2009). Damit der Rezeptor seine Rolle in der Endozytose von Lipoproteinen und anderen Liganden erfüllen kann, muss er von diesen intrazellulären, endosomalen Bereichen an die Plasmamembran transportiert werden. Es ist bekannt, dass Insulin diese Translokation von LRP1 vermitteln kann (Laatsch et al., 2009). Wie bereits gesehen, wird sowohl die LRP1-mRNA als auch das Protein im Lebergewebe der in dieser Arbeit untersuchten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse stark exprimiert. Im folgenden Experiment sollte zunächst untersucht werden, ob Insulin auch in primären Hepatozyten die Translokation von LRP1 vermittelt. Anschließend sollte geklärt werden, ob die Abwesenheit von PID1 einen Einfluss auf diesen Mechanismus hat.

Dafür wurden primäre Hepatozyten aus den Lebern von Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen generiert und auf Coverslips ausplattiert. Zwölf Stunden später wurden die Zellen mit Insulin stimuliert und 15 Minuten nach der Stimulation mit Paraformaldehyd fixiert. In der

anschließenden indirekten Immunfluoreszenz wurde ein Antikörper spezifisch für LRP1 eingesetzt.



Abb. 4-16 Insulin-vermittelte Translokation von LRP1 in primären Hepatozyten

Immunfluoreszenzanalyse von von primären Hepatozyten aus Wildtyp (wt)- und PID1-/-- Mäusen nach Stimulation mit Insulin. LRP1 (grün) translokalisiert in Wildtyp-Zellen von perinukleären Kompartimenten (wt -Insulin) Insulin-vermittelt an die Plasmamembran (wt +Insulin). In PID1-/--Hepatozyten gibt es keinen Unterschied in der Lokalisation vor (PID1 $k_{\theta}$  -Insulin-) und nach (PID1 $k_{\theta}$  +Insulin) Insulinbehandlung. Maßstab 20 µm.

In der fluoreszenzmikroskopischen Analyse (Abb. 4-16) ist zu erkennen, dass LRP1 (grün) in den unbehandelten Wildtyp-Hepatozyten (wt -Insulin) in den bereits bekannten Kernnahen Kompartimenten vorliegt und nach Insulinstimulus (wt +Insulin) primär an der Plasmamembran zu finden ist. Bei der Betrachtung der PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten ist festzustellen, dass LRP1 in Abwesenheit von PID1 im nicht stimulierten Zustand (PID1*ko* -Insulin) diffus in den Zellen verteilt vorliegt. Im Gegensatz zu den unstimulierten Wildtyp-Zellen, ist LRP1 in den nicht stimulierten PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten, nicht nur intrazellulär, sondern auch an der Plasmamembran zu finden. Interessanterweise bewirkt die Stimulation der PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten mit Insulin (PID1*ko* +Insulin) keine sichtbare Translokation von LRP1 an die Plasmamembran. So scheint die Insulin-vermittelte Translokation von LRP1 in Abwesenheit von PID1 nicht mehr zu funktionieren.

#### 4.4.2 Aufnahme von triglyzeridreichen Lipoproteinen

LRP1 spielt neben dem LDL-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Lipoprotein-Remnants in die Leber und wird für diesen Zweck Insulin-vermittelt an die Plasmamembran transportiert. Wie in Abb. 4-16 festgestellt, liegt LRP1 in den PID1<sup>-/-</sup> Hepatozyten auch im nicht stimulierten Zustand an der Plasmamembran vor, während es in den Wildtyp-Zellen ohne Insulin-Stimulation nahezu ausschließlich intrazellulär, in Kern-nahen Strukturen zu detektieren ist.

Im folgenden Experiment sollte deshalb untersucht werden, ob der Verlust von PID1 einen Einfluss auf die Aufnahme von triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) in die Hepatozyten hat. Dafür wurden primäre Hepatozyten aus Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen generiert und mit radioaktiv-markierten Lipoprotein-Partikeln inkubiert (Abb. 4-17).



Abb. 4-17 Aufnahme von <sup>125</sup>I- markierten TRL-*Remnants* in Wildtyp- und PID1-/--Hepatozyten Aufnahme von radioaktiv-<sup>125</sup>I-markierten triglyzeridreichen Lipoprotein (TRL)-*Remnants* in Wildtyp- und PID1-/--Hepatozyten, gemessen mittels γ-Counter. Es ist kein Unterschied zwischen Wildtyp (wt 1h)- und

PID1-/- (PID1-/- 1h)-Hepatozyten in der Aufnahme der TRL-Remnants nach einer Stunde festzustellen. Nach vier Stunden Inkubation ist zu erkennen, dass die PID1-/--Hepatozyten mehr TRL-Remnants aufgenommen haben als die Kontroll-Zellen (wt 4h). (\*P< 0.05). n=2.

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben, für die Bestimmung der in die Zellen aufgenommenen Radioaktivität weiter verarbeitet. In der Abbildung 4-18 ist die Aufnahme von <sup>125</sup>I-markierten TRL-*Remnants* nach einer Inkubationszeit von einer und vier Stunden in Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten dargestellt. Die Quantifizierung der Aufnahme der radioaktiven Partikel nach einer Stunde Inkubation zeigte keinen Unterschied zwischen den Wildtyp- und den PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozten (Abb. 4-17). Im Gegensatz dazu hatten die PID1<sup>-/-</sup>

Zellen nach vier Stunden signifikant mehr TRL-Remnants aufgenommen als die Zellen der Wildtyp-Mäuse.

Zur Visualisierung der Aufnahme von Fluoreszenz (DiD)-markierten Lipoproteinen wurden aus Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen generierte primäre Hepatozyten auf Coverslips ausgesät. Zwölf Stunden später wurden die Hepatozyten für eine Stunde mit DiD-markierten TRL-*Remnants* inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, ein Antikörper spezifisch für LRP1 verwendet und die Zellen im konfokalen Nikon A1 *Laser Scanning* Mikroskop untersucht (Abb. 4-18).



Abb. 4-18 Aufnahme von DiD-markierten Lipoproteinen in Wildtyp- und PID1-/- Hepatozyten

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme von DiD-markierten triglyzeridreichen Lipoprotein-*Remnants* (DiD-CR) in primäre Hepatozyten von Wildtyp- und PID1-/--Mäusen. LRP1 (rot) ist im Wildtyp (wt)- in perinukleären Kompartimenten und in PID1-/--Zellen in Vesikeln diffus in der Zelle verteilt, aber auch an der Plasmamembran lokalisiert. Im Zytoplasma der PID1-/--Hepatozyten sind im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen scheinbar mehr DiD-markierte CR vorhanden. Maßstab 20 µm.

Während LRP1 (rot) in den Wildtyp-Zellen (wt) in perinukleären Kompartimenten zu detektieren war, zeigte es sich in den PID1<sup>-/-</sup>-Zellen diffus in Vesikeln innerhalb der Zellen verteilt. Zusätzlich war LRP1 in den PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten auch vermehrt an der Plasmamembran der Zellen zu detektieren. Außerdem wurden im Vergleich zu Wildtyp-Hepatozyten mehr DiD-positive TRL-*Remnants* (CR, grün) in die PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten aufgenommen.

## 4.4.3 Abbau von triglyzeridreichen Lipoproteinen

In Kapitel 4.4.2 konnte gezeigt werden, dass PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten mehr triglyzeridreiche Lipoproteine aufnehmen als Wildytyp-Hepatozyten. Diese Beobachtung führt zur der Frage, ob der Verlust von PID1 einen Einfluss auf die Degradation der aufgenommenen Partikel hat. Es ist möglich, dass der Verlust von PID1 lediglich einen Einfluss auf die Degradation der aufgenommenen TRL hat und deswegen eine größere Menge an Partikeln in PID1-defizienten Hepatozyten detektiert werden konnte. Es ist bekannt, dass die über LRP1 endozytierten Lipoprotein-*Remnants* über den endosomalen Weg zum Teil zu den Lysosomen gelangen und dort von lysosomalen Enzymen hydrolysiert werden (Heeren et al., 1999). Andere Bestandteile der TRL, wie das ApoE, werden nach der Internalisierung mittels LRP1 recycelt und sezerniert.

Im folgenden Experiment wurden primäre Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten generiert, ausgesät und für vier Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen <sup>125</sup>I-markierten TRL-*Remnants* inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Nährmedium der Zellen abgenommen und nur die Radioaktivität im Medium detektiert, die über den lysosomalen Abbau von <sup>125</sup>Imarkierten TRL-*Remnants* freigesetzt wurde. Dadurch kann ein Rückschluss auf die Fähigkeiten der Zellen zum Abbau der TRL geschlossen werden (Abb. 4-19).

Abbildung 4-20 zeigt, dass nach vier Stunden im Medium der PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten (PID1<sup>-/-</sup> 4h) signifikant weniger Radioaktivität zu detektieren war als im Medium der Wildtyp-Hepatozyten (wt 4h). Die Degradation der Partikel stieg in den PID1<sup>-/-</sup>-Zellen, genau wie in den Wildtyp-Zellen, bei höherer Konzentration der eingesetzten *Remnants* stärker an, jedoch war diese im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen in PID1-defizienten Hepatozyten jeweils um circa die Hälfte reduziert.



Abb. 4-19 Abbau von triglyzeridreichen Lipoproteinen

Abbau von radioaktiv-<sup>125</sup>I-markierten, triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL)-Remnants in Wildtyp- und PID1-/--Hepatozyten. Nach vierstündiger Inkubation ist zu erkennen, dass die PID1-/--Zellen weniger TRL-Remnants degradiert haben als die Wildtyp-Zellen (wt 4h). (\*P< 0.05). n=2

# 4.5 Hochfettdiät-induzierte Stoffwechselerkrankungen von Wildtypund PID1-*knockout*-Mäusen

Der Überfluss an Nahrung der westlichen Welt und das damit einhergehende Übergewicht der Bevölkerung stellt ein großes gesundheitliches Problem der heutigen Zeit dar. Eine Vielzahl von metabolischen Erkrankungen tritt als Folge des starken Übergewichts auf. Wichtige Beispiele hierfür sind kardiovaskuläre Erkrankungen, die Nicht-Alkoholische Leberverfettung oder der Typ2 Diabetes Mellitus.

Lipoprotein-Rezeptoren wie LRP1 werden für die Aufnahme von Lipiden in die Leber benötigt. Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, ob die in Abwesenheit von PID1 veränderte Lokalisation von LRP1 und die damit einhergehende veränderte Funktion des Rezeptors in der Aufnahme von Lipoproteinen in die Leber, einen Einfluss auf die Entstehung von Diät-induzierten Erkrankungen hat. Um die physiologische Rolle von PID1 näher zu betrachten, wurden PID1<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäuse beginnend im Alter von fünf Wochen für insgesamt 20 Wochen mit einer Hochfettdiät (HFD) gefüttert. Das Futter besteht zu 35,5 % aus Fett und verursacht eine Diät-induzierte Adipositas und eine periphere Insulinresistenz. Als Kontrolle wurden weitere PID1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäuse mit einer Kontrolldiät (Chow) gefüttert.

## 4.5.1 Auswirkungen der Hochfettdiät auf Körper- und Organgewicht

Um die Auswirkungen der HFD bei einem PID1-Verlust in den PID1<sup>-/-</sup>- Mäusen zu untersuchen, wurde zuerst das Körpergewicht der Mäuse wöchentlich über den Fütterungszeitraum bestimmt. Zu Beginn der Fütterungsstudie wogen die Mäuse der beiden Gruppen (Wildtyp (WT) und PID1<sup>-/-</sup>) im Mittel 20 g. Nach der Fütterungsperiode hatten beide Gruppen ihr Gewicht mehr als verdoppelt, die Mäuse beider Gruppen wogen im Mittel 45 g. Die folgende Abbildung (Abb. 4-20) zeigt, dass es keinen Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen PID1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen innerhalb der 20 Wochen gab.



**Abb. 4-20 Verlauf des Körpergewichts von mit HFD gefütterten Mäusen über 20 Wochen** Wöchentliche Bestimmung des Körpergewichts von PID1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen (WT) über 20 Wochen Hochfettdiät. Die Mäuse beider Gruppen nehmen kontinuierlich über den Fütterungszeitraum zu. Es gibt keinen Unterschied im Körpergewicht zwischen den WT- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen. n = 10 pro Gruppe.

Im Anschluss an die Fütterungsstudie wurden die Organe beider Mausgruppen näher analysiert. In Abbildung 4-22 sind die Gewichte der Organe der Chow- und HFDgefütterten Wildtyp (wt HFD) und PID1<sup>-/-</sup> (PID1<sup>-/-</sup> HFD)-Mäuse dargestellt. Das subkutane (subWAT) und epididymale (epiWAT) weiße Fettgewebe, das interscapulare braune Fett (iBAT) und die Leber der mit HFD gefütterten Mäuse waren signifikant schwerer als die entsprechenden Gewebe der Kontrolltiere (wt chow, PID1<sup>-/-</sup> chow). Ebenso waren das subscapulare braune Fett (scBAT), die Nieren und das Herz der mit HFD gefütterten Mäuse signifikant schwerer. Muskel und Milz zeigten dagegen keine Veränderung des Gewichts in den mit HFD gefütterten Tieren. Außerdem gab es keinen Unterschied im Organgewicht zwischen den Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen gleicher Fütterungsgruppen. Somit ist kein Einfluss der PID1-Defizienz auf die Gewichtszunahme der Organe während der HFD zu beobachten.



Abb. 4-21 Organgewichte von Hochfett- und Chowdiät gefütterten Mäusen nach 20 Wochen Das subkutane (subWAT) und epididymale (epiWAT) weiße Fettgewebe, das interscapulare (iBAT) und subscapulare (scBAT) braune Fett, die Leber, Nieren und das Herz der HFD gefüttertern Mäuse sind signifikant schwerer als die entsprechenden Gewebe der Kontrolltiere (chow). Muskel und Milz zeigen keinen Unterschied. Es gibt keinen Unterschied im Organgewicht zwischen Wildtyp- und PID1-/--Mäusen der gleichen Diätgruppe. (\* P<0,05). n = 10 pro Gruppe.

#### 4.5.2 Konsequenzen für den Glukosestoffwechsel und Insulinresistenz

Übergewicht ist mit erhöhten Blutzuckerwerten und Insulinresistenz assoziiert. Physiologisch zeigt sich dies darin, dass die  $\beta$ -Zellen des Pankreas zwar Insulin produzieren, das Hormon aber nicht mehr auf dessen Zielzellen in angemessener Weise wirkt. In diesem Fall spricht man zunächst von einer erniedrigten Insulinsensitivität, doch auf diese kann eine Insulinresistenz folgen. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die HFD-gefütterten Tiere eine Insulinresistenz entwickeln und ob die PID1-Defizienz einen Einfluss hierauf hat.

# 4.5.2.1 Expressions analyse von Genen des Glukosestoffwechsels in der Leber und im subkutanen Fettgewebe

Um zu untersuchen, ob der Verlust von PID1 in den Chow-und HFD-gefütterten Mäusen die Expression von Genen des Glukosestoffwechsels beeinflusst, wurden die Leber (Abb. 4-22A) und das subkutane, weiße Fettgewebe(Abb. 4-22B) der Mäuse entnommen, deren RNA isoliert und mittels quantitativer Taq Man<sup>®</sup> Realtime PCR untersucht.

Die Analyse der Leberproben zeigte (Abb. 4-22A), dass die mRNA-Menge des Insulin-Rezeptors (InsR) der HFD-gefütterten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Chow-gefütterten Tieren erhöht war. Im Gegensatz dazu war die mRNA-Expression des Transkriptionfaktors ChREBP (*charbohydrate response element binding protein*)  $\beta$  im Vergleich zu den Kontrollmäusen (chow) in den HFD-gefütterten Mäusen signifikant geringer. Dieser wird Glukose-vermittelt reguliert und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von lipogenen Genen (Iizuka et al., 2004) (Eissing et al., 2013). Weiterhin gab es auch keinen Unterschied in der Expression der mRNA des Insulin-Rezeptor-Substrat1 (Irs1), der Glukose-6-Phosphatase (G6pc) oder der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (Pck1) in der Leber. Diese beiden Enzyme sind wichtig für die Glukoneogenese und können unter anderem durch Insulin reguliert werden. Außerdem konnte kein Unterschied in der mRNA-Expression der untersuchten Gene zwischen den gleich gefüttereten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mausgruppen festgestellt werden.



Abb. 4-22 mRNA Expression von Genen des Glukosestoffwechsels in der Leber und im subkutanen, weißen Fettgewebe von Wildtyp- und PID1-/--Mäusen nach Hochfettdiät

In der Leber (A) unter HFD-Bedingungen ist der Insulinrezeptor (InsR) mehr und der Transkriptionsfaktor ChREBPß weniger exprimiert als unter Chow-Bedingungen. Im subkutanen Fett (B) ist das Insulin-Rezeptor-Substrat1 (Irs1) in mit HFD gefütterten Mäusen geringer exprimiert. PID1-/--Mäuse weisen unter Chow-Bedingungen mehr ChREBPβ-mRNA auf als die Wildtyp-Kontrolltiere (wt chow). ChREBPβ ist nach HFD in beiden Mausgruppen kaum noch nachweisbar. (\*P<0,05). n = 8 pro Gruppe Die nähere Betrachtung des subkutanen Fettgewebes (Abb. 4-22B) zeigt, dass die PID1<sup>-/-</sup> Mäuse unter Kontrollbedingungen (PID1<sup>-/-</sup>chow) insbesondere den Transkriptionsfaktor ChREBPβ signifikant stärker exprimieren als die Wildtyp-Tiere (wt chow). Hingegen kann in beiden mit HFD gefütterten Mausgruppen keine mRNA dieses Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden. Neben ChREBPβ wurde auch das Insulin-Rezeptor-Substrat1 (Irs1) im subkutanen, weißen Fettgewebe der mit HFD gefütterten Tiere in signifikant geringerer Menge exprimiert als im entsprechenden Gewebe beider Kontrolldiät-gefütterten Mausgruppen (chow). Die mRNA-Expression des Glukosetransporters Glut4 sowie die des Insulin-Rezeptors (InsR) waren im weißen Fett nicht signifikant verändert.

## 4.5.2.2 Glukosetoleranz und Insulinwerte nach kombiniertem OGFT

Es konnten bereits Unterschiede in der mRNA-Expression von Glukose-Stoffwechsel betreffenden Genen in der Leber und im weißen Fettgewebe nach HFD-Fütterung gezeigt werden. Außerdem zeigten Chow-gefütterte PID1<sup>-/-</sup>-Tiere eine höhere mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors ChREBPβ als Wildtyp-Mäuse. Daher sollte im nächsten Experiment untersucht werden, ob die PID1-Defizienz in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen zur veränderten Glukoseaufnahme aus dem Blut führt. Hierfür wurde zunächst ein oraler Glukosetoleranztest mit den Chow- und HFD-gefütterten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Tieren durchgeführt. In diesem Experiment wurde den Mäusen eine Gavage mit einer Lösung aus <sup>3</sup>H-markierter Desoxyglukose und <sup>14</sup>C-markierten Triolein verabreicht, so konnte die Aufnahme von Glukose und Lipiden in unterschiedliche Organe in PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen und Fetttoleranztest (OGFT) bezeichnet. Die Ergebnisse zur Aufnahme von Glukose und Triolein in die Organe werden in den folgenden Kapiteln dieser Arbeit gezeigt.

Um die Aufnahme der Glukose aus der Blutzirkulation zu untersuchen, wurde die Glukosekonzentration im Blut der Tiere vor und 15, 30, 60 und 120 Minuten nach der Gavage gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass die HFD-gefütterten Mäuse (~200 mg/dl) höhere Glukosekonzentration im Blut aufwiesen als die Chow-gefütterten (~150 mg/dl) Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse (Abb. 4-23A+B). In Abbildung 4-24A sind die Blut-Glukosewerte in den unterschiedlichen Mausgruppen über einen Zeitraum von zwei Stunden nach der Gavage dargestellt.



Abb. 4-23 Oraler Glukosetoleranztest und Plasmaglukosekonzentrationen in Wildtyp- und PID1-/--Mäusen unter Chow- und HFD-Bedingungen

Glukosetoleranz nach kombinierten OGFT (A) und basale Glukosekonzentration (B) in Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Chow- und HFD-Bedingungen. PID1<sup>-/-</sup>-HFD-Mäuse zeigen eine niedrigere basale Glukosekonzentration im Blut und weisen 60 Minuten nach der Gavage weniger Glukose im Blut auf als die Kontroll-Tiere (wt HFD). (\*P<0,05). n = 8 pro Gruppe (A), n = 10 pro Gruppe (B).

Die Glukosekonzentration im Blut der Chow- und HFD-Mäuse steigt 15 Minuten nach der oralen Verabreichung der Glukose-Lösung stark an. In Chow-gefütterten Mäusen konnte ein Wert von etwa 280 mg/dl Glukose detektiert werden, HFD-gefütterte Mäuse wiesen Glukosewerte um 360 mg/dl auf. Weitere 15 Minuten später (Abb. 4-23A, 30 min Zeitpunkt) konnte eine wiederum erniedrigte Glukosekonzentration (~200 mg/dl) in den Chow-gefütterten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen detektiert werden. In HFD-gefütterten Mäusen beider Gruppen konnte dies nicht festgestellt werden. Hier war die Glukosekonzentration 30 Minuten nach der Gavage genauso hoch wie schon 15 Minuten zuvor (~350 mg/dl). Im weiteren Verlauf dieses metabolischen Tests konnte festgestellt werden, dass die Glukosekonzentration im Blut der Chow-gefütterten Mäuse stetig geringer wurde. Zwei Stunden nach der Gavage wiesen diese Mäuse wieder Werte um 150 mg/dl Glukose im Blut auf, wobei es keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen gab. Im Gegensatz dazu war die Glukosekonzentration der mit HFD gefütterten PID1-/--Mäuse 60 Minuten nach der Gavage signifikant niedriger als die der Wildtyp-HFD-Mäuse. Zwei Stunden nach der Gavage war die Glukosekonzentration im Blut der HFD-Mäuse im Vergleich zum Anfangswert (0 min Zeitpunkt) noch erhöht. In Wildtyp-Tieren konnte eine Glukosekonzentration von 270 mg/dl detektiert werden, hingegen wiesen PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen einen Blut-Glukosewert von 230 mg/dl auf. Somit sind PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse durch eine verbesserte Glukosetoleranz gekennzeichnet. Abbildung 4-24B zeigt die basale Glukosekonzentration im Blut der unterschiedlichen Maus-Gruppen. Hier konnte ein höherer Glukosewert in den HFD-gefütterten Tieren im Vergleich zu den Kontrolldiät-gefütterten Mäusen detektiert werden. Dabei ließ sich interessanterweise weniger Glukose im Blut der PID1<sup>-/-</sup>-HFD-Mäuse (185 mg/dl) nachweisen als in den Wildtyp-HFD-Mäusen (210 mg/dl). Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die HFD-Tiere eine höhere basale Glukosekonzentration im Blut aufweisen (Abb. 4-23) und diese Mäuse die Glukose nach einer oralen Verabreichung, langsamer aus dem Blut aufgenommen haben als Chow-gefütterte Mäuse (Abb. 4-23A). Weiterhin wurde beobachtet, dass der Verlust von PID1 in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen unter HFD-Bedingungen zu einem niedrigeren basalen Glukosewert (Abb. 4-23B, PID1<sup>-/-</sup> HFD) und einer verbesserten Glukoseaufnahme aus dem Blut führt (Abb. 4-23A, PID1<sup>-/-</sup> HFD).

Da die Aufnahme der Glukose aus dem Plasma Insulin-vermittelt stattfindet und bereits festgestellt werden konnte, dass HFD-gefütterte PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse die Glukose schneller aus dem Blut bereinigen als Wildtyp-Mäuse, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die PID1<sup>-/-</sup>-HFD-Mäuse insulinsensitiver sind als die Wildtyp-HFD-Tiere.



Abb. 4-24 Insulintoleranz von PID1-/- - und Wildtyp-Mäusen unter Chow- und HFD-Bedingungen

Plasmaglukosekonzentrationen von PID1-/--und Wildtyp-Mäusen zum Zeitpunkt Null und 15, 30, 60 und 120 Minuten nach intraperitonealer Insulin-Injektion. Die HFD-gefütterten Mäuse zeigen zu jeden gemessenen Zeitpunkt höhere Glukosewerte, es gibt allerdings keinen Unterschied in der Insulinsensitivität zwischen den Genotypen der Mausgruppen. n = 10 pro Gruppe.

Dazu wurde ein Insulintoleranztest durchgeführt (Abb. 4-24). Bei dieser metabolischen Untersuchung wurde zunächst der basale Glukosewert im Blut zum Zeitpunkt Null bestimmt. Anschließend wurde den Mäusen Insulin intraperitoneal injiziert und die Glukosekonzentration im Blut nach 15, 30, 60 und 120 Minuten gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass beide HFD-gefütterten Mausgruppen über den gesamten Verlauf der Untersuchung einen höheren Glukosewert als die Chow-gefütterten Mäuse aufwiesen. Im Gegensatz dazu gab es jedoch keine Unterschiede in der Insulinsensitivität zwischen den PID1<sup>-/-</sup>-und den Wildtyp-Mäusen der gleichen Fütterungsgruppe.

In der nächsten Abbildung (Abb. 4-25) sind die Insulinkonzentrationen im Plasma der Mäuse dargestellt. Hierfür wurden die im oralen Glukosetoleranztest generierten Proben in einem für Insulin spezifischen ELISA untersucht. Dargestellt sind die Insulinwerte von PID1<sup>-/-</sup>-und Wildtyp-Mäusen unter Chow- und HFD-Bedingungen.



Abb. 4-25 Insulin Konzentrationen im Plasma von Chow- und HFD-gefütterten Mäusen

Plasma-Insulinkonzentrationen von PID1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen zum Zeitpunkt Null und 15 Minuten nach einer Glukosegavage. Der basale Insulinwert ist in Mäusen unter HFD-Bedingungen höher als in den Chowgefütterten Mäusen. Es gibt keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen. 15 Minuten nach der Glukosegavage ist sowohl unter Chow- als auch HFD-Bedingungen eine erniedrigte Insulinkonzentration in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen festzustellen, wobei die Werte der HFD-gefütterten Tiere beider Gruppen erhöht sind. (\*P<0,05). n = 10 pro Gruppe.

Es konnte festgestellt werden, dass die basale Insulinkonzentration im Plasma unter HFD-Bedingungen (0 min) höher ist als unter Chow-Bedingungen. Hier gab es keinen Unterschied zwischen den Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen. 15 Minuten nach der Glukosegavage stieg die Insulinkonzentration im Blut der HFD-Mäuse stark an. Interessenterweise wiesen die PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse hier unter Chow- und HFD-Bedingungen signifikant weniger Insulin im Plasma auf als die jeweiligen Kontroll-Tiere (wt). Zusammenfassend konnten die Untersuchungen zeigen, dass die PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht sensitiver auf einen direkten Insulin-Stimulus reagieren als Wildtyp-Kontrolltiere; der Verlust von PID1 in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen allerdings zu einer erniedrigten Insulin-Ausschüttung auf eine Glukose-Stimulation führt.

#### 4.5.2.3 Adiponektin Konzentrationen im Plasma

Adiponektin ist ein Hormon, das ausschließlich vom Fettgewebe gebildet wird. Es wird von den Adipozyten ins Blut sezerniert und ist in viele metabolische Prozesse wie die Glukoseregulation oder die Fettsäureoxidation involviert. Es ist bekannt, dass die Konzentration von Adiponektin im Plasma invers mit dem Körperfettgehalt in Erwachsenen korreliert (Diez and Iglesias, 2003). Im nächsten Abschnitt wurden deshalb die Plasmaproben der Mäuse die während des kombinierten OGFT's zum Zeitpunkt Null generiert wurden (Kapitel 4.5.2.2), hinsichtlich der Adiponektin-Konzentrationen mittels ELISA untersucht. In den Plasmaproben der PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter HFD-Bedingungen signifikant mehr Adiponektin nachgewiesen werden (Abb. 4-26). In den Proben der Chow-gefütterten Mäuse zeigt sich eine ähnliche Tendenz, die allerdings nicht statistisch signifikant ist.



#### Abb. 4-26 Adiponektin Konzentration im Plasma von PID1-/--und Wildtyp-Mäusen

Plasma-Adiponektin-Konzentrationen von PID1<sup>-/-</sup>-und Wildtyp-Mäusen zum Zeitpunkt Null eines OGFTs. In Chow-gefütterten Mäusen gibt es einen Trend, der in den HFD-Tieren als statistisch signifikant bestätigt wird. So weisen die PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse mehr Adiponektin im Plasma unter HFD-Bedingungen auf als die Wildtyp-Mäuse. (\*P<0,05). n = 10 pro Gruppe.

#### 4.5.2.4 Organaufnahme von radioaktiv-markierter Desoxyglukose nach OGFT

Im Folgenden wurde der Einfluss von PID1 auf die Aufnahme der Glukose zwei Stunden nach Gavage in die Organe untersucht. Die Organe wurden zur Messung der Radioaktivität vorbereitet. In der folgenden Abbildung (Abb. 4-27) ist zum einen die Aufnahme der Desoxyglukose in das ganze Organ und zum anderen die spezifische Aufnahmekapazität des jeweiligen Organs unter Kontroll (chow)- und Hochfettdiät (HFD)-Bedingungen dargestellt. Die zwei unterschiedlichen Darstellungsweisen wurden dabei verwendet, damit zum einen die Verteilung der aufgenommenen Radioaktivität innerhalb des ganzen Organismus gezeigt werden kann (Abb. 4-27A). Durch diese Art der Darstellung soll außerdem verdeutlicht werden, dass einige Organe durch ihre starke Massenzunahme in den HFD-gefütterten Mäusen, mehr Glukose in das jeweilige Organ aufnehmen. Zum anderen können, durch die Berechnung der in den Organen detektierten Radioaktivität pro Milligramm des jeweiligen Organs (Abb. 4-27B), Rückschlüsse auf die spezifische Aufnahmekapazität des Organs gezogen werden. Somit kann festgestellt werden, ob der Verlust von PID1, einen Einfluss auf die Glukoseaufnahme der einzelnen Zellen des jeweiligen Organs hat.

Die Analyse der Gesamtaufnahme in die jeweiligen Organe (Abb. 4-27A) ergab, dass die Leber, das subkutane (subWAT) sowie das epididymale (epiWAT) weiße Fettgewebe, das interscapulare (iBAT) sowie das subscapulare (scBAT) braune Fettgewebe und das Herz der HFD-gefütterten Mäuse sehr viel mehr Glukose aufnehmen als die entsprechenden Organe der Kontroll-Mäuse (chow). Außerdem konnte mehr Radioaktivität im subkutanen, weißen Fettgewebe der PID1<sup>-/-</sup>-Chow-gefütterten Mäuse sowie im subscapularen, braunen Fettgewebe und im Herzen der PID1<sup>-/-</sup>-HFD-gefütterten Tiere detektiert werden (Abb. 4-27A).

Die spezifische Aufnahme spiegelt die Kapazität des jeweiligen Organs wieder, Glukose unter den gewählten Bedingungen aufzunehmen. Es konnte festgestellt werden, dass die Leber, das interscapulare braune Fett (iBAT) und das epididymale weiße Fettgewebe (epiWAT) von Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen unter HFD-Bedingungen nicht mehr Glukose aufnehmen können als unter Chow-Bedingungen. Die nähere Betrachtung zeigte, dass der Muskel, das subkutane, weiße (subWAT) und das subscapulare, braune (scBAT)



Abb. 4-27 Aufnahme von radioaktiv-markierter Desoxyglukose in PID1-/--und Wildtyp-Mäuse Die Aufnahme von <sup>3</sup>H-markierter Desoxyglukose in das gesamte Organ (A) und die spezifische Aufnahme-Kapazität der einzelnen Organe (B) von PID1-/--und Wildtyp-Mäusen unter Chow- und HFD-Bedingungen. (\*P<0,05). n = 8 pro Gruppe.

Fettgewebe eine höhere Aufnahmekapazität in den HFD-gefütterten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen aufweist. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Muskel und das subkutane, weiße Fettgewebe der PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse unter Chow-Bedingungen (PID1<sup>-/-</sup> chow) eine höhere spezifische Aufnahme der Glukose zeigten als die entsprechenden Organe von Kontroll-Mäusen (wt chow). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass das subscapulare, braune Fettgewebe und das Herz nach HFD-Fütterung in PID1-defizienten Mäusen mehr Glukose aufnehmen als die entsprechenden Organe der Wildtyp-Mäuse.

#### 4.5.3 Auswirkungen der Hochfettdiät auf den Lipidstoffwechsel

Eine fettreiche Ernährung und das damit einhergehende Übergewicht haben oft Störungen im Lipidstoffwechsel zur Folge. Daneben haben auch genetische Veränderungen einen großen Einfluss auf die Entstehung von Erkrankungen, die mit dem Lipidmetabolismus assoziiert sind. Außerdem wird PID1 mit Übergewicht in Verbindung gebracht. So konnten Wang et al. zeigen, dass stark übergewichtige Personen eine höhere PID1 Expression im Fettgewebe aufweisen als Normalgewichtige (Wang et al., 2006). Im Folgenden sollte untersucht werden welchen Einfluss die Hochfettdiät auf den Lipidstoffwechsel von Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen hat.

#### 4.5.3.1 Plasmalipide und Lipoproteinprofile

Erhöhte Cholesterolwerte im Blut erhöhen das Risiko kardiovaskuläre für Herzerkrankungen und hohe Triglyzerid-Konzentrationen sind mit Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes assoziiert (Cuchel and Rader, 2006) (Despres, 1993). Insulin fördert zum einen die Aufnahme von Triglyzeriden aus dem Blut und hemmt gleichzeitig die Lipolyse dieser im Fettgewebe. Da in den vorangegangenen Kapiteln beobachtet wurde, dass die Aufnahme von Glukose in PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gesteigert war, gleichzeitig aber die Insulin-Konzentrationen im Blut niedriger, sollte untersucht werden, ob der Verlust von PID1 in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen eine Einfluss auf den Gehalt von Cholesterol und Triglyzeriden im Blut hat.

In Abbildung 4-29 sind die Cholesterin- (Abb. 4-28A) und Triglyzerid-Konzentrationen (Abb. 4-28B) im Plasma von HFD-gefütterten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Chow-gefütterten Mäusen dargestellt. Bei dieser Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die HFD-gefütterten Tiere signifikant höhere Cholesterol- (~200 md/dl HFD statt ~100 mg/dl Chow) und signifikant niedrigere Triglyzerid-Konzentrationen (~70 md/dl HFD statt 110 mg/dl Wildtyp-Chow) im Plasma aufweisen als die Chow-gefütterten Mäuse beider Gruppen. Die PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen signifikant weniger Triglyzeride im Plasma (70 mg/dl) als die Wildtyp-Mäuse (110 mg/dl) nach Chow-Fütterung.



Abb. 4-28 Cholesterol- und Triglyzerid-Konzentrationen im Plasma von Chow- und HFDgefütterten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen

HFD-gefütterte Tiere weisen im Vergleich zu Chow-gefütterten Tieren einen signifikant erhöhten Plasma-Cholesterolgehalt (A) und signifikant niedrigere Triglyzerid-Konzentrationen (B) in Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen auf. Chow-gefütterte PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen signifikant niedrigere Triglyzerid-Konzentrationen im Plasma auf als Chow-gefütterte Wildtyp-Tiere. (\*P<0,05). n = 8 pro Gruppe.

Da Cholesterol und Triglyzeride im Plasma über Lipoproteine transportiert werden, sollte im Folgenden untersucht werden, in welcher Lipoproteinklasse die im Plasma gefundenen Lipide enthalten sind und ob der Verlust von PID1 einen Einfluss auf diese Verteilung hat. Hierfür wurden zunächst die Plasmen von jeweils acht PID1<sup>-/-</sup>- bzw. Wildtyp-Mäusen beider Fütterungsgruppen vereint und die unterschiedlichen Lipoproteine mittels Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) von einander getrennt. In der folgenden Abbildung (Abb. 4-29) sind die Triglyzerid (A)- und Cholesterol (B)-Konzentration der einzelnen, von der FPLC eluierten Fraktionen der Plasmen von Chow- und HFDgefütterten PID1<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen dargestellt. Die Untersuchung zeigte, dass die HFD-gefütterten Mäuse weniger Triglyzeride in den TRL-Fraktionen (Fraktion 4-6) aufweisen als die Chow-gefütterten Mäuse. Außerdem konnte festgestellt werden, dass Chow-gefütterte PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse (PID1<sup>-/-</sup>, chow) weniger Triglyzeride (4,6 mg/dl), die in TRL enthalten sind, aufweisen als die entsprechenden Wildtyp-Kontroll-Tiere (wt, chow; 6,5 mg/dl). Dies geht mit dem erniedrigten Gesamt-TG-Gehalt im Plasma der PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse nach Chow-Fütterung einher (Abb. 4-28). Die Cholesterol-Konzentration im Plasma von HFD-gefütterten Mäusen ist im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht (Abb. 4-28). Bei der Analyse der Verteilung des Plasma-Cholesterols zwischen den

Lipoproteinen (Abb. 4-29B), zeigte sich diese stark erhöhte Cholesterol-Konzentrationen ebenfalls.



Abb. 4-29 Plasma Lipoproteinprofil nach FPLC von Wildtyp- und PID1-/--Mäusen

Triglyzerid (A)- und Cholesterol (B)- Konzentrationen in den mittels FPLC voneinander getrennten Lipoproteinklassen im Plasma von Chow- und HFD-gefütterten Wildtyp- und PID1-/--Mäusen. HFD-gefütterte Tiere weisen im Vergleich zu Chow-gefütterten Tieren einen niedrigeren Triglyzeridgehalt (A) in den TRL und eine höhere Cholesterol-Konzentration (B) in den HDL und *Remnant* (HDL/LDL)-Fraktionen in Wildtyp- und PID1-/--Mäusen auf. Chow-gefütterte PID1-/--Mäuse weisen niedrigere Triglyzerid-Konzentrationen in der TRL-Fraktion auf als entsprechend gefütterte Wildtyp-Tiere. n = 8 pro Gruppe.

Hier war in erster Linie in den HDL-Fraktionen ein deutlicher Anstieg des Cholesterols festzustellen. HFD-gefütterte Wildtyp-Mäuse wiesen einen Cholesterol-Wert von 13,9 mg/dl in der Spitzenfraktion (Fraktion 19) der HDL auf; die PID<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine Konzentration von 12,7 mg/dl in dieser Fraktion. Interessanterweise zeigte sich eine leichte Verschiebung der des HDL-Cholesterols in den HFD-gefütterten PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen. In den Chow-gefütterten Mäusen, die Cholesterol-Konzentrationen von 5,3 mg/dl (wt) und 5,6 mg/dl (PID1<sup>-/-</sup>) aufwiesen, konnte diese Verschiebung im Zeitpunkt der Elution der HDL-Fraktionen von der FPLC-Säule nicht beobachtet werden. In den HFDgefütterten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen ist zusätzlich zu der HDL auch eine starke Erhöhung des Cholesterolgehalts in den *Remnant*-Fraktionen (HDL/LDL) von Wildtypund PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen zu erkennen. Dieser zusätzlich detektierte Anstieg war in den Chowgefütterten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Tieren nicht festzustellen. Außerdem konnten geringe Cholesterol-Konzentrationen in den TRL der Chow-gefütterten Tiere beobachtet werden, die in den HFD-gefütterten Mäusen nicht vorhanden waren. Im Zusammenhang mit dem Verlust an PID1 konnte festgestellt werden, dass Chow-gefütterte PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse weniger Triglyzeride im Plasma aufweisen als entsprechende Wildtyp-Mäuse. Die Reduktion spiegelt sich im niedrigeren Trigyzeridgehalt der TRL im FPLC-Profil wieder.

# 4.5.3.2 Expressions analyse von Genen des Lipidstoffwechsels in der Leber und im subkutanem Fett

Um zu untersuchen, ob der Verlust von PID1 in den Chow-und HFD-gefütterten Mäusen die Expression von Genen des Lipidtoffwechsels beeinflusst, wurden die Leber (Abb. 4-30A) und das subkutane, weiße Fettgewebe (Abb. 4-30B) der Mäuse entnommen, deren RNA isoliert und mittels quantitativer Taq Man<sup>®</sup> Realtime PCR untersucht.

Die Analyse der Leberproben sowie die des weißen Fettgewebes zeigte, dass die mRNA-Menge von PID1 in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen in beiden Geweben reduziert war. In HFDgefütterten Mäusen war die mRNA des LDL-Rezeptors (LDL-R) in beiden Geweben sehr viel stärker exprimiert als in Chow-gefütterten Tieren. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die mRNA von LRP1 und die der Lipoproteinlipase (Lpl) nur im subkutanen, weißen Fettgewebe, jedoch nicht in der Leber von HFD-gefütterten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen hochreguliert war. Die ApoE-mRNA-Menge war hingegen in der Leber von HFDgefütterten Tieren erhöht. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse unter Chow-Bedingungen in beiden untersuchten Geweben eine höhere Lpl-mRNA-Expression aufwiesen als die Wildtyp-Kontroll-Mäuse. Die erhöhte Expression der LDL-R-mRNA deutet darauf hin, dass die Überexpression dieses Rezeptors einen möglichen Verlust oder eine Fehlfunktion von LRP1 in der Aufnahme von ApoEenthaltenen Lipoproteinen kompensieren muss.



Abb. 4-30 mRNA Expression von Genen des Lipidstoffwechsels in der Leber und im subkutanen, weißem Fettgewebe von Wildtyp und PID1-/--Mäusen nach Hochfettdiät

Die mRNA-Expression von PID1 ist in der Leber und im subkutanen, weißen Fettgewebe (subWAT) von PID1-/--Mäusen nach Chow- und HFD-Fütterung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen reduziert. Die mRNA-Menge des LDL-R ist in HFD-gefütterten Mäusen in Leber und subWAT höher als in den Chow-gefütterten Tieren beider Mausgruppen. LRP1 und die Lpl zeigen im subWAT eine erhöhte mRNA-Expression unter HFD-Bedingungen in PID1-/--und Wildtyp-Mäusen. Die Expression der Lpl-mRNA ist in Chow-gefütterten PID1-/--Mäusen in beiden Geweben stärker als in den Chow-gefütterten Wildtyp-Mäusen. Die mRNA-Menge des ApoE ist in der Leber der Wildtyp-Tiere nach HFD-Fütterung höher. (\*P<0,05). n = 8 pro Gruppe.

#### 4.5.3.3 Organaufnahme von radioaktiv-markiertem Triolein nach OGFT

Um den Einfluss von PID1 auf die Aufnahme der Lipide in die Organe näher zu untersuchen, wurden die im kombinierten OGFT aufgenommene Radioaktivität in den Organen der Mäuse gemessen. Hierbei handelt es sich um die Gewebeproben, die in 4.5.2.4 in Bezug auf die Glukoseaufnahme untersucht wurden. Da diese Mäuse mit einer kombinierten Lösung aus <sup>3</sup>H-Desoxyglukose und <sup>14</sup>C-Triolein gavagiert wurden, konnte zusätzlich zur Radioaktivität der Glukose die des aufgenommenen Trioleins in den Organproben der PID1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäuse gemessen werden. Auch ist hier zum einen die Aufnahme in die gesamten Organe der Chow- und HFD-gefütterten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse dargestellt (Abb. 4-31A); zum anderen wird die spezifische Kapazität der Organe in Bezug auf die <sup>14</sup>C-Triolein-Aufnahme gezeigt (Abb. 4-31B).

Die Analyse der Gesamtaufnahme in die jeweiligen Organe (Abb. 4-31A) ergab, dass die Leber der PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse unter HFD-Bedingungen mehr Lipide aufnimmt als die Leber der Wildtyp-Tiere unter den gleichen Bedingungen. Die Leber nahm in den PID1<sup>-/-</sup>-Tieren mehr Lipide nach HFD- als nach Chow-Fütterung auf. In den Wildtyp-Tieren ist dies nicht festzustellen. Im subkutanen (subWAT) und epididymalen (epiWAT) weißen Fett ist in den HFD-gefütterten Tieren mehr Radioaktivität zu detektieren als in den entsprechenden Kontroll-Organen (chow) beider Mausgruppen.



Abb. 4-31 Aufnahme von radioaktiv-markiertem Triolein in PID1-/-und Wildtyp-Mäuse Die Aufnahme von <sup>14</sup>C-markiertem Triolein in das gesamte Organ (A) und die spezifische Aufnahme-Kapazität der einzelnen Organe (B) von PID1-/-und Wildtyp-Mäusen unter Chow- und HFD-Bedingungen. (\*P<0,05). n = 8 pro Gruppe.

Daneben weisen die Chow-gefütterten PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse eine erhöhte Triolein-Aufnahme ins subkutane, weiße Fett auf (PID1<sup>-/-</sup> chow, subWAT). Im interscapularen, braunen
Fettgewebe (iBAT) ist kein Unterschied zwischen die Mausgruppen nach Chow- oder HFD-Fütterung festzustellen. Hingegen ist im subscapularen, braunen Fettgewebe von HFD-gefütterten PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen (PID1<sup>-/-</sup> HFD, scBAT)) mehr Triolein zu detektieren als in dem entsprechenden Kontroll-Organ (wt HFD, scBAT), insgesamt weisen die HFD-Tiere aber eine niedrigere Aufnahme der Radioaktivität in subscapulare, braune Fettgewebe im Vergleich zu Chow-gefütterten Tieren auf. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass HFD-gefütterte PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse mehr radioaktive Lipide ins Herz aufnehmen als Chow-gefütterte PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse. Dieser Unterschied war in den Wildtyp-Tieren nicht zu detektieren. Muskel und Milz der Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse nehmen unter Chow- als auch HFD-Fütterung kaum Lipide auf.

Die spezifische Kapazität der Leber, des interscapularen (iBAT) sowie des subscapularen (scBAT), braunen Fettgewebes war in den HFD-gefütterten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Tieren stark verringert (Abb. 4-31B). Dabei konnte festgestellt werden, dass das subscapulare, braune Fett der PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse nach HFD-Fütterung (Abb. 4-31, PID1<sup>-/-</sup> HFD, scBAT) eine höhere Kapazität in Bezug auf die Aufnahme von Lipiden aufweist als das der Wildtyp-Tiere (Abb. 4-31, wt HFD, scBAT). Die spezifische Aufnahme von Triolein in das subkutane, weiße Fettgewebe der Chow-gefütterten PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse ist höher als die in das entsprechende Wildtyp-Gewebe. Die Aufnahmekapazität des Herzens, des Muskels und die der Milz wiesen weder zwischen den beiden Diäten Unterschiede auf, noch hatte der Verlust von PID1 in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen einen Einfluß in Bezug auf die Lipidaufnahme von diesen Geweben. Zusammenfassend konnte mit diesen metabolischen Studien gezeigt werden, dass PID1 unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen die Aufnahme von Glukose und Lipide in einer Organ-spezifischen Weise beeinflusst.

# 5. Diskussion

LRP1 ist in der Lage bis zu 40 unterschiedliche Liganden zu binden und spielt eine wichtige Rolle bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose extrazellulärer Moleküle. übernimmt LRP1 essentielle Daneben Aufgaben bei verschiedenen Signaltransduktionwegen. Die unterschiedlichsten Funktionen dieses Rezeptors werden durch eine Vielzahl von Adaptorproteinen gewährleistet. Diese Proteine binden an spezielle Motive in der intrazellulären Domäne von LRP1 und koppeln den Rezeptor an weitere, für den jeweiligen Weg entsprechende, Moleküle. Eines dieser Adaptorproteine ist PID1. Caratù et al. konnten dieses Protein 2007 in einem Screeningprojekt als Interaktionspartner von LRP1 identifizieren. In der vorliegenden Arbeit sollte nun die physiologische Rolle des PID1 für die Funktion von LRP1 in der Rezeptor-vermittelten Endozytose näher untersucht werden.

### 5.1 Rolle des PID1 für die Lokalisation von LRP1 in der Zelle

LRP1 ist im Lipoproteinmetabolismus zusammen mit dem LDL-R an der Aufnahme von Lipoproteinen in die Leber beteiligt. Der LDL-R wird als reiner Endozytose-Rezeptor beschrieben, der an der Plasmamembran zu finden ist (Goldstein and Brown, 1974). Für die Endozytose der LDL über den LDL-R wurde das LDL-Rezeptor-assoziierte Adaptorprotein ARH gefunden (Zuliani et al., 1999). Dieses Protein vermittelt die Interaktion zwischen dem Rezeptor und der Clathrinmaschinerie. Es bindet dabei zum einen Clathrin selbst, zum anderen interagiert ARH mit dem Clathrinadaptor AP-2. ARH reguliert somit die Endozytose des LDL-R an der Plasmamembran (Mishra et al., 2002b). Mutationen im Gen des ARH führen zur autosomalen rezessiven Form der Hypercholesterolämie (Garcia et al., 2001).

PID1 wurde in einem Proteom-Screeningansatz als Interaktionspartner von LRP1 gefunden (Caratù et al., 2007). Interessanterweise ist die Sequenz dieses Adaptorproteins der des ARHs sehr ähnlich. PID1 weist, genau wie ARH, eine PTB-Domäne auf, mit der es in der Lage ist, an Tyrosin-enthaltende Motive zu binden. Diese Motive sind meist NPxY-Motive. Es konnte gezeigt werden, dass PID1 an das nicht phosphorylierte distale NPxY-Motiv der intrazellulären Domäne des LRP1 bindet. Diese Interaktion ist spezifisch für

LRP1, da PID1 nicht mit dem LDL-R interagiert (Doktorarbeit Britta Hoffzimmer). Die Ähnlichkeit zwischen den beiden Adaptorproteinen PID1 und ARH und der gefundene Zusammenhang von PID1 und Übergewicht (Wang et al., 2006) führten zu der Frage, ob PID1 möglicherweise an der Endozytose des LRP1 in der Leber beteiligt ist. PID1 könnte dabei möglicherweise die gleiche Endozytose-regulierende Aufgabe übernehmen, die ARH beim LDL-R erfüllt (Cohen et al., 2003) (Norman et al., 1999). Diese Annahme wird unter anderem auch dadurch unterstützt, dass das Adaptorprotein Dab-2 dahingehend beschrieben wurde, an der Endozytose von LRP1 beteiligt zu sein (Maurer and Cooper, 2005), es aber in der Leber nicht exprimiert wird (EMBL Expression Atlas). Da für PID1 in der Leber eine hohe Expression vorliegt (Abb. 4-14), könnte PID1 in diesem Gewebe die Aufgabe von Dab-2 übernehmen.

Interessanterweise ist LRP1 im *Steady State* in intrazellulären, perinukleären Strukturen und nicht an der Plasmamembran zu finden (Abb. 4-1). Laatsch et al. beschreiben, dass der Rezeptor in der postprandialen Phase auf einen Insulin-Stimulus in Heptaozyten an die Plasmamembran transportiert wird (Laatsch et al., 2009). Die Immunfluoreszenzanalyse mit Antikörpern gegen LRP1 und PID1 (Abb. 4-1B) zeigt, dass PID1 in denselben perinukleären Kompartimenten lokalisiert ist wie LRP1. Diese Beobachtung konnte durch eine gleichzeitige Überexpression von LRP1-eGFP und PID1-RFP in HuH7-Zellen bestätigt werden (Abb. 4-2). Auch in diesem Experiment waren beide Proteine in denselben perinukleären Kompartimenten zu finden. Andere publizierte Studien zur Interaktion der beiden Proteine, in denen PID1 durch *Yeast two Hyrid* und *Pulldown*-Experimente als Bindungspartner von LRP1 identifiziert wurde (Caratù et al., 2007) (Kajiwara et al., 2010), unterstützen die gefundene Kolokalisation zwischen endogenem LRP1 und PID1 sowie der überxprimierten Proteine.

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass PID1 essentiell für die perinukleäre Lokalisation von LRP1 ist. Der *Knockdown* von PID1 mittels siRNA in primären Hepatozyten bewirkte 36 Stunden nach der Behandlung der Zellen eine um 90 % verringerte Expression der PID1 mRNA (Abb. 4-3). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse dieser Zellen zeigte, dass LRP1 in Abwesenheit von PID1 nicht mehr in perinukleären Kompartimenten lokalisiert. Hier ist LRP1 fast ausschließlich an der Plasmamembran der Hepatozyten konzentriert und findet sich zusätzlich in wenigen diffus in den Zellen verteilten vesikulären Strukturen (Abb. 3-1B). Diese Umverteilung von LRP1 in Abwesenheit von PID1 kann einen Einfluss

auf die Endozytose von ApoE-enthaltenen Lipoproteinen mittels LRP1 haben. So wird das Recycling von ApoE im Lipoproteinstoffwechsel über LRP1 vermittelt (Laatsch et al., 2012). In seiner Funktion als endozytierender Rezeptor wird LRP1 nach der Internalisierung nicht wie viele seiner Liganden in den Lysosomen abgebaut (Harasaki et al., 2005). Durch die Erniedrigung des pH-Wertes in den frühen Endosomen dissoziiert der Ligand vom LRP1 und durchläuft den weiteren endosomalen Weg bis zur Degradation in den Lysosomen. LRP1 hingegen wird recycelt (Lillis et al., 2008). Der Rezeptor wird in speziellen Endosomen verwahrt bis er für die nächste Endozytoserunde benötigt wird. Dieser perinukleäre Pool ist ein frühes, endosomales Kompartiment (Laatsch et al., 2012). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LRP1 in HuH7 Zellen in den für den frühen Endosomenmarker EEA1 positiven Endosomen vorliegt (Abb. 4-4). Zum einen wurde endogenes LRP1 in der Kolokalisation mit EEA1 gefunden, zum anderen lokalisiert auch das überexprimierte LRP1-eGFP in diesen frühen Endosomen (Abb. 4-5). Zusätzlich zu LRP1 wurde auch die Anwesenheit von überexprimiertem PID1-RFP in diesen frühen Endosomen bestätigt (Abb. 4-5). Weiterhin zeigte sich, dass der Knockdown von PID1 in HuH7-Zellen dazu führt, dass die Lokalisation dieser LRP1-"Pools" verändert vorliegt. In PID1-defizienten HuH7-Zellen ist LRP1 nicht mehr in perinukleären Bereichen zu finden (Abb. 4-4). In diesen Zellen liegt LRP1 diffus in der Zelle in vesikulären Strukturen verteilt vor. Die HuH7-Zellen zeigen die gleiche veränderte LRP1-Verteilung wie die primären Hepatozyten nach PID1-Knockdown (Abb. 4-3). Interessant ist, dass LRP1 in den PID1kd-HuH7-Zellen weiterhin in frühen Endosomen vorliegt (Abb. 4-4, PID1kd). Diese Beobachtungen sprechen für eine mögliche Funktion von PID1 in der Retention von LRP1 in diesen endosomalen Kompartimenten, so dass eine mögliche direkte Rolle von PID1 bei der LRP1-vermittelten Endozytose an der Plasmamembran unwahrscheinlich scheint.

Bei der Untersuchung von LRP1 und dem lysosomalen Markerprotein LAMP1, konnte wie erwartet festgestellt werden, dass es hier keine Kolokalisation gibt (Abb. 4-6, wt). Da LRP1 nach der Internalisierung für die Wiederverwendung recycelt wird (Dieckmann et al., 2010), gelangt es nicht zur Degradation in die Lysosomen. Sehr interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die Verteilung der Lysosomen in den PID1-defizienten Zellen von der Wildtyp-Situation abweicht (Abb. 4-6, PID1*kd*). Die Lysosomen sind wie die frühen Endosomen diffus in der Zelle verteilt (Abb. 4-6, PID1*kd*, LAMP1). Außerdem konnte festgestellt werden, dass LRP1 in Abwesenheit von PID1 teilweise mit LAMP1 kolokalisiert (Abb. 4-6, PID1*kd*, merge). Diese Kolokalisation weist daraufhin, dass LRP1enthaltene Vesikel aufgrund dessen veränderter Sortierung mit Lysosomen fusionieren. Diese Beobachtungen zeigen, dass die PID1-vermittelte Lokalisierung von LRP1 in den EEA1-positiven, perinukleären Kompartimenten, den Rezeptor vor der lysosomalen Degradation schützt. Wird der Rezeptor abgebaut, statt recycelt, steht er nicht für eine nächste Endozytoserunde zur Verfügung. Durch die fehlerhafte Lokalisation und Degradation des Rezeptors in der Zelle, könnte es zu einer veränderten Aufnahme von Liganden kommen. Dazu beschreiben Gordts et al., dass eine gestörte Translokation von LRP1 zu Verbesserung der Dyslipidämie und Atherosklerose in ApoE-defizienten Mäusen kommt (Gordts et al., 2012). PID1 spielt somit eine wichtige Rolle in der Lokalisation des Rezeptors und scheint über die Bedeutung von LRP1 in der Entstehung von Erkrankungen involviert zu sein, die mit der Endozytose von Lipoproteinen einhergehen.

Um herauszufinden, wie es zu der beobachteten Translokation des LRP1 von perinukleären, endosomalen Kompartimenten zur Plasmamembran kommt, wurden Proteine des Retromer-Komplexes untersucht (4.2.2.4). Das Retromer ist im retrograden Transport von Proteinen von Endosomen zurück zum Golgi entdeckt worden (Cereghino et al., 1995). Mittlerweile wird dieser heteropentamere Proteinkomplex auch im Transport von Proteinen zwischen endosomalen Strukturen und der Plasmamembran beschrieben. Dabei wurde vor allem der Rücktransport von Transmembranrezeptoren nach der Internalisierung untersucht. Bei diesen Untersuchungen rückte SNX27, ein Adaptorprotein aus der Sortin Nexin-Proteinfamilie, immer mehr in den Fokus (Temkin et al., 2011). Dieses Protein ist nicht direkt ein Mitglied des Retromers, wird aber assoziiert an endosomalen Kompartimenten im Zusammenhang mit dem Retromer gefunden und spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Nährstoff-Homöostase (Steinberg et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass LRP1 mit dem Retromer-Komplex assoziiert (4.2.2.4). Die nähere Betrachtung zeigte, dass Vps35 und SNX1, zwei Kernmitglieder dieses Komplexes, in der indirekten Immunfluoreszenz mit LRP1 kolokalisieren (Abb. 4-8 und Abb. 4-9). Auffällig ist hier, dass auch das Retromer eine veränderte Verteilung in den PID1-defizienten Zellen aufwies (Abb. 4-8, PID1kd, Vps35; Abb. 4-9 PID1kd, SNX1). In PID1kd-HuH7-Zellen kolokalisieren LRP1 und Vps35 bzw. SNX1 genau wie in Wildtyp (wt)-HuH7-Zellen in endosomalen Kompartimenten. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass der Retromer-Komplex die LRP1 Translokation in Abwesenheit von PID1 vermittelt. Die Untersuchung des SNX27 zeigte,

dass dieses Protein teilweise mit LRP1 in Wildtyp und PID1-defizienten Zellen kolokalisiert (Abb. 4-10). Das wiederum deutet auf eine Beteiligung von SNX27 an der Translokation von LRP1 zur Plasmamembran hin. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass SNX27 mit NPxY-Motiven interagiert (Ghai et al., 2013). LRP1 trägt zwei dieser Motive in seiner intrazellulären Domäne (ICD). In diesem Zusammenhang wurde außerdem beschrieben, dass SNX17 als Interaktionspartner von LRP1 im Transport des Rezeptors von endsomalen Kompartimenten zur Plasmamembran involviert ist. Dabei bindet SNX17 an das proximale NPxY-Motiv des LRP1. Dieses Motiv ist aber nicht essentiell für die richtige basolaterale Sortierung des Rezeptors durch SNX17. Farfán et al. konnten zeigen, dass Aminosäuren, die an dieses NPxY-Motiv angrenzen entscheidend für die Sortierung sind (Farfán et al., 2013). Auch Burden et al. beschreiben die benachbarten Aminosäuren des NPxY-Motivs des LDL-Rezeptors als essentiell für die Interaktion des LDL-R mit SNX17 (Burden et al., 2004). In dieser Studie koppelten sie unter anderem Megalin /LRP2 mit der intrazellulären Domäne des LRP1. Megalin wird normalerweise an die apikale Oberfläche von polarisierten Zellen sortiert (Marzolo et al., 2003) (Stockinger et al., 2002). Dieser Rezeptor trägt insgesamt drei NPxY-Motive. Diese tragen bei diesem Rezeptor aber nicht dazu bei, ihn an die basolaterale Membran zu transportieren. Erst der Austausch der intrazellulären Domäne des Megalins mit der des LRP1 führte zu einer basaolateralen Sortierung (Burden et al., 2004).

Die verschiedenen endosomalen Kompartimente der Zelle werden über das Zytoskelett in der Zelle gerichtet transportiert (Anitei and Hoflack, 2012). Die Beobachtung der veränderten Lokalisation der frühen Endosomen (Abb. 4-4), der Lysosomen (Abb. 4-6) und des Retromers (Abb. 4-8, Abb. 4-9, Abb. 4-10) ließ vermuten, dass es durch die Abwesenheit von PID1 eventuell zu einer Umstrukturierung des gesamten Cytoskeletts kommt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von  $\alpha$ -Tubulin zeigte, dass das Cytoskelett in den PID1*kd*-HuH7-Zellen nicht von der Wildtypsituation abweicht (Abb. 4-11). Auch die Analyse des Golgis durch die Dektektion des *cis*-Golgi-Markerproteins GM130 (Abb. 4) und des *trans*-Golgi-Markers Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Abb. 4-7), zeigte in den PID1-defizienten HuH7-Zellen keinen Unterschied zur Lokalisation in den Wildtyp-HuH7-Zellen. Da das Cytoskelett und der Golgi-Apparat keine Veränderungen in PID1-defizienten Zellen aufweisen, müssen andere Mechanismen für die Translokation der Organellen nach dem Verlust von PID1 werantwortlich sein. Eine Möglichkeit an dieser Stelle wäre eine Interaktion von PID1 mit Motorproteinen oder mit wiederum anderen Adaptorproteinen, die mit Motorproteinen interagieren. Motorproteine sind die treibende Kraft hinter dem Transport von Vesikeln im Zytoplasma. Kinesine bewegen ihre Fracht entlang der Mikrotubuli des Zytoskeletts in Richtung Plasmamembran, Dyneine hingegen sind für den retrograden Transport über die Mikrotubuli, also in Richtung Zellinneres, verantwortlich (Mallik and Gross, 2004; Schroer, 2004). Möglicherweise konkurrieren die molekularen Motoren oder Proteine die mit diesen assoziiert sind mit PID1 um die Bindung und können beim Verlust von PID1 in der Zelle, ihrer Aufgabe im Transport über die Mikrotubuli gerecht werden. Bei diesem Mechanismus scheint auch der Retromerkomplex eine wichtige Rolle inne zu haben, da er ständig mit den LRP1-positiven, endosomalen Kompartimenten assoziiert ist (4.2.2.4). Der Einfluss des Retromers auf die Translokation von LRP1 wird im nächsten Abschnitt eingehender diskutiert.

### 5.2 Der Retromerkomplex ist an der Translokation von LRP1 beteiligt

In Bezug auf die Translokation von LRP1 konnte gezeigt werden, dass vermutlich das Retromer in diesen Mechanismus involviert ist. Vps29 ist als das kleinste Protein im Komplex für die Interaktion der drei Vps-Proteine zuständig (Seaman, 2012). Der Knockdown dieses Retromerproteins verhindert die Assoziation der fünf Kernproteine des Komplexes. Durch die nicht mehr gewährleistete Interaktion der Vps-Proteine können auch die SNX-Proteine nicht mehr mit Vps35 interagieren (Harrison et al., 2014). Das SNX-Dimer bindet über seine PX-Domänen an PtdIns3P, die vorwiegend in endosomalen Membranen vorkommen (Cozier et al., 2002) (Yu and Lemmon, 2001). Der Komplex wird somit nicht mehr an den Endosomen gehalten und die Proteine dissoziieren. Dies hat zur Folge, dass der Retromer-Komplex seine Aufgabe im retrograden Transport von Transmembranproteinen nicht mehr erfüllen kann (Kang et al., 2012). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LRP1 in PID1kd-HuH7-Zellen nicht mehr in perinukleären Endosomen vorliegt sondern an die Plasmamembran transloziert. Zellen, in denen zusätzlich Vps29 siRNA-vermittelt herunter reguliert war, wiesen die Wildtyp-typische Lokalisation auf (Abb. 4-12, Pfeile). Die Dissoziation der Retromer-Komplex-Proteine konnte in diesen Zellen durch die Detektion von Vps35 gezeigt werden. In den Vps29knockdown-Zellen (Abb. 4-12, merge Pfeil 2) ist im Vergleich zu nicht mit Vps29siRNA-transfizierten Zellen (Abb. 4-12, merge Pfeil 1) sehr viel weniger Vps35 zu detektieren. Diese Beobachtungen zeigen, dass LRP1 nicht an die Plasmamembran transportiert wird, wenn der Retromerkomplex nicht assoziiert ist. Dies wiederum bestätigt die Annahme, dass das Retromer für die LRP1-Translokation verantwortlich ist. Um dies endgültig bestätigen zu können, sollten auf jeden Fall noch GST-*Pulldown*-Experimente durchgeführt werden. Dabei sollte sich zeigen, dass LRP1 nach *Knockdown* des Vps29 in PID1-defizienten Zellen nicht mehr mit dem Retromerprotein Vps35, das die Liganden-Bindung vermittelt, interagiert. In diesem Zusammenhang konnten Steinberg et al. zeigen, dass Proteine, die in der gesunden Zellen an die Plasmamembran sortiert werden, nach Verlust des Retromerkomplexes nicht mehr dort zu finden sind (Steinberg et al., 2013). In dieser Studie verwendeten die Autoren SNX27- und Vps35-defiziente Zellen und konnten feststellen, dass der Glukosetransporter Glut1 oder auch der PDGF-Rezeptor, nicht mehr an die Plasmamembran transportiert werden können.

## 5.3 Die PID1-LRP1-Interaktion gewährleistet die postprandiale Translokation von LRP1

Wie in dieser Arbeit gezeigt und in anderen Studien schon beschrieben (Perrot et al., 2012) (Laatsch et al., 2012), ist LRP1 im Normalzustand der Zelle (*steady state*) in intrazellulären, endosomalen "Vorratspools" vorhanden. Damit der Rezeptor seine Aufgabe bei der Aufnahme von triglyzeridreichen Lipoproteinen erfüllen kann, wird er in polarisierten Zellen wie Hepatozyten an die basolaterale Membran transportiert (Donoso et al., 2009). In der postprandialen Phase führt ein extrazellulärer Stimulus, wie die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor, zur LRP1-Translokation an die Plasmamembran der Zellen (Laatsch et al., 2009). Dieser Mechanismus wird durch viele verschiedene Proteine aufrechterhalten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Adaptorprotein PID1 dabei eine wichtige Funktion in der Lokalisation von LRP1 in den perinukleären Kompartimenten inne hat.

Um die physiologische Rolle von PID1 für die LRP1-Funktion im Lipoproteinstoffwechsel genauer zu untersuchen, wurde eine PID1-*Knockont*-Maus generiert. Der Vorteil eines Mausmodells ist, dass Auswirkungen der entsprechenden Protein-Defizienzen auf den gesamten Metabolismus untersucht werden können. *In vivo* Modelle sind somit viel realitätsnäher als Zellkultursysteme, in denen hauptsächlich Zelllinien zum Einsatz kommen, die aus Tumorzellen generiert wurden. Neben Zelllinien werden oft auch primäre Zellen für viele Untersuchungen genutzt. Primäre Zellen stellen ein *in vitro* Modell dar, in dem viele Zell-Mechanismen sehr viel ähnlicher zur *in vivo*-Situation ablaufen als in Zelllinien. Außerdem haben primäre Zellen, so wie die hier verwendeten primären

Hepatozyten, einen Vorteil zu Untersuchungen im ganzen Tier. In diesen Zellen können unter anderem Signalwege, die durch einen Stimulus aktiviert oder unterdrückt werden besser studiert werden als im Organismus. Dabei wird der zu untersuchende Zelltyp nicht von Signalen, die im Gewebeverband von anderen Zellen ausgesandt werden, beeinflusst. So kann zum Beispiel der Mechanismus, der hinter der in dieser Arbeit gefundenen Translokation von LRP1 in PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten steht, besser auf Zellebene untersucht werden. Um allerdings die Konsequenzen des PID1-Verlusts auf Stoffwechselebene zu ermitteln, ist es wichtig, dies in einem Mausmodell zu untersuchen. Für die PID1-Knockout-Maus wurde das Knockout first-Modell der Firma KOMP Repository genutzt. Die Analyse der Knockout-Effizienz dieses Modells zeigte auf mRNA- (Abb. 4-14A) und Proteinebene (Abb. 4-15), dass die Expression des PID1 zwar stark herunter reguliert, trotzdem aber ein sehr geringer Teil des PID1 in den homozygoten Knockout-Mäusen zu detektieren war. Auch KOMP Repository beschreibt diese Beobachtung für ihr Modell. Es ist so konstruiert, dass durch alternatives Spleißen noch ein Exon transkribiert und translatiert werden kann. Um das Protein vollkommen "auszuschalten" werden die Mäuse in weiteren noch folgenden Kreuzungen mit Flipper-Deleter- und Cre-Rekombinase-exprimierenden Tieren verpaart. Das Knockout first-Modell ist so konstruiert, dass die von diesen Tieren exprimierten Enzyme dann das gesamte PID1-Gen herausschneiden. Die Analyse der mRNA-Expression von PID1 zeigte, dass PID1 in Organen wie der Leber oder den Fettgeweben genau wie LRP1 vermehrt exprimiert wird und die Expression der mRNA in Geweben wie der Niere oder der Milz, reduziert war, in denen auch LRP1 wenig exprimiert wurde (Abb. 4-14). Dieser gefundene Zusammenhang ist ein weiterer Hinweis darauf, dass PID1 eine Rolle bei der Funktion oder der Regulierung von LRP1 spielt.

Trotz der geringen mRNA-Expression wurden die PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse für weitere Experimente herangezogen. Dabei war es wichtig zu untersuchen, inwieweit die detektierte noch wenig vorhandene PID1-mRNA zu einer Expression des Proteins führt und ob diese einen Einfluss auf die Expression von LRP1 hat. Die Westernblotanalyse zeigte, dass LRP1 in PID1<sup>-/-</sup>-Lebergeweben etwas weniger vorhanden war als in den entsprechenden Fraktionen der Wildtyp-Lebergewebe (Abb. 4-15A). Da die Expression der mRNA von LRP1 in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht beeinflusst war (Abb. 4-14B), lässt diese Beobachtung auf eine stärkere Degradation von LRP1 in den PID1<sup>-/-</sup>-Tieren schließen. In PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten (Abb. 4-3) und PID1*kd*-HuH7-Zellen (Abb. 4-4 bis Abb. 4-7) konnte eine verstärkte Translokation von LRP1 von intrazellulären Kompartimenten an die Oberfläche der Zellen

festgestellt werden. Es ist beschrieben, dass LRP1 neben seiner Funktion bei der Endozytose von Proteasen und Protease:Inhibitor-Komplexen, selbst von extrazellulär lokalisierten Matrix-Metalloproteasen proteolytisch prozessiert werden kann (Selvais et al., 2011). Weiterhin beschreiben Zurhove et al., dass eine y-Secretase an der Intramembran-Proteolyse von LRP1 beteiligt ist, wodurch die intrazelluläre LRP1-Domäne in den Zellkern wandern und dort als Transkriptionsfaktor arbeiten kann (Zurhove et al., 2008). Das vermehrte Vorhandensein von LRP1 an der Plasmamembran in den PID1-defizienten Zellen könnte dazu führen, dass die Gesamtprotein-Konzentration, durch eine vermehrte Prozessierung der extrazellulären und Transmembrandomäne von LRP1 durch Proteasen, reduziert wird. Außerdem lässt die, in PID1kd-HuH7-Zellen festgestellte Lokalisation von LRP1 in Lysosmen (Abb. 4-6) darauf schließen, dass der Abbau des Rezeptors durch den Verlust von PID1 verstärkt wird. Auch dies kann zur Erniedrigung der Gesamtprotein-Menge führen. Eine Studie, die PID1 als wachstumsinhibierenden Faktor bei der Entwicklung von embryonalen Gehirntumoren beschreibt, unterstützt diese Annahme (Erdreich-Epstein et al., 2013). Die Autoren konnten bei der Untersuchung dieser Tumore feststellen, dass Tumore, die eine höhere PID1-Expression aufweisen, langsamer wachsen als Tumore mit geringerer PID1-Expression. Im Zusammenhang mit LRP1 könnte PID1, durch seine Funktion in der Retention von LRP1 in den perinukleären Kompartimenten, dazu beitragen, dass weniger LRP1 an die Plasmamembran gelangt. In Bezug auf die Rolle von LRP1 bei der Migration und Proliferation (Boucher et al., 2002), könnte eine Signaltransduktion durch LRP1 dabei entscheidend vermehrte sein. In den Lebergewebepräparation konnte ferner festgestellt werden, dass der LDL-R in den PID1<sup>-/-</sup>-Lebergeweben stärker exprimiert wird als in den Lebern von Wildytyp-Mäusen (Abb. 4-15B). Diese Beobachtung kann auf eine kompensatorische Hochregulierung des LDL-R aufgrund von LRP1-Funktionsverlusten zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass der LDL-R die Aufgabe einer gestörten Internalisierung von TRL-Remnants über LRP1 teilweise ausgleichen kann (Rohlmann et al., 1998) (Schneider et al., 1981).

Damit die TRL-Remnants in der postprandialen Phase in die Hepatozyten aufgenommen werden können, muss LRP1 an die Plasmamembran translozieren. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass diese LRP1-Translokation in Wildtyp-Hepatozyten auf einen Insulin-Stimulus abläuft (Abb. 4-16). 15 Minuten nach der Behandlung der Zellen befindet sich LRP1 fast ausschließlich an der Plasmamembran. Es wurde also von perinukleären, endosomalen Kompartimenten in unbehandelten Zellen (Abb. 4-16, wt-Insulin) an die Plasmamembran der Zellen transportiert (Abb. 4-16, wt+Insulin). Dieses Verhalten ist auch für andere Zellen wie Adipozyten beschrieben (Descamps et al., 1993). In PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten liegt LRP1 bereits im nicht stimulierten Zustand (Abb. 4-16, PID1<sup>-/-</sup>-Insulin) völlig anders verteilt in den Hepatozyten vor als in den entsprechenden Kontrollzellen (Abb. 4-16, wt-Insulin). In diesen Zellen ist die Lokalisation von LRP1 in perinukleären Bereichen durch die PID1-Defizienz nicht mehr gegeben. LRP1 ist diffus in der Zelle verteilt und vermehrt an der Plasmamembran zu detektieren. Interessanterweise hat die

verteilt und vermehrt an der Plasmamembran zu detektieren. Interessanterweise hat die Stimulation mit Insulin in diesen Zellen keinen Einfluss auf die LRP1-Lokalisation (Abb. 4-16, PID1<sup>-/-</sup>+Insulin). Hier liegt LRP1 genauso diffus in der Zelle verteilt vor, wie in nicht stimulierten Hepatozyten. Diese Beobachtungen bestätigen, dass PID1 eine wichtige Rolle für die Lokalisation und für die Stimulus-vermittelte Translokation des Rezeptors spielt. In diesem Zusammenhang konnten andere Studien zeigen, dass PID1 möglicherweise als Regulator in der Insulin-stimulierten Signalkaskade involviert ist, die zur Translokation des Glukosetransporters Glut4 an die Plasmamembran führt (Wu et al., 2011; Zeng et al., 2012; Zhang et al., 2008).

Die durchgeführten Aufnahme-Experimente mit primären Hepatozyten bestätigen eine erhöhte Lokalisation von LRP1 an der Plasmamembran (Abb. 4-17 & Abb. 4-18). PID1-/--Hepatozyten nehmen zum einen mehr radioaktiv-markierte TRL-Remnants auf als die Wildtyp-Kontrollzellen (Abb. 4-17). Zum anderen weisen sie auch eine erhöhte Internalisierung von Fluoreszenz-markierten (DiD) TRL-Remnants auf (Abb. 4-18). Diese Beobachtungen sprechen für eine höhere LRP1-Dichte an der Plasmamembran im nicht stimulierten Zustand. Das heißt, durch die höhere LRP1-Konzentration an der Membran, können die Zellen die TRL-Remnants schneller internalisieren. In den PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten werden die TRL-Remnants direkt über LRP1 internalisiert, ohne dass dieser Rezeptor zuerst aus intrazellulären Pools an die Membran transportiert werden muss. Diese Beobachtung deckt sich auch mit anderen publizierten Arbeiten. So beschreiben Zeng et al. in Abwesenheit von PID1 eine erhöhte Aufnahme von Glukose in C2C12-Myozyten (Zeng et al., 2012). Möglicherweise übernimmt PID1 auch in diesen Zellen eine ähnliche Aufgabe in der Retention der so genannten Insulin-responsiven Vesikel (IRVs), in denen Glut4 "gelagert" wird, um im Falle der Insulin-Stimulation schnell an die Oberfläche der Zelle transportiert zu werden.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass die Degradation der aufgenommenen TRL-Remnants in den PID1-/--Hepatozyten im Vergleich zu Wildtyp-Hepatozyten verändert war (Abb. 4-19). Diese PID1-/-Hepatozyten wiesen nach vier Stunden signifikant weniger Degradationsprodukte im Kulturmedium auf als die Wildtyp-Kontrollzellen. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass die PID1-defizienten Zellen mehr TRL aufnehmen als die Kontrollzellen (Abb. 4-17) weisen auf einen gestörten endosomalen Transport der Liganden hin. Zu Beginn des Experiments wurden die verwendeten TRL radioaktiv mit <sup>125</sup>Iod markiert. Bei der dafür verwendeten Methode nach McFarlane (McFarlane, 1958) werden die in den Lipoproteinen enthaltenen Proteine an Tyrosinresten markiert. Heeren et al. konnten dabei zeigen, dass hauptsächlich die Tyrosin-Reste von ApoE, ApoC's und wenig ApoB der Lipoproteine iodiert werden (Heeren et al., 2002). Die Abbauprodukte der Zelle, die in Abbildung 4-18, dargestellt wurden, stellen die Menge an <sup>125</sup>I-Tyrosin dar, die von den Zellen sekretiert wurden. Dabei wurden die über LRP1 aufgenommenen TRL zunächst internalisiert. In endosomalen Kompartimenten dissoziieren LRP1 und TRL dann voneinander. Dabei konnten Heeren und Kollegen zeigen, dass einige Bestandteile der TRL, wie ApoE oder die Lpl, nach der Endozytose mittels LRP1, recycelt werden (Heeren et al., 1999) (Heeren et al., 2001) (Heeren et al., 2006). Andere Komponenten wie die ApoBs gelangen zu den Lysosomen. Dort werden die Proteine mittels lysosomaler Hydrolasen abgebaut und die daraus entstehenden Degradationsprodukte können im Medium detektiert werden.

Die vermehrte LRP1 Konzentration an der Plasmamembran führt somit zu einer erhöhten Aufnahme von ApoE-enthaltenen TRL und möglicherweise gleichzeitig zu einem verbesserten Recycling von ApoE, welche einen Großteil der Radioaktivität trägt. Somit gelangen weniger markierte Proteine in PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten zu den Lysosomen, wodurch letztendlich auch weniger <sup>125</sup>I-Tyrosine im Medium detektiert werden können. ApoE enthaltene TRL werden außer mittels LRP1 auch über den LDL-R endozytiert (Mortimer et al., 1995) (Willnow et al., 1994a). In Wildtyp-Hepatozyten könnten durch das, im Vergleich zu PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten, geringere Vorhandensein von LRP1 an der Plasmamembran somit mehr ApoE-haltige TRL vom LDL-Rezeptor internalisiert werden. In diesem Zusammenhang konnten Jensen et al. zeigen, dass eine Überexpression des LDL-R dazu führt, dass ApoE vollständig degradiert und nicht mehr recycelt wird (Jensen et al., 1994). Somit würden PID1<sup>-/-</sup>-Hepatozyten, da sie LRP1 direkt an der Membran lokalisiert haben, weniger <sup>125</sup>I-markiertes ApoE degradieren als Wildtyp-Hepatozyten, was

### 5.4 Die Rolle von PID1 bei Diät-induziertem Übergewicht

Adipositas steht im engen Zusammenhang mit Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen (Despres and Lemieux, 2006). Diese gelten als weltweite Todesursache Nummer eins. Daher ist es wichtig, die Mechanismen, die zu diesen Erkrankungen führen, zu untersuchen und zu verstehen. In der Entstehung von Übergewicht spielt die Ernährung und somit die Aufnahme von Lipiden in den Organismus eine grundlegende Rolle. Lipoproteinrezeptoren, wie der LDL-R und LRP1 sind für die Aufnahme von Lipiden, die über Lipoproteine durch das Blut transportiert werden, in die Leber und periphere Organe notwendig (Beisiegel et al., 1989; Goldstein and Brown, 2009) (Heeren and Beisiegel, 2001). Sind die Mechanismen, durch die diese Rezeptoren reguliert werden, gestört, kommt es zu schweren Erkrankungen. Mutationen im Gen von ARH, dem LDL-R assoziiertem Adaptorprotein, führen zu einem Erliegen der Endozytose von LDL über den LDL-Rezeptor. Dies hat eine autosomal rezessive Form der Hypercholesterolämie, welche wiederum zu koronalen Herzerkrankungen führen kann zur Folge (Mishra et al., 2002b) (Cohen et al., 2003). In dieser Arbeit wurde die physiologische Rolle des Adaptorproteins PID1 für die Funktion des LRP1 untersucht. LRP1 ist für die Endozytose von TRL-Remnants in die Leber verantwortlich. TRL-Remnants entstehen in der postprandialen Phase bei der Hydrolyse der in Chylomikronen enthaltenen Triglyzeride durch die Lpl (Wang and Eckel, 2009).

Im Zusammenhang mit Adipositas konnte festgestellt werden, dass PID1 im weißen Fettgewebe von übergewichtigen Patienten stärker exprimiert wird als bei Normalgewichtigen (Wang et al., 2006). Um den Einfluss von PID1 in Bezug auf die Funktion von LRP1 bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose im Organismus von adipösen Mäusen zu untersuchen, wurden Wildtyp und PID1-/--Mäuse mit einer Hochfettdiät gefüttert. Nach einem Fütterungszeitraum von 20 Wochen wurden die Mäuse genauer analysiert. Zunächst konnte gezeigt werden, dass der Verlust von PID1 die Entstehung von Übergewicht nicht beeinflusst. PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse nehmen über die Dauer der Studie genau wie die Wildtyp-Mäuse stetig zu. Nach 20 Wochen sind sie, genau wie die Wildtyp-Mäuse, etwa doppelt so schwer wie zu Beginn der Studie (Abb. 4-20). Diese Gewichtszunahme spiegelte sich in den Organen der Mäuse wieder. Vor allem die Leber und weiße Fettdepots speicherten sehr viele Lipide. Diese Organe sind in den HFD-Mäusen etwa 2,5 bis fünf Mal so schwer wie die entsprechenden Gewebe von Kontrolldiätgefütterten Mäusen. Auch das braune Fettgewebe zeigt nach HFD-Fütterung große Mengen an eingelagerten Lipiden. Es konnte kein Unterschied im Gewicht der Organe zwischen den PID1<sup>-/-</sup> und den Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (Abb. 4-21). Der Verlust von PID1 und die damit verbundene verstärke Lokalisation von LRP1 an der Plasmamembran der Zellen (Kapitel 4.2), hat keinen Einfluss auf langfristige Aufnahme und Speicherung von Lipiden in den entsprechenden Organen. Allerdings ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass bei der Analyse der Lipidstoffwechsel-assoziierten Gene festgestellt werden konnte, dass PID1 in HFD-gefütterten Wildtyp-Mäusen stärker exprimiert wird als in Chow-gefütterten Mäusen. Diese Beobachtung deckt sich mit der Studie von Wang et al., die PID1 als einen neuen Adipositas-assoziierten Faktor beschreiben.

#### 5.4.1 Die PID1-Defizienz verbessert die Insulinsensitivität der HFD-Mäuse

Insulinresistenz und der damit einhergehende Typ 2 Diabetes sind eine Folge des Diätinduzierten Übergewichts. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust von PID1 mit einer verbesserten Glukosetoleranz in HFD-gefütterten PID1-/--Mäusen einhergeht (Abb. 4-23). Es konnte festgestellt werden, dass HFD-gefütterte Wildtyp- und PID1-/--Mäuse basal mehr Glukose im Plasma aufweisen. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Glukose nach einer Gavage langsamer aus dem Blut in die Organe aufgenommen wurde als in Chow-gefütterten Tieren (Abb. 4-23). Es ist bekannt, dass übergewichtige Patienten höhere Blutzuckerwerte aufweisen als Normalgewichtige und dass dies, zusammen mit vermehrt auftretenem, abdominalen Fett und erhöhten ApoB-Konzentrationen im Blut ein Hinweis auf eine entstehende Hypercholesterolämie ist (Panagiotakos et al., 2008). Die erhöhte Glukosekonzentration aufgrund dessen reduzierter Aufnahme aus dem Blut, ist auf eine mögliche Insulinresistenz zurückzuführen, wobei Zielgewebe, wie das Fettgewebe weniger sensitiv auf den Glukose-vermittelten Insulin-Stimulus reagieren. Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor führt zur Translokation von Glut4 an die Plasmamembran, wodurch es zur schnellen Aufnahme der Glukose in die Adipozyten kommt (Muretta and Mastick, 2009). Im gesunden Tier sinkt

der Blutzuckerspiegel somit in Abhängigkeit von der Insulin-Sekretion wieder auf den Anfangswert. In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass PID1-defiziente, HFD-gefütterte Mäuse die Glukose schneller aus dem Blut bereinigten als entsprechende Wildtyp-Mäuse (Abb. 4-23A). Weiterhin zeigten die adipösen PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse einer niedrigere basale Glukosekonzentration im Blut als die Wildtyp-Mäuse (Abb. 4-23B). Dies deutet darauf hin, dass der Verlust von PID1 vor einer Übergewichts-induzierten Insulinresistenz schützt. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die PID1-/- Mäuse weniger Insulin auf die Glukosegabe ausschütten als Wildtyp-Mäuse (Abb. 4-25). Unter basalen Bedingungen zeigte sich eine erhöhte Insulinkonzentration in den HFD-gefütterten Tieren (Abb. 4-25, 0 min Zeitpunkt, vergleiche chow mit HFD). Die Plasma-Insulin-Konzentration stieg in HFD-Mäusen nach der Glukosegavage stark an, was auf die Insulinresistenz der übergewichtigen Mäuse hindeutet. Die HFD-Mäuse benötigen im Vergleich zu den Chow-gefütterten Tieren höhere Insulin-Mengen, um die Glukose aus dem Plasma effizient in die Zellen aufzunehmen (Abb. 4-25, 15 min Zeitpunkt, vergleiche HFD und chow). Unter HFD-Bedingungen waren die PID1<sup>-/-</sup>-Tiere insulinsensitiver als die Wildtyp-Mäuse, da sie weniger Insulin ausschütteten, um die Glukose aus dem Plasma zu beseitigen (Abb. 4-25, 15 min Zeitpunkt, vergleiche PID1-/- HFD mit wt HFD). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass der Insulintoleranztest keine Unterschiede zwischen HFD-gefütterten Wildtyp- und PID1-/--Mäusen aufwies (Abb. 4-24, vergleiche PID1-/-HFD mit wt HFD). Bei diesem metabolischen Test wird den Mäusen Insulin intraperitoneal injiziert. Durch die anschließende Bestimmung der Plasmaglukose-Konzentration wird ermittelt, ob die Sensitivität der Zellen auf den Insulin Stimulus verändert ist. Da die PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse in dieser Untersuchung keine Veränderung in der Glukoseaufnahme zeigten, muss davon ausgegangen werden, dass die Zellen der peripheren Organe nicht sensitiver auf Insulin reagieren. Vielmehr könnte die Insulinausschüttung der 
ß-Zellen betroffen sein. Diese Zellen exprimieren den Insulinunabhängigen Glukosetransporter 2 (Glut2). Glut2 befindet sich an der Plasmamembran und schleust Glukose in die Zelle (Leturque et al., 2009). Demnach strömt viel Glukose in die B-Zelle, wenn die extrazelluläre Glukosekonzentration hoch ist. Dies ist nach der Nahrungsaufnahme oder in insulinresistenten Patienten der Fall. In den B-Zellen der Langerhan'schen Inseln des Pankreas ist die Glukokinase der bestimmende Faktor für die Insulinausschüttung (Grupe et al., 1995) (Matschinsky, 2002). Dieses Enzym phosphoryliert die Glukose zu Glukose-6-Phosphat, was über weitere Reaktionen zur

111

Erhöhung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels führt. Dieser Konzentrationsanstieg bewirkt eine vermehrte Verschmelzung von Insulinvesikeln mit der Plasmamembran und führt zur Ausschüttung von Insulin in die Blutbahn.

Im Falle einer PID1-Defizienz kommt es in der postprandialen Phase zu einer verbesserten Glukoseaufnahme unter geringerer Insulinausschüttung in PID1-/--Mäusen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass Wildtyp- und HFD-gefütterte PID1-/--Mäuse auf einen Insulin-Stimulus, der ihnen durch eine Insulininjektion verabreicht wurde, nicht mehr Glukose aus dem Blut aufnehmen, als Wildtyp-Mäuse. Die PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse reagieren somit also nicht sensitiver auf den Insulinstimulus an sich in Bezug auf die Glukoseaufnahme mittels Glut4. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt (Kapitel 4.2.1), kommt es in PID1defizienten Zellen zu einer erhöhten Lokalisation von LRP1 an der Plasmamembran. Weiterhin ist bekannt, das LRP1 zu großem Maße in Glut4-Vesikeln enthalten ist (Bogan, 2012). Der Verlust von PID1 führt wahrscheinlich zu einer höheren Glut4-Dichte an der Plasmamembran von Zellen, in denen Glut4 normalerweise Insulin-abhängig an die Membran transportiert wird. Zu diesen Zellen sind hauptsächlich Adipozyten und Myozyten, also Zellen die Glukose nicht selbst herstellen, zu zählen. Aufgrund der höheren Konzentration des Glukosetransporters in der Plasmamembran, kommt es zu einer verbesserten basalen Glukoseaufnahme. Dies hat zur Folge, dass die Glukosekonzentration im Plasma in der postprandialen Phase (nach Glukosegavage) niedriger ist als in Wildtyp-Mäusen (Abb. 4-23B). Die abgesenkte Plasma-Glukose-Konzentration führt dann wiederum dazu, dass weniger Glukose über Glut2 in die  $\beta$ -Zellen geschleust wird, was zu einer weniger starken Insulinausschüttung in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen führt (Abb. 4-25). Außerdem konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass PID1<sup>-/-</sup>-3T3-L1-Adipozyten eine erhöhte Glukoseaufnahme aufweisen (Zhang et al., 2010), dies unterstützt die in der vorliegenden Arbeit in PID1-defizienten Mäusen gefundene erhöhte Aufnahme von Glukose. Wie genau es zu der Erhöhung von Glut4 an der Plasmamembran in PID1defizienten Mäusen kommt, kann durch tierexperimentell anspruchsvollen euglykämischen Clamp-Studien untersucht werden. Die verbesserte Glukoseaufnahme kann allerdings nur durch Effekte auf Proteinexpression bzw. Lokalisation erklärt werden, da die Genexpression von Glut4, dem Insulin-Rezeptor oder des Insulinrezeptorsubstrats-1 (IRS-1) in PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht verändert ist (Abb. 4-22). Das einzige untersuchte Gen des Glukosestoffwechsels, das eine veränderte Expression aufwies, war der Transkriptiosfaktor ChREBPB. In PID1-defizienten Mäusen der Kontrolldiätgruppe, war eine 3,5-fach höhere

mRNA Expression des Transkriptionsfaktors im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu detektieren. ChREBPB wird Glukose-vermittelt aktiviert und die Hochregulation dieses Faktors in PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen unterstützt die hier gefundene verbesserte Glukoseaufnahme. Neue Studien bringen fettgewebespezifisch-exprimiertes ChREBPB unter anderem in Verbindung mit der Regulation der Insulinsensitivität und der Glukosehomöostase in übergewichtigen und Typ 2 Diabetes Patienten (Eissing et al., 2013). Dieser Transkriptionsfaktor wird in gesunden normalgewichtigen Personen stärker exprimiert als in Übergewichtigen. Er wird somit als neuer Therapieansatz diskutiert (Herman et al., 2012). Im Zusammenhang mit einem "gesünderen" Fettgewebe, ist noch zu erwähnen, dass die PID1-defizienten Mäuse eine höhere Adiponektin Plasma-Konzentration aufweisen (Abb. 4-26). Adiponektin ist ein Adipozyten-spezifisches Hormon. Es wird beschrieben, dass eine erhöhte Speicherung von Lipiden im Fettgewebe zu einer erniedrigten Adiponektin-Sekretion führt. Adiponektin ist somit invers mit Adipositas verknüpft (Diez and Iglesias, 2003). Die erniedrigte Plasmakonzentration dieses Hormons ist als Merkmal der Adipositas bei übergewichtigen Patienten mit Typ 2 Diabetes weit verbreitet (Van Gaal et al., 2006) (Despres and Lemieux, 2006).

In einer Linie mit der verbesserten Glukoseaufnahme aus dem Plasma gehen auch die Aufnahmeexperimente mit radioaktiv-markierter Desoxyglukose. In PID1-/--Mäusen war in den Organen, die die Insulin-abhängige Glut4-Translokation vermitteln, eine erhöhte Aufnahme von Glukose festzustellen (Abb. 4-27). Dabei zeigte sich diese verbesserte Glukoseaufnahme besonders bei der spezifischen Aufnahmekapazität des jeweiligen Organs (Abb. 4-27B). Bei der Betrachtung der Verteilung der aufgenommenen Glukose zwischen den Organen wurde deutlich, dass die Leber und die Fettgewebe einen großen Teil der applizierten Glukose internalisieren. Diese Beobachtung wurde in der Analyse der HFD-Mäuse noch deutlicher. Die Leber nimmt unter diesen Bedingungen aufgrund ihrer enormen Vergrößerung sehr viel Glukose auf, hingegen ist die Kapazität der Leber, Glukose aufzunehmen, in den HFD-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-gefütterten Mäusen nicht verändert. Das subkutane, weiße Fettgewebe dagegen zeigt eine verminderte Aufnahmekapazität unter HFD-Bedingungen. Der Grund dafür ist die durch die Hochfettdiät induzierte Adipositas. Unter diesen Bedingungen sind die Mäuse insulinresistent, entsprechend findet eine reduzierte Translokation des Glut4 im Vergleich zu den Chow-gefütterten Tieren an die Plasmamembran statt. Allerdings führt die

genetische Deletion von PID1 zu einer Verbesserung der durch Insulinresistenz vermittelten, abgeschwächten Glukoseaufnahme (Abb. 4-23; Abb. 4-27).

#### 5.4.2 Die Rolle von PID1 im Lipidstoffwechsel

Der Lipidstoffwechsel spielt eine große Rolle in der Entstehung von Diät-induziertem Übergewicht und Typ 2 Diabetes. In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Konzentration von Triglyzeriden im Plasma in PID1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen, die mit einer Hochfettdiät gefüttert wurden, niedriger war als in Mäusen, die mit einer Kontrolldiät gefüttert wurden. Unter HFD-Bedingungen nehmen die Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse mehr Triglyzeride in das weiße Fettgewebe auf (Abb. 4-31A), so dass die Konzentration an Triglyzeriden anders als beim Menschen im Plasma sinkt.

der Analyse von Lipidstoffwechsel-assoziierten Genen der in dieser Arbeit Bei untersuchten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse, konnte festgestellt werden, dass die Expression der Lpl im subkutanen, weißen Fettgewebe von HFD-gefütterten Mäusen hochreguliert war (Abb. 4-30B), was zur erhöhten Triglyzerid-Aufnahme aus dem Plasma der HFDgefütterten Mäuse führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PID1-/--Mäuse niedrigere Triglyzeridwerte im Plasma unter Chow-Bedingungen aufweisen als Wildtyp-Mäuse. Der Grund dafür scheint die erhöhte Plasmamembrandichte von LRP1 insbesondere in Hepatozyten zu sein. Dieser Rezeptor ist an der Endozytose von triglyzeridreichen Lipoproteinen in die Leber verantwortlich. Für diese Aufgabe wird LRP1 normalerweise Insulin-vermittelt an die Membran transportiert (Laatsch et al., 2009). Im Falle der PID1-Defizienz ist per se mehr LRP1 an der Plasmamembran zu detektieren, so dass es zu einer erhöhten basalen Aufnahme von TRL-Remnants kommt. In diesem Zusammenhang wurde außerdem beschrieben, dass Insulin die mRNA Expression der Lpl stimulieren kann (Semenkovich et al., 1989). Dadurch lässt sich die erhöhte Lpl-Expression in den HFD-Mäusen erklären. Diese übergewichtigen Mäuse weisen signifikant höhere Insulinkonzentrationen im Plasma auf als Kontroll-Mäuse (Abb. 4-25). Allerdings zeigen die PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse unter Kontrollbedingungen eine stärke Lpl-Expression bei gleichzeitig geringeren Plasmainsulinkonzentration. Eine erhöhte Expression dieses Enyzms kann mit einer verbesserten Hydrolyse und somit einer gesteigerten Aufnahme von Fettsäuren ins Fettgewebe verbunden sein. Die gesteigerte Expression von Lpl in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Kontrollbedingungen (Abb. 4-30) unterstützt die Beobachtung der verminderten Triglyzeride in diesen Mäusen (Abb. 4-28B). Wahrscheinlich zeigen diese Mäuse auch eine verbesserte ApoC-II zu ApoC-III Ratio. In diesem Zusammenhang wird beschrieben, dass die Expression von ApoC-III, ein starker Inhibitor der Lpl, unter HFD-Bedingungen im Darm reduziert ist (Petit et al., 2007). ApoC-II, ein starker Aktivator der Lpl, wird unter diesen Bedingungen vermehrt exprimiert ist. Das Verhältnis von ApoC-II zu ApoC-III in Chylomikronen, welches durch das Interstitium vermittelt wird, korreliert mit der Aufnahme dieser Lipoproteine aus dem Blut. Eine hohe ApoC-II zu ApoC-III-Ratio verringert die postprandiale Triglyzeridämie in übergewichtigen Mäusen (Petit et al., 2007). Vor diesem Hintergrund sollte in zukünftigen Experimenten näher auf *liver-X receptor* (LXR)-regulierte Gene in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen eingegangen werden, da LXR unter anderem die Expression von ApoC-II aktiviert (Mak et al., 2002). Außerdem sollten der reverse Cholesteroltransport (RCT) und die Expression der damit verbunden ABC-Transporter sowie die Synthese von Gallensäuren und die Ausscheidung von Cholesterol über die Fäzes untersucht werden, da LRP1-Polymorphismen in GWAS (*Genome Wide Association Study*)-Studien nicht nur mit Triglyzerid, sondern auch mit HDL-Cholesterol-Werten korrelieren.

Daneben konnte in der mittels FPLC von einander getrennten Lipoproteine der Chowund HFD-gefütterten Wildtyp- und PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse festgestellt werden, dass die Mäuse unter HFD-Bedingungen sehr viel mehr HDL-Cholesterol aufweisen als die Kontrolldiätgefütterten Tiere (Abb. 4-29). Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass die Cholesterol-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors LXR in den HFDgefütterten Mäusen zur verstärkten Expression von ABCA1 führt. Diese Hochregulation führt zur verbesserten Übertragung von Cholesterol auf ApoA1 (Cuchel and Rader, 2006), was wiederum zur die Erhöhung von HDL zur Folge hat. Die HDL fungiert dann als Akzeptor für durch ABCG1 übertragenes Cholesterol. Interessant in diesem Hinblick ist, dass das in der HDL-Fraktion enthaltene Cholesterol der HFD-gefütterten PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse etwas später von der FPLC-Säule eluiert als das der HFD-gefütterten Wildtyp-Mäuse. Dies lässt darauf schließen, dass die HDL-Partikel der PID1-defizienten Mäuse kleiner sind als die der Wildtyp-Mäuse. Kleineren und dichteren HDL-Partikeln wird anti-atherogene Bedeutung zugesprochen, da die Partikel eine verbesserte Cholesterol-Efflux-Kapazität aufweisen und LDL vor atherogenem oxidativen Stress schützen (Kontush and Chapman, 2006). Somit scheint der Verlust von PID1 das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen in den adipösen PID1-/--Mäusen aufgrund von kleineren, protektiven HDL-Partikeln im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Mäusen zu verringern.

Die Lipoproteinprofil-Analyse unterstützt außerdem die Annahme, dass die beobachtete Translokation von LRP1 in PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 4-16 PID1<sup>-/-</sup>-Insulin) zu einer verbesserten TRL-Aufnahme führt. Kontrolldiät-gefütterte PID1<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen geringe Triglyzeridkonzentrationen in der TRL-Fraktion auf als die entsprechenden Wildtyp-Mäuse (Abb. 4-29, vergleiche PID1<sup>-/-</sup> chow und wt chow). Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass eine Korrelation zwischen PID1/LRP1 Expression und den Lipoproteinprofilen dargestellt wurde.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Expression des LDL-R in der Leber und im subkutanen Fettgewebe der HFD-gefütterten Mäuse signifikant hochreguliert war (Abb. 4-30). Die Expression des Rezeptors wird über intrazellulär verfügbares Cholesterol reguliert. In cholesterolreichen Zeiten wird SREBP über Scap und INSIG im ER gehalten und die Expression des LDL-Rezeptors wird herunterreguliert. Ist nun ein Cholesterolmangel in der Zelle vorhanden, wird SREBP vom ER zum Golgi transportiert und dort von zwei Proteasen (S1P und S2P) proteolytisch gespalten. Daraus entsteht ein N-terminales Fragment des SREBP, welches zum Zellkern transloziert und dort Gene, wie das des LDL-R durch die Bindung an SRE aktiviert. Die erhöhte Expression des LDL-Rezeptors in den HFD- Mäusen deutet auf eine niedrige intrazelluläre Cholesterolkonzentration im ER hin. Um dies zu bestätigen müsste in weiteren Experimenten der Cholesterolgehalt der jeweiligen Organe bzw. der ER-Membranen bestimmt werden. Weiterhin sollte die Lipidzusammensetzung der Lipid Droplets, in denen die Lipide unter Hochfettdiät-Bedingungen in den Zellen gespeichert werden, analysiert werden. Dies würde dazu beitragen, die medizinsch bedeutsame inverse Regulation der LRP1 und LDL-R Expression besser zu verstehen.

Die Hochfettdiät und die damit einhergehende Insulinresistenz führen zu einer erhöhten Insulin-Ausschüttung. Die ständige Konfrontation der Zellen mit Insulin hat zur Folge, dass die Expression von Insulin-induzierbaren Genen verstärkt wird, was wiederum zur verstärkten Expression des LDL-R führt. In diesem Zusammenhang beschreiben Wade et al. eine Insulin-vermittelte Aktivitätssteigerung des LDL-R in HepG2-Zellen trotz erhöhter LDL-Konzentrationen im Kulturmedium (Wade et al., 1988).

Neben dem LDL-R war auch die LRP1-mRNA in den Hochfettdiät-gefütterten Tieren signifikant stärker exprimiert (Abb. 4-30). Diese Beobachtung geht mit anderen Studien einher. So beschreiben Masson et al., dass die LRP1 Expression in übergewichtigen Mäusen und auch adipösen Patienten hochreguliert ist (Masson et al., 2009). LRP1 spielt neben seiner Aufgabe als Endozytose-vermittelnder Rezeptor eine wichtige Rolle in vielen Signaltransduktionsprozessen. LRP1 selbst kann von extrazellulären Metalloproteinasen und Enzymen wie der γ-Sekretase, die in der Plasmamembran aktiv ist, prozessiert werden. Durch diese proteolytischen Spaltungen entsteht eine kleine intrazelluläre Domäne des LRP1, die zum Zellkern transportiert wird und dort an der Regulation von Genen beteiligt ist (Zurhove et al., 2008). Der Verlust von LRP1 in Adipozyten führt zur verminderten Expression von Adipozytenmarkern wie dem Transkriptionsfaktor PPARγ, der Hormonsensitiven Lipase (HSL) oder dem Adipozyten-spezifischen Fettsäurebindeprotein (aP2) (Masson et al., 2009). Es ist bekannt, dass PPARγ die Adipozytendifferentation initiiert (He et al., 2003). Somit kommt es bei einer Adipozyten-spezifischen LRP1-defizienz zur verminderten Adipogenese. In PID1-defizienten Mäusen konnte keine veränderte Fettgewebsmasse detektiert werden, so dass PID1 vermutlich bei der Adipogenese eine untergeordnete Rolle spielt.

Allerdings nehmen PID1-defiziente Mäuse unter Kontrollbedingungen signifikant mehr radioaktiv-markierte Lipide in Form von Triolein ins weiße Fettgewebe auf. PID1-/--Mäusen könnte die vermehrte Lokalisation von LRP1 an der Plasmamembran zur einer gesteigerten proteolytischen Prozessierung des Rezeptors führen. Die Freisetzung und Translokation des C-terminalen LRP1-ICD-Fragments in den Zellkern scheint dann Gene der Adipogenese zu aktivieren. Die darin involvierten Faktoren, PPARy, HSL oder auch aP2 führen wiederum zu einer erhöhten Differenzierung der Präadipozyten. Da kein Unterschied im Gesamtgewicht des Fettgewebes zwischen PID1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen festzustellen war, müssten die PID1-defizienten Mäuse mehr kleine Adipozyten aufweisen als die Kontroll-Tiere. Dies hätte dann wiederum eine größere Oberfläche der Zellen zur Folge, an der mehr LRP1 lokalisiert ist. In diesem Zusammenhang beschreibt eine Studie, dass die Insulin-vermittelte Translokation von LRP1 an der Aufnahme von ApoEenthaltenen triglyzeridreichen Lipoprotein Remnants in Adipozyten beteiligt ist. Die dadurch erhöhte LRP1-Konzentration an der Plasmamembran führt zu einer gesteigerten Endozytoserate. Die endozytotische Internalisierung von Triglyzeriden und Cholesterylestern von Chylomikronen-Remnants war in postprandialen Adipozyten erhöht. Zusammen mit der Insulin-vermittelten LRP1-Stimulierung wirkt dabei auch die Aktivität der Lipoproteinlipase (Descamps et al., 1993). Diese Studien unterstützen die in PID1-/-- Mäusen gefundene erhöhte TRL-Aufnahme (Abb. 4-17, Abb. 4-31), die aufgrund der höheren LRP1-Plasmamembrandichte in PID1-defizienten Zellen (Abb. 4-3) in der vorliegenden Arbeit, zu beobachten war.

Bei der weiteren Betrachtung der Aufnahme von radioaktiv-markierten Triglyzeriden in die Organe, fiel auf dass vor allem die Fettgewebe eine starke Reduktion der spezifischen Aufnahmeaktivität aufwiesen (Abb. 4-31B). Gerade im braunen Fettgewebe, das unter Chow-Bedingungen sehr viele Fettsäuren oder auch ganze Lipoprotein-Partikel aufnahm, war die spezifische Aufnahme in HFD-gefütterten PID1<sup>-/-</sup>-und Wildtyp-Mäusen stark reduziert (Abb. 4-31B, iBAT und scBAT). Interessant ist in diesem Zusammenhang die erhöhte Aufnahme von Triolein in die Leber von HFD-PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen. Diese Beobachtung lässt sich wieder durch die erhöhte LRP1-Dichte an der Hepatozyten-Membran erklären. In PID1-defizienten Mäusen konnten somit mehr Chylomikronen-*Remnants* über LRP1 in die Zellen internalisiert werden (Abb. 4-31, Leber).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Verlust von PID1 zu einer verbesserten Insulintoleranz und einer erhöhten Glukoseaufnahme in durch Hochfettdiät-induzierten adipösen Mäusen führt. Die Mäuse weisen eine niedrigere Glukoseund Insulinkonzentration im Blut im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf. Weiterhin zeigen sie erhöhte Adiponektin-Konzentrationen und geringere Triglyzeridwerte im Plasma. Daneben war die erhöhte Aufnahme von Lipiden in die Fettgewebe in PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verbessert. Diese Beobachtungen lassen sich durch die vermehrte Lokalisation von LRP1 und wahrscheinlich durch eine höhere Glut4-Dichte an der Plasmamembran erklären. PID1-defiziente Mäuse scheinen somit besser geschützt vor Diät-vermitteltem Übergewicht und Typ 2 Diabetes. In diesem Zusammenhang wird beschrieben, dass HFD-vermitteltes Übergewicht in Ratten zu einer verringerten Glut4 Translokation und einer verschlechterten Glukoseaufnahme führt (Tremblay et al., 2001). Um die durch den Verlust von PID1 vermittelte gesteigerte Glukoseaufnahme näher zu analysieren, sollten auf jeden Fall primäre Adipozyten aus PID1<sup>-/-</sup>-und Wildtyp-Mäusen isoliert und die Glut4-Translokation untersucht werden.

Der LDL-R kann die Aufgaben des LRP1 in der Endozytose von ApoE-enthaltenen triglyzeridreichen Lipoprotein *Remnants* kompensieren, wobei allerdings die Bindungsaffinitäten unterschiedlicher ApoE-Isoformen variieren (Rohlmann et al., 1998) (Ruiz et al., 2005) (Schneider et al., 1981). Aus diesem Grund sind weitere Experimente in Mäusen nötig, in denen PID1, vor einem LDL-R-*Knockout*-Hintergrund herunter reguliert wird. In den aus dieser Kreuzung entstehenden PID1<sup>-/-</sup>/LDL-R<sup>-/-</sup>-Doppel-*Knockout*-Mäusen, sollte die wichtige physiologische Rolle von PID1 für die Funktion von LRP1 als Rezeptor für die Endozytose von Lipoproteinen, noch deutlicher werden.

#### 5.4.3 Modell des möglichen Mechanismus

Anhand der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse ergibt sich ein Modell dafür, wie PID1 die LRP1-Funktion in der Zelle regulieren könnte. Durch die Bindung von PID1 an das distale NPxY-Motiv der LRP1-ICD sorgt PID1 dafür, dass LRP1 in den endosomalen, perinukleären Kompartimenten zurückgehalten wird. In der postprandialen Phase kommt es dann zur Ausschüttung von Insulin durch die β-Zellen des Pankreas. Das Insulin bindet an den Insulinrezeptor auf den Hepatozyten bzw. auf den Adipozyten. Diese Interaktion führt zur Autophosphorylierung des Insulinrezeptors, die die Rekrutierung und Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrat-1 zur Folge hat. Das wiederum aktiviert die PI3-Kinase wodurch in der weiteren Signalkaskade die Proteinkinase B aktiviert wird. Diese ist dann in der Lage, weitere Proteine zu phosphorylieren. Dazu ist beschrieben, dass die Stimulierung von zum Beispiel Hepatozyten (Laatsch et al., 2009) oder Adipozyten (Ko et al., 2000) mit Insulin zu einer vermehrten Translokation von LRP1 an die Plasmamembran führt. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass die PI3-Kinase das distale NPxY-Motiv der LRP1-ICD, also das Motiv an das PID1 bindet, phosphorylieren kann (Guttman et al., 2009). Ferner werden Glut4-Vesikel durch Insulin-Stimulation an die Plasmamembran von Adipozyten transportiert, ein Prozess bei dem ebenfalls die durch Insulin stimulierte PI3-Kinase-vermittelte Phosphorylierung der Vesikel wichtig ist (Heller-Harrison et al., 1996).

Die Phosphorylierung des Tyrosins im distalen NPxY-Motiv der LRP1-ICD, führt zur Dissoziation des PID1 von diesem Motiv. Die gestörte Interaktion zwischen PID1 und LRP1, die aufgrund der Tyrosinphosphorylierung zustande kommt, lässt dann die Bindung von anderen Phosphotyrosin-abhängigen Adaptorproteinen oder Proteinen des retrograden Transports zu. Es könnte auch zur Interaktion mit SNX17 kommen. Dieses Protein bindet an das proximale Motiv der LRP1-ICD und wurde im Zusammenhang mit der polarisierten Sortierung von LRP1 an die basolaterale Membran gefunden (Donoso et al., 2009). Der Transport von LRP1 von den endosomalen Kompartimenten, in denen es durch die Bindung von PID1 zurückgehalten wird, könnte aufgrund der Dissoziation von PID1 über den Retromerkomplex stattfinden. An dieser Stelle könnte auch die Interaktion des Retromers mit SNX27, das im Endosom-Plasmamembran-Transport in der Assoziation mit dem Retromer gefunden wurde, eine Rolle spielen (Temkin et al., 2011). Der genaue Mechanismus an dieser Stelle muss noch eingehender untersucht werden, allerdings konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass PID1 hier einen wichtigen Bindungspartner für LRP1 darstellt. Beim Verlust von PID1 bzw. bei der Dissoziation des Adaptorproteins von der LRP1-ICD transloziert LRP1 zur Plasmamembran, wo der Rezeptor dann seine Rolle bei der Internalisierung von TRL-Remnants im Lipoproteinstoffwechsel ausführen kann. Die Rezeptor-vermittelte Endozytose dieser Partikel mittels LRP1 wird dann wahrscheinlich nicht von PID1, wie ursprünglich angedacht vermittelt, sondern über andere Adaptorproteine wie zum Beispiel dem AP-2 reguliert. Für dieses AP-2 ist bekannt, dass es direkt an die intrazelluläre Domäne des LRP1 binden kann (Guttman et al., 2009), wodurch LRP1 über AP-2 an die Clathrinmaschinerie gekoppelt wird. Dieselben Autoren beschreiben auch eine direkte Interaktion von LRP1 mit der der schweren Kette von Clathrin.

In Adipozyten könnte der Mechanismus ähnlich aussehen. GSVs beinhalten neben dem Glut 4 noch viele weitere Proteine, so wurde neben IRAP (insulin responsive aminopeptidase) und Sortilin auch LRP1 als residierendes Protein in diesen Insulin-responsiven Vesikeln gefunden (Jedrychowski et al., 2010). Damit die IRV-Formation stattfinden und die Vesikel an der Donor-Membran zurückgehalten werden können, sind eine Clathrin-Hülle und GGA-Adaptoren notwendig (Li et al., 2007; Li and Kandror, 2005; Watson et al., 2004). GGAs sind Golgi-localizing, Gamma-adaptin ear domain homology, ARF-bindende Proteine, die die zweite große Gruppe von Adaptorproteinen darstellen, die neben den heterotetramären Adaptorproteinen (AP-1, AP-2, AP-3, AP-4) an unterschiedlichen Membranen mit Clathrin interagieren (Robinson, 2004). Für Sortilin ist bekannt, dass es das einzige Protein in den IRV ist, das mit GGA-Adaptoren interagieren kann (Nielsen et al., 2001). Sortilin ist somit für die Retention der IRV in dem intrazellulären "Pool" zuständig. Aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse, könnte nun auch LRP1 eine wichtige Rolle in den Glut4-"Vorrats"-Vesikeln spielen. Die gefundene Interaktion zwischen LRP1 und PID1 und die durch PID1 vermittelte Lokalisataion von LRP1 in perinukleären Vesikeln, spricht zusammen mit dem Vorhandensein von LRP1 in IRV dafür. Außerdem translozieren die LRP1-positiven Vesikel, Glut4-Vesikel, Insulin-vermittelt die genau wie an

Plasmamembran. Daneben spricht auch die verbesserte Aufnahme von Glukose in den PID1<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 4-23 und Abb. 4-27) für eine Beteiligung von PID1 in diesem Mechanismus. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass PID1 über die Interaktion mit LRP1 an der Retention der Vesikel beteiligt ist. Die mögliche Funktion von PID1 in Hepatozyten und auch Adipozyten wird in der folgenden Abbildung (Abb. 5-1) zusammengefasst.





LRP1 enthaltene Vesikel in Hepatozyten und Glut4-enthaltene Vesikel, die auch LRP1 enthalten, in Adipozyten werden durch die Bindung von PID1 an das distale NPxY-Motiv in der intrazellulären Domäne von LRP1 in perinukleären Bereichen in der Zelle zurückgehalten. Ein exogener Stimulus, wie die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor in der postprandialen Phase, führt zu Phosphorylierung des Tyrosins im distalen NPxY-Motiv in der LRP1-ICD. Diese Phosphorylierung bewirkt die Dissoziation des PID1 von diesem Bindungsmotiv, wodurch LRP1 nicht mehr zurückgehalten wird. LRP1 und dadurch auch der Glut4-Vesikel kann nun an die Plasmamembran translozieren. Dort gewährleistet LRP1 in Hepatozyten die Aufnahme von triglyzeridreichen Lipoprotein-*Remnants* (TRLR). Weitere Adaptorproteine, wie z.B. AP-2 koppeln den Rezeptor dann bei der Endozytose an die Clathrinmaschinerie. In Adipozyten sorgt Glut4 für die Aufnahme von Glukose in die Zelle.

# 6. Zusammenfassung

Das LDL-Rezeptor-*related* Protein 1 (LRP1) spielt neben dem LDL-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Lipoproteinen in die Leber. LRP1 ist dabei insbesondere für die Rezeptor-vermittelte Endozytose von postprandialen trigyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) verantwortlich. Daneben reguliert der Rezeptor verschiedene Wachstumsfaktorabhängige Signaltransduktionswege, kann nach proteolytischer Spaltung an der Plasmamembran sogar in den Zellkern gelangen und dort als Transkriptionfaktor wirken. Damit die Vielzahl dieser Aufgaben gewährleistet wird, werden die Funktionen von LRP1 durch spezielle Adaptorproteine reguliert. So konnte das Adapterprotein *phosphotyrosine interacting domain containing 1* (PID1) als Interaktionspartner von LRP1 identifiziert werden. Außerdem wurde PID1 in Zusammenhang mit Adipositas gebracht, da es im Fettgewebe von übergewichtigen Patienten vermehrt exprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass PID1 von essentieller Bedeutung für die Lokalisation und Funktion von LRP1 in humanen Hepatoma-Zellen und in primären Hepatozyten ist. So ist LRP1 in PID1-defizienten Zellen nicht mehr in perinukleären Endosomen zu finden, sondern präsentierte sich an der Plasmamembran. Ein Verlust von PID1 führte neben der veränderten LRP1-Lokalisation zu zellbiologisch bedeutsamen Veränderungen in der Zelle. So ist eine veränderte Lokalisation von endosomalen Kompartimenten, wie den frühen Endosomen und Lysosomen, in PID1defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zu beobachten. Auch das Retromer, ein Proteinkomplex, der für den retrograden Transport von Proteinen zwischen Endosomen und dem Golgi-Apparat bzw. der Plasmamembran verantwortlich ist, ist wie LRP1 diffus in der Zelle verteilt. In Hepatozyten wird LRP1 in der postprandialen Phase durch Insulinvermittelte Signalwege von perinukleären Bereichen an die Plasmamembran transportiert. In Adipozyten wird LRP1 als ein residierendes Protein in intrazellulären Glut4-enthaltenen, Insulin-responsiven Vesikeln beschrieben. In diesem Zusammenhang ist in dieser Arbeit festgestellt worden, dass die Insulin-vermittelte LRP1-Translokation in PID1-defizienten-Zellen nicht stattfindet. Stattdessen war LRP1 in PID1-defizienten Hepatozyten schon im nicht-stimulierten Zustand an der Plasmamembran lokalisiert, was in einer verbesserten Endozytose von radioaktiv- und Fluoreszenz-markierten TRL resultierte.

Der Verlust von PID1 ist ebenfalls mit einem positiven Effekt auf Übergewichts-induzierte Erkrankungen assoziiert. So ist in einer Hochfettdiät-Studie festgestellt worden, dass die PID1-defizienten Mäuse trotz vergleichbarer Gewichtszunahme günstigere metabolische Parameter im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen aufwiesen. Der Verlust von PID1 führte zu verbesserten Glukose- und Insulinwerten im Blut, was darauf hindeutet, dass PID1defiziente Mäuse insulinsensitiver sind und somit ein geringeres Risiko dafür tragen, an Typ 2 Diabetes Mellitus zu erkranken. In diesem Zusammenhang könnte PID1 in dem Mechanismus der Insulin-vermittelten Translokation involviert sein und somit in seiner Abwesenheit zu einer erhöhten Glut4-Dichte an der Plasmamembran führen, die wiederum einer erhöhte Glukoseaufnahme zur Folge hat. Diese Annahme konnte teilweise über die verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors ChREBPB, der Glukose-abhängig reguliert wird, bestätigt werden. Ferner zeigen PID1-defiziente Mäuse eine erhöhte Kapazität in Bezug auf die Glukose- und Lipid-Aufnahme in stoffwechselaktive Organe. Letztendlich ist gezeigt worden, dass die Lipoproteinlipase, die für die Hydrolyse der Triglyzeride aus TRL verantwortlich ist, in PID1-defizienten Mäusen verstärkt exprimiert wurde. Dies könnte neben der erhöhten LRP1-vermittelten Internalisierung von TRL-Remnants die niedrigere Triglyzerid-Konzentration im Plasma von Kontrolldiät-gefütterten PID1defizienten Mäusen erklären.

Zusammengefasst ist mit dieser Arbeit zum ersten Mal die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von PID1 *in vivo* gezeigt worden. PID1 reguliert zusammen mit Proteinen des Retromer-Komplexes die Retention von LRP1 in Hepatozyten und ist möglicherweise auch für die intrazelluläre Lokalisation des Glukosetransporters in Adipozyten verantwortlich. PID1 scheint dabei als eine Art molekularer Schalter zu fungieren, der LRP1 an intrazelluläre, endosomale Kompartimente bindet. Die PID1-Interaktion mit dem Rezeptor wird aufgrund von spezifischen Stimuli, wie z.B. der Insulin-vermittelten Phosphorylierung des distalen NPxY-Motivs der intrazellulären LRP1-Domäne, aufgelöst. Daraufhin kann LRP1 und möglicherweise auch Glut4 an die Plasmamembran transportiert werden, was zur verbesserten Aufnahme von Lipoproteinen und Glukose führt.

# 7. Literaturverzeichnis

- Anitei, M., and B. Hoflack. 2012. Bridging membrane and cytoskeleton dynamics in the secretory and endocytic pathways. *Nat Cell Biol.* 14:11-19.
- Ashcom, J.D., S.E. Tiller, K. Dickerson, J.L. Cravens, W.S. Argraves, and D.K. Strickland. 1990. The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2macroglobulin. *The Journal of Cell Biology*. 110:1041-1048.
- Attie, A.D., and P.E. Scherer. 2009. Adipocyte metabolism and obesity. *Journal of Lipid Research*. 50:S395-S399.
- Barnes, H., B. Larsen, M. Tyers, and P. van der Geer. 2001. Tyrosine-phosphorylated Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1) Associates with the Adaptor Protein SHC in SRC-transformed Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 276:19119-19125.
- Bartelt, A., O.T. Bruns, R. Reimer, H. Hohenberg, H. Ittrich, K. Peldschus, M.G. Kaul, U.I. Tromsdorf, H. Weller, C. Waurisch, A. Eychmuller, P.L.S.M. Gordts, F. Rinninger, K. Bruegelmann, B. Freund, P. Nielsen, M. Merkel, and J. Heeren. 2011. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med.* 17:200-205.
- Beigneux, A.P., B.S.J. Davies, A. Bensadoun, L.G. Fong, and S.G. Young. 2009. GPIHBP1, a GPI-anchored protein required for the lipolytic processing of triglyceride-rich lipoproteins. *Journal of Lipid Research*. 50:S57-S62.
- Beigneux, A.P., B.S.J. Davies, P. Gin, M.M. Weinstein, E. Farber, X. Qiao, F. Peale, S. Bunting, R.L. Walzem, J.S. Wong, W.S. Blaner, Z.-M. Ding, K. Melford, N. Wongsiriroj, X. Shu, F. de Sauvage, R.O. Ryan, L.G. Fong, A. Bensadoun, and S.G. Young. 2007. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored High-Density Lipoprotein-Binding Protein 1 Plays a Critical Role in the Lipolytic Processing of Chylomicrons. *Cell metabolism*. 5:279-291.
- Beisiegel, U., W. Weber, G. Ihrke, J. Herz, and K.K. Stanley. 1989. The LDL-receptorrelated protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature*. 341:162-164.
- Boden, G. 2008. Obesity and Free Fatty Acids. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 37:635-646.
- Boden, G., and G.I. Shulman. 2002. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β-cell dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation*. 32:14-23.
- Bogan, J.S. 2012. Regulation of Glucose Transporter Translocation in Health and Diabetes. Annual Review of Biochemistry. 81:507-532.
- Bogan, J.S., and K.V. Kandror. 2010. Biogenesis and regulation of insulin-responsive vesicles containing GLUT4. *Current Opinion in Cell Biology*. 22:506-512.
- Bonifacino, J.S., and R. Rojas. 2006. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:568-579.
- Boucher, P., M. Gotthardt, W.-P. Li, R.G.W. Anderson, and J. Herz. 2003. LRP: Role in Vascular Wall Integrity and Protection from Atherosclerosis. *Science*. 300:329-332.

- Boucher, P., W.-P. Li, R.L. Matz, Y. Takayama, J. Auwerx, R.G.W. Anderson, and J. Herz. 2007. LRP1 Functions as an Atheroprotective Integrator of TGFβ and PDGF Signals in the Vascular Wall: Implications for Marfan Syndrome. *PLoS ONE*. 2:e448.
- Boucher, P., P. Liu, M. Gotthardt, T. Hiesberger, R.G.W. Anderson, and J. Herz. 2002. Platelet-derived Growth Factor Mediates Tyrosine Phosphorylation of the Cytoplasmic Domain of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein in Caveolae. *Journal of Biological Chemistry*. 277:15507-15513.
- Bovenschen, N., J. Herz, J.M. Grimbergen, P.J. Lenting, L.M. Havekes, K. Mertens, and B.J.M. van Vlijmen. 2003. Elevated plasma factor VIII in a mouse model of lowdensity lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood.* 101:3933-3939.
- Braulke, T., and J.S. Bonifacino. 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*. 1793:605-614.
- Brown, M., and J. Goldstein. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 232:34-47.
- Brown, M.S., and J.L. Goldstein. 1997. The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell.* 89:331-340.
- Bryant, D.M., and K.E. Mostov. 2008. From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:887-901.
- Bu, G., H.J. Geuze, G.J. Strous, and A.L. Schwartz. 1995. 39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptorrelated protein. *Embo J.* 14:2269-2280.
- Burden, J.J., X.-M. Sun, A.B.G. García, and A.K. Soutar. 2004. Sorting Motifs in the Intracellular Domain of the Low Density Lipoprotein Receptor Interact with a Novel Domain of Sorting Nexin-17. *Journal of Biological Chemistry*. 279:16237-16245.
- Cain, C.C., D.M. Sipe, and R.F. Murphy. 1989. Regulation of endocytic pH by the Na+,K+-ATPase in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86:544-548.
- CANNON, B., and J. NEDERGAARD. 2004. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*. 84:277-359.
- Caratù, G., D. Allegra, M. Bimonte, G.G. Schiattarella, C. D'Ambrosio, A. Scaloni, M. Napolitano, T. Russo, and N. Zambrano. 2007. Identification of the Ligands of Protein Interaction Domains through a Functional Approach. *Molecular & Cellular Proteomics*. 6:333-345.
- Cereghino, J.L., E.G. Marcusson, and S.D. Emr. 1995. The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Molecular Biology of the Cell*. 6:1089-1102.
- Chan, J.C.Y., D.E. Piper, Q. Cao, D. Liu, C. King, W. Wang, J. Tang, Q. Liu, J. Higbee, Z. Xia, Y. Di, S. Shetterly, Z. Arimura, H. Salomonis, W.G. Romanow, S.T. Thibault, R. Zhang, P. Cao, X.-P. Yang, T. Yu, M. Lu, M.W. Retter, G. Kwon, K. Henne, O. Pan, M.-M. Tsai, B. Fuchslocher, E. Yang, L. Zhou, K.J. Lee, M. Daris, J. Sheng, Y. Wang, W.D. Shen, W.-C. Yeh, M. Emery, N.P.C. Walker, B. Shan, M. Schwarz, and S.M. Jackson. 2009. A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing

antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. Proceedings of the National Academy of Sciences. 106:9820-9825.

- Cohen, J.C., M. Kimmel, A. Polanski, and H.H. Hobbs. 2003. Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Current Opinion in Lipidology*. 14:121-127.
- Cozier, G.E., J. Carlton, A.H. McGregor, P.A. Gleeson, R.D. Teasdale, H. Mellor, and P.J. Cullen. 2002. The Phox Homology (PX) Domain-dependent, 3-Phosphoinositidemediated Association of Sorting Nexin-1 with an Early Sorting Endosomal Compartment Is Required for Its Ability to Regulate Epidermal Growth Factor Receptor Degradation. *Journal of Biological Chemistry*. 277:48730-48736.
- Cuchel, M., and D.J. Rader. 2006. Macrophage Reverse Cholesterol Transport: Key to the Regression of Atherosclerosis? *Circulation*. 113:2548-2555.
- Deborde, S., E. Perret, D. Gravotta, A. Deora, S. Salvarezza, R. Schreiner, and E. Rodriguez-Boulan. 2008. Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature*. 452:719-723.
- Descamps, O., D. Bilheimer, and J. Herz. 1993. Insulin stimulates receptor-mediated uptake of apoE-enriched lipoproteins and activated alpha 2-macroglobulin in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 268:974-981.
- Despres, J.-P., and I. Lemieux. 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 444:881-887.
- Despres, J.P. 1993. Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition*. 9:452-459.
- Dieckmann, M., F. Dietrich Martin, and J. Herz. 2010. Lipoprotein receptors an evolutionarily ancient multifunctional receptor family. *In* Biological Chemistry. Vol. 391. 1341.
- Diez, J., and P. Iglesias. 2003. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *European Journal of Endocrinology*. 148:293-300.
- Donnelly, K.L., C.I. Smith, S.J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M.D. Boldt, and E.J. Parks. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 115:1343-1351.
- Donoso, M., J. Cancino, J. Lee, P. van Kerkhof, C. Retamal, G. Bu, A. Gonzalez, A. Cáceres, and M.-P. Marzolo. 2009. Polarized Traffic of LRP1 Involves AP1B and SNX17 Operating on Y-dependent Sorting Motifs in Different Pathways. *Molecular Biology of the Cell*. 20:481-497.
- Eissing, L., T. Scherer, K. Tödter, U. Knippschild, J.W. Greve, W.A. Buurman, H.O. Pinnschmidt, S.S. Rensen, A.M. Wolf, A. Bartelt, J. Heeren, C. Buettner, and L. Scheja. 2013. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-β and metabolic health. *Nat Commun.* 4:1528.
- Erdreich-Epstein, A., N. Robison, X. Ren, H. Zhou, J. Xu, T.B. Davidson, M. Schur, F.H. Gilles, L. Ji, J. Malvar, G.M. Shackleford, A.S. Margol, M.D. Krieger, A.R. Judkins, D.T.W. Jones, S.M. Pfister, M. Kool, R. Sposto, and S. Asgharazadeh. 2013. PID1 (NYGGF4), a New Growth-Inhibitory Gene in Embryonal Brain Tumors and Gliomas. *Clinical Cancer Research*.
- Farfán, P., J. Lee, J. Larios, P. Sotelo, G. Bu, and M.-P. Marzolo. 2013. A Sorting Nexin 17-Binding Domain Within the LRP1 Cytoplasmic Tail Mediates Receptor Recycling Through the Basolateral Sorting Endosome. *Traffic*. 14:823-838.

- Fay, P.J., and P.V. Jenkins. 2005. Mutating factor VIII: lessons from structure to function. Blood Reviews. 19:15-27.
- Flynn, D., C. . 2001. Adaptor proteins. Oncogene. 20:6270-6272.
- Garcia, C.K., K. Wilund, M. Arca, G. Zuliani, R. Fellin, M. Maioli, S. Calandra, S. Bertolini, F. Cossu, N. Grishin, R. Barnes, J.C. Cohen, and H.H. Hobbs. 2001. Autosomal Recessive Hypercholesterolemia Caused by Mutations in a Putative LDL Receptor Adaptor Protein. *Science*. 292:1394-1398.
- Ghai, R., A. Bugarcic, H. Liu, S.J. Norwood, S. Skeldal, E.J. Coulson, S.S.-C. Li, R.D. Teasdale, and B.M. Collins. 2013. Structural basis for endosomal trafficking of diverse transmembrane cargos by PX-FERM proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110:E643–E652.
- Gin, P., L. Yin, B.S.J. Davies, M.M. Weinstein, R.O. Ryan, A. Bensadoun, L.G. Fong, S.G. Young, and A.P. Beigneux. 2008. The Acidic Domain of GPIHBP1 Is Important for the Binding of Lipoprotein Lipase and Chylomicrons. *Journal of Biological Chemistry*. 283:29554-29562.
- Goldstein, J.L., and M.S. Brown. 1974. Binding and Degradation of Low Density Lipoproteins by Cultured Human Fibroblasts: COMPARISON OF CELLS FROM A NORMAL SUBJECT AND FROM A PATIENT WITH HOMOZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA. Journal of Biological Chemistry. 249:5153-5162.
- Goldstein, J.L., and M.S. Brown. 2009. The LDL Receptor. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 29:431-438.
- Gordts, P.L.S.M., A. Bartelt, S.K. Nilsson, W. Annaert, C. Christoffersen, L.B. Nielsen, J. Heeren, and A.J.M. Roebroek. 2012. Impaired LDL Receptor-Related Protein 1 Translocation Correlates with Improved Dyslipidemia and Atherosclerosis in apoE-Deficient Mice. *PLoS ONE*. 7:e38330.
- Gotthardt, M., M. Trommsdorff, M.F. Nevitt, J. Shelton, J.A. Richardson, W. Stockinger, J. Nimpf, and J. Herz. 2000. Interactions of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family with Cytosolic Adaptor and Scaffold Proteins Suggest Diverse Biological Functions in Cellular Communication and Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry*. 275:25616-25624.
- Griffiths, G., B. Hoflack, K. Simons, I. Mellman, and S. Kornfeld. 1988. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell*. 52:329-341.
- Grupe, A., B. Hultgren, A. Ryan, Y.H. Ma, M. Bauer, and T.A. Stewart. 1995. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic β cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell*. 83:69-78.
- Guttman, M., G.N. Betts, H. Barnes, M. Ghassemian, P. van der Geer, and E.A. Komives. 2009. Interactions of the NPXY microdomains of the low density lipoprotein receptor-related protein 1. *PROTEOMICS*. 9:5016-5028.
- Harasaki, K., N.B. Lubben, M. Harbour, M.J. Taylor, and M.S. Robinson. 2005. Sorting of Major Cargo Glycoproteins into Clathrin-Coated Vesicles. *Traffic.* 6:1014-1026.
- Harrison, M.S., C.-S. Hung, T.-t. Liu, R. Christiano, T.C. Walther, and C.G. Burd. 2014. A mechanism for retromer endosomal coat complex assembly with cargo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111:267-272.
- Havel, R.J., and R.L. Hamilton. 2004. Hepatic Catabolism of Remnant Lipoproteins: Where the Action Is. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 24:213-215.

- He, G., S. Gupta, M. Yi, P. Michaely, H.H. Hobbs, and J.C. Cohen. 2002. ARH Is a Modular Adaptor Protein That Interacts with the LDL Receptor, Clathrin, and AP-2. *Journal of Biological Chemistry*. 277:44044-44049.
- He, W., Y. Barak, A. Hevener, P. Olson, D. Liao, J. Le, M. Nelson, E. Ong, J.M. Olefsky, and R.M. Evans. 2003. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor γ knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100:15712-15717.
- Heeren, J., and U. Beisiegel. 2001. Intracellular metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Current Opinion in Lipidology.* 12:255-260.
- Heeren, J., U. Beisiegel, and T. Grewal. 2006. Apolipoprotein E Recycling: Implications for Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 26:442-448.
- Heeren, J., T. Grewal, S. Jäckle, and U. Beisiegel. 2001. Recycling of Apolipoprotein E and Lipoprotein Lipase through Endosomal Compartments in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 276:42333-42338.
- Heeren, J., T. Grewal, A. Laatsch, D. Rottke, F. Rinninger, C. Enrich, and U. Beisiegel. 2003. Recycling of Apoprotein E Is Associated with Cholesterol Efflux and High Density Lipoprotein Internalization. *Journal of Biological Chemistry*. 278:14370-14378.
- Heeren, J., A. Niemeier, M. Merkel, and U. Beisiegel. 2002. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J Mol Med.* 80:576-584.
- Heeren, J., W. Weber, and U. Beisiegel. 1999. Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *Journal of Cell Science*. 112:349-359.
- Heller-Harrison, R.A., M. Morin, A. Guilherme, and M.P. Czech. 1996. Insulin-mediated Targeting of Phosphatidylinositol 3-Kinase to GLUT4-containing Vesicles. *Journal* of Biological Chemistry. 271:10200-10204.
- Herman, M.A., O.D. Peroni, J. Villoria, M.R. Schon, N.A. Abumrad, M. Bluher, S. Klein, and B.B. Kahn. 2012. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature*. 484:333-338.
- Herz, J. 1988. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor.
- Herz, J., D.E. Clouthier, and R.E. Hammer. 1992. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell.* 71:411-421.
- Herz, J., R.C. Kowal, J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 1990. Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *Embo J.* 9:1769-1776.
- Hiesberger, T., M. Trommsdorff, B.W. Howell, A. Goffinet, M.C. Mumby, J.A. Cooper, and J. Herz. 1999. Direct Binding of Reelin to VLDL Receptor and ApoE Receptor 2 Induces Tyrosine Phosphorylation of Disabled-1 and Modulates Tau Phosphorylation. *Neuron.* 24:481-489.
- Hirst, J., G.H.H. Borner, J. Edgar, M.Y. Hein, M. Mann, F. Buchholz, R. Antrobus, and M.S. Robinson. 2013. Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15. *Molecular Biology of the Cell*. 24:2558-2569.

- Hopkins, C.R., and I.S. Trowbridge. 1983. Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells. *The Journal of Cell Biology*. 97:508-521.
- Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*. 109:1125-1131.
- Howell, B.W., L.M. Lanier, R. Frank, F.B. Gertler, and J.A. Cooper. 1999. The Disabled 1 Phosphotyrosine-Binding Domain Binds to the Internalization Signals of Transmembrane Glycoproteins and to Phospholipids. *Molecular and Cellular Biology*. 19:5179-5188.
- Huang, S.S., and J.S. Huang. 2005. TGF-β control of cell proliferation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 96:447-462.
- Iizuka, K., R.K. Bruick, G. Liang, J.D. Horton, and K. Uyeda. 2004. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:7281-7286.
- Jedrychowski, M.P., C.A. Gartner, S.P. Gygi, L. Zhou, J. Herz, K.V. Kandror, and P.F. Pilch. 2010. Proteomic Analysis of GLUT4 Storage Vesicles Reveals LRP1 to Be an Important Vesicle Component and Target of Insulin Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 285:104-114.
- Jensen, T.G., A.D. Roses, and A.L. Jørgensen. 1994. Apolipoprotein E uptake and degradation via chloroquine-sensitive pathway in cultivated monkey cells overexpressing low density lipoprotein receptor. *Neuroscience Letters*. 180:193-196.
- Kajiwara, Y., S. Franciosi, N. Takahashi, L. Krug, J. Schmeidler, K. Taddei, V. Haroutunian, U. Fried, M. Ehrlich, R. Martins, S. Gandy, and J. Buxbaum. 2010. Extensive proteomic screening identifies the obesity-related NYGGF4 protein as a novel LRP1-interactor, showing reduced expression in early Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 5:1.
- Kang, H., S.Y. Kim, K. Song, E.J. Sohn, Y. Lee, D.W. Lee, I. Hara-Nishimura, and I. Hwang. 2012. Trafficking of Vacuolar Proteins: The Crucial Role of Arabidopsis Vacuolar Protein Sorting 29 in Recycling Vacuolar Sorting Receptor. *The Plant Cell* Online. 24:5058-5073.
- Kirchhausen, T. 1999. ADAPTORS FOR CLATHRIN-MEDIATED TRAFFIC. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 15:705-732.
- Knauer, M.F., R.A. Orlando, and C.G. Glabe. 1996. Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Research*. 740:6-14.
- Ko, K.W.S., R.K. Avramoglu, R.S. McLeod, J. Vukmirica, and Z. Yao. 2000. The Insulin-Stimulated Cell Surface Presentation of Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein in 3T3-L1 Adipocytes Is Sensitive to Phosphatidylinositide 3-Kinase Inhibition<sup>+</sup>. *Biochemistry*. 40:752-759.
- Koivisto, U.-M., A.L. Hubbard, and I. Mellman. 2001. A Novel Cellular Phenotype for Familial Hypercholesterolemia due to a Defect in Polarized Targeting of LDL Receptor. *Cell*. 105:575-585.

- Kontush, A., and M.J. Chapman. 2006. Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis. *Pharmacological Reviews*. 58:342-374.
- Kundra, R., and S. Kornfeld. 1999. Asparagine-linked Oligosaccharides Protect Lamp-1 and Lamp-2 from Intracellular Proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 274:31039-31046.
- Kurth, T., J.M. Gaziano, K.M. Rexrode, C.S. Kase, N.R. Cook, J.E. Manson, and J.E. Buring. 2005. Prospective Study of Body Mass Index and Risk of Stroke in Apparently Healthy Women. *Circulation*. 111:1992-1998.
- Laatsch, A., M. Merkel, P.J. Talmud, T. Grewal, U. Beisiegel, and J. Heeren. 2009. Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis*. 204:105-111.
- Laatsch, A., M. Panteli, M. Sornsakrin, B. Hoffzimmer, T. Grewal, and J. Heeren. 2012. Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Dependent Endosomal Trapping and Recycling of Apolipoprotein E. *PLoS ONE*. 7:e29385.
- Lee, P., and R.A. Hegele. 2013. Current Phase II proprotein convertase subtilisin/kexin 9 inhibitor therapies for dyslipidemia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 22:1411-1423.
- Lenting, P.J., C.J.M. Van Schooten, and C.V. Denis. 2007. Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 5:1353-1360.
- Leturque, A., E. Brot-Laroche, and M. Le Gall. 2009. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism.* 296:E985-E992.
- Li, J., P.J. Peters, M. Bai, J. Dai, E. Bos, T. Kirchhausen, K.V. Kandror, and V.W. Hsu. 2007. An ACAP1-containing clathrin coat complex for endocytic recycling. *The Journal of Cell Biology*. 178:453-464.
- Li, L.V., and K.V. Kandror. 2005. Golgi-Localized, γ-Ear-Containing, Arf-Binding Protein Adaptors Mediate Insulin-Responsive Trafficking of Glucose Transporter 4 in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular Endocrinology*. 19:2145-2153.
- Li, Y., M. Paz Marzolo, P. van Kerkhof, G.J. Strous, and G. Bu. 2000. The YXXL Motif, but Not the Two NPXY Motifs, Serves as the Dominant Endocytosis Signal for Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 275:17187-17194.
- Lillis, A.P., I. Mikhailenko, and D.K. Strickland. 2005. Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 3:1884-1893.
- Lillis, A.P., L.B. Van Duyn, J.E. Murphy-Ullrich, and D.K. Strickland. 2008. LDL Receptor-Related Protein 1: Unique Tissue-Specific Functions Revealed by Selective Gene Knockout Studies. *Physiological Reviews*. 88:887-918.
- Linton, M.F., and S. Fazio. 1999. Macrophages, lipoprotein metabolism, and atherosclerosis: insights from murine bone marrow transplantation studies. *Current Opinion in Lipidology*. 10:97-106.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCT Method. *Methods*. 25:402-408.
- Lopez-Ilasaca, M. 1998. Signaling from G-Protein-coupled Receptors to Mitogen-activated Protein (MAP)-Kinase Cascades. *Biochemical Pharmacology*. 56:269-277.

- Loukinova, E., S. Ranganathan, S. Kuznetsov, N. Gorlatova, M.M. Migliorini, D. Loukinov, P.G. Ulery, I. Mikhailenko, D.A. Lawrence, and D.K. Strickland. 2002. Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-induced Tyrosine Phosphorylation of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP): EVIDENCE FOR INTEGRATED CO-RECEPTOR FUNCTION BETWEEN LRP AND THE PDGF. Journal of Biological Chemistry. 277:15499-15506.
- Mahley, R.W., K.H. Weisgraber, M.M. Hussain, B. Greenman, M. Fisher, T. Vogel, and M. Gorecki. 1989. Intravenous infusion of apolipoprotein E accelerates clearance of plasma lipoproteins in rabbits. *The Journal of Clinical Investigation*. 83:2125-2130.
- Mak, P.A., B.A. Laffitte, C. Desrumaux, S.B. Joseph, L.K. Curtiss, D.J. Mangelsdorf, P. Tontonoz, and P.A. Edwards. 2002. Regulated expression of the ApoE/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages; A critical role for the nuclear receptors LXRα and LXRβ. *Journal of Biological Chemistry*.
- Mallik, R., and S.P. Gross. 2004. Molecular Motors: Strategies to Get Along. *Current Biology*. 14:R971-R982.
- Marzolo, M.-P., M.I. Yuseff, C. Retamal, M. Donoso, F. Ezquer, P. Farfán, Y. Li, and G. Bu. 2003. Differential Distribution of Low-Density Lipoprotein-Receptor-Related Protein (LRP) and Megalin in Polarized Epithelial Cells is Determined by Their Cytoplasmic Domains. *Traffic.* 4:273-288.
- Masson, O., C. Chavey, C. Dray, A. Meulle, D. Daviaud, D. Quilliot, C. Muller, P. Valet, and E. Liaudet-Coopman. 2009. LRP1 Receptor Controls Adipogenesis and Is Up-Regulated In Human and Mouse Obese Adipose Tissue. *PLoS ONE*. 4:e7422.
- Matschinsky, F.M. 2002. Regulation of Pancreatic β-Cell Glucokinase: From Basics to Therapeutics. *Diabetes*. 51:S394-S404.
- Matter, K., W. Hunziker, and I. Mellman. 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: The cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell*. 71:741-753.
- Maurer, M.E., and J.A. Cooper. 2005. Endocytosis of megalin by visceral endoderm cells requires the Dab2 adaptor protein. *Journal of Cell Science*. 118:5345-5355.
- May, P., Y.K. Reddy, and J. Herz. 2002. Proteolytic Processing of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Mediates Regulated Release of Its Intracellular Domain. *Journal of Biological Chemistry*. 277:18736-18743.
- McFarlane, A.S. 1958. Efficient Trace-labelling of Proteins with Iodine. Nature. 182:53-53.
- Mellman, I. 1996. ENDOCYTOSIS AND MOLECULAR SORTING. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 12:575-625.
- Mellman, I., and W.J. Nelson. 2008. Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:833-845.
- Meredith, M. 1988. Rat hepatocytes prepared without collagenase: Prolonged retention of differentiated characteristics in culture. *Cell Biol Toxicol.* 4:405-425.
- Mishra, S.K., P.A. Keyel, M.J. Hawryluk, N.R. Agostinelli, S.C. Watkins, and L.M. Traub. 2002a. Disabled-2 exhibits the properties of a cargo-selective endocytic clathrin adaptor. *The EMBO Journal*. 21:4915-4926.
- Mishra, S.K., S.C. Watkins, and L.M. Traub. 2002b. The autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein interfaces directly with the clathrin-coat machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99:16099-16104.

- Moestrup, S.K., and J. Gliemann. 1989. Purification of the rat hepatic alpha 2macroglobulin receptor as an approximately 440-kDa single chain protein. *Journal of Biological Chemistry*. 264:15574-15577.
- Mortimer, B.-C., D.J. Beveridge, I.J. Martins, and T.G. Redgrave. 1995. Intracellular Localization and Metabolism of Chylomicron Remnants in the Livers of Low Density Lipoprotein Receptor-deficient Mice and ApoE-deficient Mice: EVIDENCE FOR SLOW METABOLISM VIA AN ALTERNATIVE apoE-DEPENDENT PATHWAY. Journal of Biological Chemistry. 270:28767-28776.
- Mu, F.-T., J.M. Callaghan, O. Steele-Mortimer, H. Stenmark, R.G. Parton, P.L. Campbell, J. McCluskey, J.-P. Yeo, E.P.C. Tock, and B.-H. Toh. 1995. EEA1, an Early Endosome-Associated Protein.: EEA1 IS A CONSERVED α-HELICAL PERIPHERAL MEMBRANE PROTEIN FLANKED BY CYSTEINE "FINGERS" AND CONTAINS A CALMODULIN-BINDING IQ MOTIF. Journal of Biological Chemistry. 270:13503-13511.
- Mukuddem-Petersen, J., W. Oosthuizen, and J.C. Jerling. 2005. A Systematic Review of the Effects of Nuts on Blood Lipid Profiles in Humans. *The Journal of Nutrition*. 135:2082-2089.
- Muretta, J.M., and C.C. Mastick. 2009. Chapter 10 How Insulin Regulates Glucose Transport in Adipocytes. *In* Vitamins & Hormones. Vol. Volume 80. L. Gerald, editor. Academic Press. 245-286.
- Nakamura, N., C. Rabouille, R. Watson, T. Nilsson, N. Hui, P. Slusarewicz, T.E. Kreis, and G. Warren. 1995. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *The Journal of Cell Biology*. 131:1715-1726.
- Nielsen, M.S., P. Madsen, E.I. Christensen, A. Nykjær, J. Gliemann, D. Kasper, R. Pohlmann, and C.M. Petersen. 2001. The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi– endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *The EMBO Journal.* 20:2180-2190.
- Nilsson, S.K., F. Anderson, M. Ericsson, M. Larsson, E. Makoveichuk, A. Lookene, J. Heeren, and G. Olivecrona. 2012. Triacylglycerol-rich lipoproteins protect lipoprotein lipase from inactivation by ANGPTL3 and ANGPTL4. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1821:1370-1378.
- Nordestgaard, B.G., M. Benn, P. Schnohr, and A. Tybjærg-Hansen. 2007. NOnfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA*. 298:299-308.
- Norman, D., X.-M. Sun, M. Bourbon, B.L. Knight, R.P. Naoumova, and A.K. Soutar. 1999. Characterization of a novel cellular defect in patients with phenotypic homozygous familial hypercholesterolemia. *The Journal of Clinical Investigation*. 104:619-628.
- Nothwehr, S.F., P. Bruinsma, and L.A. Strawn. 1999. Distinct Domains within Vps35p Mediate the Retrieval of Two Different Cargo Proteins from the Yeast Prevacuolar/Endosomal Compartment. *Molecular Biology of the Cell*. 10:875-890.
- Nothwehr, S.F., S.-A. Ha, and P. Bruinsma. 2000. Sorting of Yeast Membrane Proteins into an Endosome-to-Golgi Pathway Involves Direct Interaction of Their Cytosolic Domains with Vps35p. *The Journal of Cell Biology*. 151:297-310.
- Oleinikov, A.V., J. Zhao, and S.P. Makker. 2000. Cytosolic adaptor protein Dab2 is an intracellular ligand of endocytic receptor gp600/megalin. *Biochem. J.* 347:613-621.
- Owen, D.J., Y. Vallis, B.M.F. Pearse, H.T. McMahon, and P.R. Evans. 2000. The structure and function of the β2-adaptin appendage domain. *The EMBO Journal*. 19:4216-4227.
- Panagiotakos, D., C. Pitsavos, Y. Skoumas, Y. Lentzas, L. Papadimitriou, C. Chrysohoou, and C. Stefanadis. 2008. Abdominal obesity, blood glucose and apolipoprotein B levels are the best predictors of the incidence of hypercholesterolemia (2001-2006) among healthy adults: the ATTICA Study. *Lipids in Health and Disease*. 7:11.
- Parton, R.G., and K. Simons. 2007. The multiple faces of caveolae. Nat Rev Mol Cell Biol. 8:185-194.
- Pawson, T. 1995. Protein modules and signalling networks. Nature. 373:573-580.
- Pearse, B.M.F., and M.S. Robinson. 1990. Clathrin, Adaptors, and Sorting. *Annual Review of Cell Biology*. 6:151-171.
- Pelicci, G., L. Lanfrancone, F. Grignani, J. McGlade, F. Cavallo, G. Forni, I. Nicoletti, F. Grignani, T. Pawson, and P. Giuseppe Pelicci. 1992. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell.* 70:93-104.
- Perrot, G., B. Langlois, J. Devy, A. Jeanne, L. Verzeaux, S. Almagro, H. Sartelet, C. Hachet, C. Schneider, E. Sick, M. David, M. Khrestchatisky, H. Emonard, L. Martiny, and S. Dedieu. 2012. LRP-1–CD44, a New Cell Surface Complex Regulating Tumor Cell Adhesion. *Molecular and Cellular Biology*. 32:3293-3307.
- Petersen, K.F., D. Befroy, S. Dufour, J. Dziura, C. Ariyan, D.L. Rothman, L. DiPietro, G.W. Cline, and G.I. Shulman. 2003. Mitochondrial Dysfunction in the Elderly: Possible Role in Insulin Resistance. *Science*. 300:1140-1142.
- Petit, V., L. Arnould, P. Martin, M.-C. Monnot, T. Pineau, P. Besnard, and I. Niot. 2007. Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *Journal of Lipid Research*. 48:278-287.
- Pietrzik, C.U., T. Busse, D.E. Merriam, S. Weggen, and E.H. Koo. 2002. The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *The EMBO Journal*. 21:5691-5700.
- Proctor, S.D., D.F. Vine, and J.C.L. Mamo. 2002. Arterial retention of apolipoprotein B48and B100-containing lipoproteins in atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology*. 13:461-470.
- Radhakrishnan, A., J.L. Goldstein, J.G. McDonald, and M.S. Brown. 2008. Switch-like Control of SREBP-2 Transport Triggered by Small Changes in ER Cholesterol: A Delicate Balance. *Cell metabolism.* 8:512-521.
- Ranganathan, G., R. Unal, I. Pokrovskaya, A. Yao-Borengasser, B. Phanavanh, B. Lecka-Czernik, N. Rasouli, and P.A. Kern. 2006. The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *Journal of Lipid Research*. 47:2444-2450.
- Ranganathan, S., C.-X. Liu, M.M. Migliorini, C.A.F. von Arnim, I.D. Peltan, I. Mikhailenko, B.T. Hyman, and D.K. Strickland. 2004. Serine and Threonine Phosphorylation of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein by Protein Kinase Ca Regulates Endocytosis and Association with Adaptor Molecules. *Journal of Biological Chemistry*. 279:40536-40544.
- Rashid, S., D.E. Curtis, R. Garuti, N.N. Anderson, Y. Bashmakov, Y.K. Ho, R.E. Hammer, Y.-A. Moon, and J.D. Horton. 2005. Decreased plasma cholesterol and

hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102:5374-5379.

- Ravichandran, K.S., M.M. Zhou, J.C. Pratt, J.E. Harlan, S.F. Walk, S.W. Fesik, and S.J. Burakoff. 1997. Evidence for a requirement for both phospholipid and phosphotyrosine binding via the Shc phosphotyrosine-binding domain in vivo. *Molecular and Cellular Biology*. 17:5540-5549.
- Reekmans, S., T. Pflanzner, P.S.M. Gordts, S. Isbert, P. Zimmermann, W. Annaert, S. Weggen, A.M. Roebroek, and C. Pietrzik. 2010. Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:135-145.
- Roberts, R., L. Hodson, A.L. Dennis, M.J. Neville, S.M. Humphreys, K.E. Harnden, K.J. Micklem, and K.N. Frayn. 2009. Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia*. 52:882-890.
- Robinson, M.S. 1989. Cloning of cDNAs encoding two related 100-kD coated vesicle proteins (alpha-adaptins). *The Journal of Cell Biology*. 108:833-842.
- Robinson, M.S. 2004. Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends in Cell Biology*. 14:167-174.
- Roden, M. 2006. Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes[mdash]pathogenesis and clinical relevance. *Nat Clin Pract End Met.* 2:335-348.
- Rohlmann, A., M. Gotthardt, R.E. Hammer, and J. Herz. 1998. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *The Journal of Clinical Investigation*. 101:689-695.
- Rothman, J.E. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. Nature. 372:55-63.
- Ruiz, J., D. Kouiavskaia, M. Migliorini, S. Robinson, E.L. Saenko, N. Gorlatova, D. Li, D. Lawrence, B.T. Hyman, K.H. Weisgraber, and D.K. Strickland. 2005. The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *Journal of Lipid Research*. 46:1721-1731.
- Ryder, E., B. Doe, D. Gleeson, R. Houghton, P. Dalvi, E. Grau, B. Habib, E. Miklejewska, S. Newman, D. Sethi, C. Sinclair, S. Vyas, H. Wardle-Jones, J. Bottomley, J. Bussell, A. Galli, J. Salisbury, and R. Ramirez-Solis. 2014. Rapid conversion of EUCOMM/KOMP-CSD alleles in mouse embryos using a cell-permeable Cre recombinase. *Transgenic Res.* 23:177-185.
- Saftig, P., B. Schroder, and J. Blanz. 2010. Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral conditions. *Biochem Soc Trans.* 38:1420-1423.
- Schneider, W.J., P.T. Kovanen, M.S. Brown, J.L. Goldstein, G. Utermann, W. Weber, R.J. Havel, L. Kotite, J.P. Kane, T.L. Innerarity, and R.W. Mahley. 1981. Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. *The Journal of Clinical Investigation*. 68:1075-1085.
- Schroer, T.A. 2004. DYNACTIN. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 20:759-779.
- Seaman, M.N.J. 2005. Recycle your receptors with retromer. Trends in Cell Biology. 15:68-75.
- Seaman, M.N.J. 2012. The retromer complex endosomal protein recycling and beyond. Journal of Cell Science. 125:4693-4702.
- Seaman, M.N.J., E.G. Marcusson, J.L. Cereghino, and S.D. Emr. 1997. Endosome to Golgi Retrieval of the Vacuolar Protein Sorting Receptor, Vps10p, Requires the Function

of the VPS29, VPS30, and VPS35 Gene Products. *The Journal of Cell Biology*. 137:79-92.

- Seaman, M.N.J., J. Michael McCaffery, and S.D. Emr. 1998. A Membrane Coat Complex Essential for Endosome-to-Golgi Retrograde Transport in Yeast. *The Journal of Cell Biology*. 142:665-681.
- Selvais, C., L. D'Auria, D. Tyteca, G. Perrot, P. Lemoine, L. Troeberg, S. Dedieu, A. Noël, H. Nagase, P. Henriet, P.J. Courtoy, E. Marbaix, and H. Emonard. 2011. Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function. *The FASEB Journal*. 25:2770-2781.
- Semenkovich, C.F., M. Wims, L. Noe, J. Etienne, and L. Chan. 1989. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *Journal of Biological Chemistry*. 264:9030-9038.
- Sheff, D.R., E.A. Daro, M. Hull, and I. Mellman. 1999. The Receptor Recycling Pathway Contains Two Distinct Populations of Early Endosomes with Different Sorting Functions. *The Journal of Cell Biology*. 145:123-139.
- Shepherd, P.R., and B.B. Kahn. 1999. Glucose Transporters and Insulin Action Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus. New England Journal of Medicine. 341:248-257.
- Silverstein, S.C., R.M. Steinman, and Z.A. Cohn. 1977. Endocytosis. Annual Review of Biochemistry. 46:669-722.
- Solow, B.T., S. Harada, B.J. Goldstein, J.A. Smith, M.F. White, and L. Jarett. 1999. Differential Modulation of the Tyrosine Phosphorylation State of the Insulin Receptor by IRS (Insulin Receptor Subunit) Proteins. *Molecular Endocrinology*. 13:1784-1798.
- Song, H., Y. Li, J. Lee, A.L. Schwartz, and G. Bu. 2009. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Inducing the Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9. *Cancer Research*. 69:879-886.
- Sottrup-Jensen, L. 1989. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *Journal of Biological Chemistry*. 264:11539-11542.
- Springer, T.A. 1998. An extracellular β-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *Journal of Molecular Biology*. 283:837-862.
- Steinberg, F., M. Gallon, M. Winfield, E.C. Thomas, A.J. Bell, K.J. Heesom, J.M. Tavaré, and P.J. Cullen. 2013. A global analysis of SNX27–retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. *Nat Cell Biol.* 15:461-471.
- Stockinger, W., B. Sailler, V. Strasser, B. Recheis, D. Fasching, L. Kahr, W.J. Schneider, and J. Nimpf. 2002. The PX-domain protein SNX17 interacts with members of the LDL receptor family and modulates endocytosis of the LDL receptor. *The EMBO Journal.* 21:4259-4267.
- Swift, L.L., M.H. Farkas, A.S. Major, K. Valyi-Nagy, M.F. Linton, and S. Fazio. 2001. A Recycling Pathway for Resecretion of Internalized Apolipoprotein E in Liver Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 276:22965-22970.

- Takayama, Y., and T. Takezawa. 2006. Lactoferrin promotes collagen gel contractile activity of fibroblasts mediated by lipoprotein receptors This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 7th International Conference on Lactoferrin: Structure, Function, and Applications, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*. 84:268-274.
- Takeuchi, H., M. Matsuda, T. Yamamoto, T. Kanematsu, U. Kikkawa, H. Yagisawa, Y. Watanabe, and M. Hirata. 1998. PTB domain of insulin receptor substrate-1 binds inositol compounds. *Biochem. J.* 334:211-218.
- Temkin, P., B. Lauffer, S. Jager, P. Cimermancic, N.J. Krogan, and M. von Zastrow. 2011. SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nat Cell Biol.* 13:715-721.
- ter Haar, E., S.C. Harrison, and T. Kirchhausen. 2000. Peptide-in-groove interactions link target proteins to the β-propeller of clathrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97:1096-1100.
- Tremblay, F., C. Lavigne, H. Jacques, and A. Marette. 2001. Defective Insulin-Induced GLUT4 Translocation in Skeletal Muscle of High Fat–Fed Rats Is Associated With Alterations in Both Akt/Protein Kinase B and Atypical Protein Kinase C ( $\zeta/\lambda$ ) Activities. *Diabetes*. 50:1901-1910.
- Trommsdorff, M., J.-P. Borg, B. Margolis, and J. Herz. 1998. Interaction of Cytosolic Adaptor Proteins with Neuronal Apolipoprotein E Receptors and the Amyloid Precursor Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 273:33556-33560.
- Trommsdorff, M., M. Gotthardt, T. Hiesberger, J. Shelton, W. Stockinger, J. Nimpf, R.E. Hammer, J.A. Richardson, and J. Herz. 1999. Reeler/Disabled-like Disruption of Neuronal Migration in Knockout Mice Lacking the VLDL Receptor and ApoE Receptor 2. *Cell*. 97:689-701.
- Uhlik, M.T., B. Temple, S. Bencharit, A.J. Kimple, D.P. Siderovski, and G.L. Johnson. 2005. Structural and Evolutionary Division of Phosphotyrosine Binding (PTB) Domains. *Journal of Molecular Biology*. 345:1-20.
- van der Bliek, A., T. Redelmeier, H. Damke, E. Tisdale, E. Meyerowitz, and S. Schmid. 1993. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *The Journal of Cell Biology*. 122:553-563.
- van der Sluijs, P., M. Hull, P. Webster, P. Mâle, B. Goud, and I. Mellman. 1992. The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell.* 70:729-740.
- Van Gaal, L.F., I.L. Mertens, and C.E. De Block. 2006. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 444:875-880.
- van Kerkhof, P., J. Lee, L. McCormick, E. Tetrault, W. Lu, M. Schoenfish, V. Oorschot, G.J. Strous, J. Klumperman, and G. Bu. 2005. Sorting nexin 17 facilitates LRP recycling in the early endosome. *The EMBO Journal*. 24:2851-2861.
- von Eckardstein, A., J.-R. Nofer, and G. Assmann. 2001. High Density Lipoproteins and Arteriosclerosis: Role of Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 21:13-27.
- Wade, D.P., B.L. Knight, and A.K. Soutar. 1988. Hormonal regulation of low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human hepatoma Hep G2 cells. *European Journal of Biochemistry*. 174:213-218.

- Wang, B., M. Zhang, Y.-h. Ni, F. Liu, H.-q. Fan, L. Fei, X.-q. Pan, M. Guo, R.-h. Chen, and X.-r. Guo. 2006. Identification and characterization of NYGGF4, a novel gene containing a phosphotyrosine-binding (PTB) domain that stimulates 3T3-L1 preadipocytes proliferation. *Gene*. 379:132-140.
- Wang, H., and R.H. Eckel. 2009. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism. 297:E271-E288.
- Wang, L.-J., and B.-L. Song. 2012. Niemann–Pick C1-Like 1 and cholesterol uptake. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 1821:964-972.
- Watson, R.T., A.H. Khan, M. Furukawa, J.C. Hou, L. Li, M. Kanzaki, S. Okada, K.V. Kandror, and J.E. Pessin. 2004. Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin-responsive storage compartment is GGA dependent. *The EMBO Journal*. 23:2059-2070.
- Williams, K.J. 2008. Molecular processes that handle and mishandle dietary lipids. *The Journal of Clinical Investigation*. 118:3247-3259.
- Willnow, T., Z. Sheng, S. Ishibashi, and J. Herz. 1994a. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science*. 264:1471-1474.
- Willnow, T.E., K. Orth, and J. Herz. 1994b. Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein. *Journal of Biological Chemistry*. 269:15827-15832.
- Willnow, T.E., A. Rohlmann, J. Horton, H. Otani, J.R. Braun, R.E. Hammer, and J. Herz. 1996. RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. *Embo J.* 15:2632-2639.
- Wu, W.L., W.H. Gan, M.L. Tong, X.L. Li, J.Z. Dai, C.M. Zhang, and X.R. Guo. 2011. Over-expression of NYGGF4 (PID1) inhibits glucose transport in skeletal myotubes by blocking the IRS1/PI3K/AKT insulin pathway. *Molecular Genetics and Metabolism.* 102:374-377.
- Yang, T., P.J. Espenshade, M.E. Wright, D. Yabe, Y. Gong, R. Aebersold, J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 2002. Crucial Step in Cholesterol Homeostasis: Sterols Promote Binding of SCAP to INSIG-1, a Membrane Protein that Facilitates Retention of SREBPs in ER. *Cell.* 110:489-500.
- Yu, J.W., and M.A. Lemmon. 2001. All Phox Homology (PX) Domains from Saccharomyces cerevisiae Specifically Recognize Phosphatidylinositol 3-Phosphate. *Journal of Biological Chemistry*. 276:44179-44184.
- Yun, M., L. Keshvara, C.-G. Park, Y.-M. Zhang, J.B. Dickerson, J. Zheng, C.O. Rock, T. Curran, and H.-W. Park. 2003. Crystal Structures of the Dab Homology Domains of Mouse Disabled 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry*. 278:36572-36581.
- Zeng, X.-Q., C.-M. Zhang, M.-L. Tong, X. Chi, X.-L. Li, C.-B. Ji, R. Zhang, and X.-R. Guo. 2012. Knockdown of NYGGF4 increases glucose transport in C2C12 mice skeletal myocytes by activation IRS-1/PI3K/AKT insulin pathway. J Bioenerg Biomembr. 44:351-355.
- Zhang, C.-m., X.-h. Chen, B. Wang, F. Liu, X. Chi, M.-l. Tong, Y.-h. Ni, R.-h. Chen, and X.-r. Guo. 2008. Over-expression of NYGGF4 inhibits glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via attenuated phosphorylation of IRS-1 and Akt. *Acta Pharmacol Sin.* 30:120-124.
- Zhang, C.-M., X.-Q. Zeng, R. Zhang, C.-B. Ji, M.-L. Tong, X. Chi, X.-L. Li, J.-Z. Dai, M. Zhang, Y. Cui, and X.-R. Guo. 2010. Effects of NYGGF4 knockdown on insulin

sensitivity and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. J Bioenerg Biomembr. 42:433-439.

- Zhao, Y.-p., C.-m. Zhang, C. Zhu, X.-h. Chen, J.-l. Wang, C.-b. Ji, X. Chi, Q. Hong, Y.-z. Peng, and X.-r. Guo. 2010. NYGGF4 homologous gene expression in 3T3-L1 adipocytes: regulation by FFA and adipokines. *Mol Biol Rep.* 37:3291-3296.
- Zuliani, G., M. Arca, A. Signore, G. Bader, S. Fazio, M. Chianelli, S. Bellosta, F. Campagna, A. Montali, M. Maioli, A. Pacifico, G. Ricci, and R. Fellin. 1999. Characterization of a New Form of Inherited Hypercholesterolemia: Familial Recessive Hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 19:802-809.
- Zurhove, K., C. Nakajima, J. Herz, H.H. Bock, and P. May. 2008. {gamma}-Secretase Limits the Inflammatory Response Through the Processing of LRP1. *Sci. Signal.* 1:ra15-.

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfstmittel benutzt habe.

Withwalles

Hamburg, den 13. Februar 2014

## Danksagung

An dieser Stelle wird es endlich Zeit mich bei allen zu bedanken, die in irgendeiner Weise zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und mich unterstützt haben.

Anfangen möchte ich dabei bei **Jörg Heeren**, der mir dieses spannende Thema vor drei Jahren bereitgestellte. Ich bedanke mich für die tolle Unterstützung und das Vertrauen, das du mir in der ganzen Zeit entgegengebracht und die Freiräume, die du mir bei meiner Arbeit gelassen hast. Auch **Hartwig Schmale** gilt mein größter Dank, für die vielen Besprechungen und seine Geduld. Ich möchte mich auch bei **Prof. Dr. Iris Bruchhaus** vom BNI für die Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Ich danke natürlich meiner gesamten Arbeitsgruppe. Im Besonderen möchte ich mich bei meinem Büro bedanken. Kristina Gottschling, Clara John, Brigitte Müller, ihr seid nicht nur Kolleginnen, sondern über die Zeit auch Freundinnen geworden. Danke, dass wir die größten Höhen und Tiefen im Laboralltag und auch bei privaten Themen miteinander erleben durften. Um bei Freunden zu bleiben, möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Mädels bedanken. Elena, Larry, Claudi, Jessi, danke dass ihr immer für mich da seid, auch wenn ich das manchmal nicht so gesehen habe. Auch Heike möchte ich an dieser Stelle danken, sie hat immer ein offenes Ohr am Telefon und jede Reise nach Hannover war großartig. Danke!

Ich bedanke mich auch bei Anette Rosche und Sandra Ehret, ihr habt mir bei allen technischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ich möchte mich auch bei Eva-Maria Azizi dafür bedanken, dass sie die Mäuse so häufig mit mir gebändigt hat. Nicht zu vergessen, mein Dank an Walter Tauscher als besten Trainer, Markus Heine für die Unterstützung im Labor und die moralische Unterstützung, Ludger Scheja für Diskussionen und Tipps. Allen anderen Kollegen und ehemaligen Kollegen, Birgit, Leah, Denise, Luci, Anna, Nils, Gabriella, Barbara, Klaus, Christian S., Alex und Dieter danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und natürlich Lisa und Christian K. für die Entstehung des Nutella-Clubs. Auch bei Christine Runge möchte ich mich dafür bedanken, dass man sich auf sie verlassen kann und dafür, dass es Pepe gibt.

Weiterhin möchte ich mich auch beim **Graduiertenkolleg 1459** für die finanzielle Unterstützung und die Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizonts in anderen Bereichen der großen, weiten Welt der Forschung bedanken. In diesem Rahmen bedanke ich mich auch für den Englandaufenthalt im Labor von **Prof. David Owen** in Cambridge. Danke, **David** und deinem Labor für die Unterstützung und Möglichkeiten während meines Aufenthalts. Außerdem danke ich **Thomas Braulke** für die Unterstützung und vielfältigen Aufgaben im GRK.

Zu guter Letzt danke ich noch meiner Familie dafür, dass es sie gibt! Danke!!!