

**Die Rolle des**  
***low density lipoprotein receptor-related protein 1***  
**im humanen Lipoproteinstoffwechsel**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Departments Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

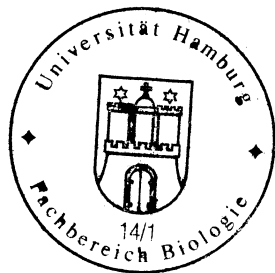
**Alexander Laatsch**

aus Lüneburg

Hamburg  
2005

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Frau Professor Dr. U. BEISIEGEL  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH  
Tag der Disputation: 25. November 2005

Hamburg, den 11. November 2005



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Arno Frühwald".

Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

## Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Einleitung .....	7
1.1 Lipoproteinstoffwechsel.....	8
1.1.1 Übersicht über den Lipoproteinstoffwechsel.....	8
1.1.2 Postprandialer Lipoproteinstoffwechsel.....	12
1.2 Low density lipoprotein receptor-related protein 1.....	15
1.2.1 LRP1 als Endozytose-Rezeptor .....	17
1.2.2 LRP1 als Signalrezeptor .....	19
1.3 RNA-Interferenz.....	23
1.4 Fragestellung und methodischer Ansatz .....	24
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Material.....	26
2.2 Methoden.....	29
2.3 Lösungen.....	42
3 Ergebnisse.....	46
3.1 Molekularbiologische Werkzeuge .....	46
3.1.1 GFP-fusioniertes LRP1.....	46
3.1.2 RNA-Interferenz gegen LRP1 .....	55
3.2 Zellbiologie von LRP1.....	58
3.2.1 Intrazelluläre Lokalisation von LRP1 und LRP1-EGFP .....	58
3.2.2 Morphologie des LRP1-Kompartiments.....	60
3.2.3 Aufnahme von RAP .....	64
3.3 Postprandiale Effekte von LRP1 .....	66
3.3.1 Insulinabhängige Translokation von LRP1.....	66
3.3.2 Aufnahme von Chylomikronen-Remnants und Recycling von ApoE.....	70
4 Diskussion .....	80
4.1 Überexpression und RNAi-vermittelte Repression von LRP1.....	80
4.2 Zellbiologie von LRP1.....	85
4.3 LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel.....	88
4.4 Modell: LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel .....	95
Zusammenfassung.....	97
Abbildungsverzeichnis .....	98
Literaturverzeichnis.....	99
Anhang .....	109

Publikationen und Auszeichnungen

Danksagung

## Abkürzungsverzeichnis

### Fachsprachliche Abkürzungen und Bezeichnungen

Dieses Verzeichnis umfaßt die in der vorliegenden Arbeit verwendeten fachsprachlichen Abkürzungen und Kurzbezeichnungen. Angloamerikanische Kürzel wurden, soweit gebräuchlich, ins Deutsche übertragen. Wo dies sinnvoll erschien, werden einzelne Bezeichnungen, z. B. von Zelllinien, statt dessen inhaltlich erklärt.

A $\beta$ .....	$\beta$ -Amyloid-Peptid	EDTA.....	Ethylendinitrietetraessigsäure
ABCA1.....	ATP Binding Cassette Trans- porter A1	EEA1.....	Early Endosomal Antigen 1 (Marker für frühe Endosomen)
ACAT.....	Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase	EGF.....	Epidermal Growth Factor
AK.....	Antikörper	EGFP.....	Enhanced Green Fluorescent Protein
$\alpha_2$ M*	aktiviertes $\alpha_2$ -Makroglobulin	ER.....	Endoplasmatisches Retikulum
AmpR.....	Ampicillin-Resistenz	FCS.....	Fötales Rinderserum
AP1.....	Adaptor-related Protein 1 (Golgi-Marker)	FFA.....	freie Fettsäuren
AP2.....	Adaptor-related Protein 2	GAPDH.....	Glycerinaldehyd-3-phosphat- dehydrogenase
ApoAI.....	Apolipoprotein A-I	GentR.....	Gentamicin-Resistenz
ApoAV.....	Apolipoprotein A-V	GLUT4.....	Glukosetransporter 4
ApoB48.....	Apolipoprotein B-48	H1.....	Histon H1
ApoCII.....	Apolipoprotein C-II	HDL.....	High Density Lipoprotein
ApoE.....	Apolipoprotein E	HDL*	mit Cy5 fluoreszenzmarkierte HDL
ApoE*	mit Cy3 oder Cy5 fluoreszenz- markiertes Apolipoprotein E	HEK293.....	humane embryonale Nierenzelllinie mit stabil transfizierter adenoviraler E1-Genregion
ApoE2,-3,-4	Apolipoprotein E Isoform 2, 3, 4	HEPES.....	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl]-ethansulfonsäure
ApoER2.....	Apolipoprotein-E-Rezeptor 2	HIV.....	Human Immunodeficiency Virus
Apo-Lp.....	Apolipoprotein	HLP-III.....	Hyperlipoproteinämie Typ III
APP.....	Amyloid Precursor Protein	hsMSC.....	humane, mesenchymale Stamm- zellen (adipozytär differenzierbar)
BSA.....	Rinderserumalbumin	HSPG.....	Heparansulfatproteoglykan
cDNA.....	revers transkribierte mRNA	HuH7.....	humane Hepatomzelllinie
CE.....	Cholesterolester	IDL.....	Intermediate Density Lipoprotein
CETP.....	Cholesterol-Ester-Transfer-Protein	KanR.....	Kanamycin-Resistenz
Chol.....	Cholesterol	LAMP1.....	Lysosomal-associated Membrane Protein 1 (lysosomaler Marker)
CM.....	Chylomikronen	LCAT.....	Lecithin: Cholesterol Acyltransferase
CMV.....	Cytomegalievirus	LDL.....	Low Density Lipoprotein
CR.....	Chylomikronen-Remnants	LDLR.....	Low Density Lipoprotein-Rezeptor
Ct-Wert.....	Threshold Cycle (s. qPCR, S. 34)	Lp.....	Lipoprotein
DAPI.....	4',6-Diamidino- 2-phenylindoldihydrochlorid	LpL.....	endotheliale Lipoproteinlipase
DiI.....	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'- tetramethylindocarbocyanin- Perchlorat, fluoreszierendes Lipid	LRP1.....	LDL Receptor-related Protein 1
dNTP.....	Desoxynukleotid-5'-triphosphat	LSM.....	Laserscanning-Mikroskopie
dsDNA.....	doppelsträngige DNA	LXR.....	Liver X Receptor
dsRNA.....	doppelsträngige RNA	miRNA.....	mikro-RNA
DTT.....	1,4-Dithiothreitol	M-MLV.....	Moloney Murine Leukemia Virus
ECFP.....	Enhanced Cyan Fluorescent Protein	MMP.....	Matrixmetalloproteinase
ECM.....	extrazelluläre Matrix		



NBD-Chol.	22-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-23,24-bisnor-5-cholen-3 $\beta$ -ol, fluoreszierendes Cholesterolderivat	shRNA	small hairpin RNA
ORF	Open Reading Frame	siRNA	small interfering RNA
PAA	Polyacrylamid	SMC	Smooth Muscle Cell
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	Snx17	Sorting Nexin 17
PBS	Phosphate-Buffered Saline	SR-B1	Scavenger Receptor Class B Type 1
PCR	Polymerase Kettenreaktion	Src-Kinase	Onkogenprodukt des Rous Sarcoma Virus; zelluläre Kinase-Familie
PDGF	Platelet-derived Growth Factor	SV40-PolyA	Polyadenylierungssignal des Simianvirus Typ 40
PEA	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin A	SYBR Green	Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis von dsDNA
PIC	Protease Inhibitor Cocktail	TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
PL	Phospholipid	TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
PMT	Photo multiplier tube	TERT	durch stabile Telomerase-Expression immortalisierte hsMSC
polh	Polyhedrin	TG	Triacylglycerol
POC	Perfusion, Open and Closed cultivation	tPA	<i>tissue-type</i> Plasminogen Aktivator
PPAR $\gamma$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
PPD	1,4-Phenylendiamin	TRIS/HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
qPCR	quantitative PCR	uPA	<i>urokinase-type</i> Plasminogen Aktivator
RAP	Receptor-associated Protein	VLDL	Very Low Density Lipoprotein
RAP*	mit Alexa488 oder Cy3 fluoreszenzmarkiertes, rekombinantes RAP	v/v	Volumen/Volumen
rApoE	rekombinantes Apolipoprotein E	w/v	Masse/Volumen
RISC	RNA-induced Silencing Complex	WU	Weiss Unit
RNAi	RNA-Interferenz	X-Gal	5-Brom-4-chlorindolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ROX	passives qPCR-Referenzfluorophor	ZNS	Zentrales Nervensystem
rpm	Umdrehungen pro Minute		
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
Sf9	Zelllinie aus <i>Spodoptera frugiperda</i>		

### Weitere Abkürzungen

bzw.	beziehungsweise	u. a.	unter anderem
ca.	circa	usw.	und so weiter
d. h.	das heißt	u. U.	unter Umständen
ggf.	gegebenenfalls	vgl.	vergleiche
s.	siehe	vs.	versus
S.	Seite	z. B.	zum Beispiel
s. o.	siehe oben	z. T.	zum Teil
s. u.	siehe unten		

## Schreibweisen

Aus Gründen der Übersichtlichkeit, insbesondere bei Aufzählungen rationaler Zahlen, wird in der gesamten Arbeit statt des Dezimalkommas der angloamerikanische Dezimalpunkt verwendet.

Die Nomenklatur der Restriktionsenzyme, insbesondere der Verzicht auf die früher übliche Kursivsetzung der ersten drei Buchstaben, die sich aus dem Namen der Wirtsspezies ableiten, orientiert sich an einschlägigen Journalen (z. B. „Nucleic Acids Research“), die mittlerweile die von Roberts et al. (2003) publizierte Nomenklatur verwenden.

Ein Doppelpunkt vor der Bezeichnung eines Restriktionsenzym steht für „geschnitten mit“.

Ein Schrägstrich zwischen Enzymen zeigt eine gleichzeitige Inkubation an, ein Komma eine sequentielle.

# 1 Einleitung

Das low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) ist im Menschen nahezu ubiquitär exprimiert. Es steht in evolutiver und struktureller Verwandtschaft mit vielen Proteinen und Proteinfamilien quer durch die Stämme des Tierreichs und nimmt verschiedenste Aufgaben wahr, von denen ein Großteil vermutlich noch unentdeckt ist. Aufgrund der komplexen Zusammenhänge, in denen LRP1 zu sehen ist und die im Rahmen einer Promotionsarbeit nicht als Ganzes bearbeitet werden können, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit der Rolle von LRP1 im humanen Lipoproteinstoffwechsel. Da die Leber das zentrale Organ des Lipoproteinstoffwechsels ist und zugleich eine hohe LRP1-Expression besitzt, liegt der Schwerpunkt der durchgeführten Untersuchungen auf der Funktion von hepatischem LRP1.

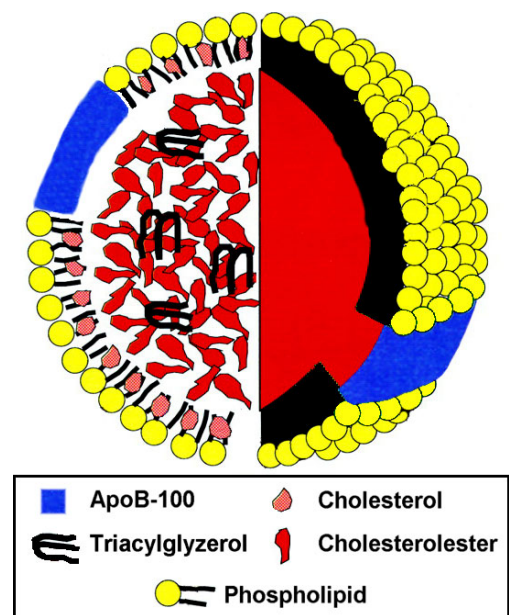
Über die genaue Funktion von LRP1 im Lipoproteinstoffwechsel, insbesondere in Abgrenzung zu anderen Rezeptoren, ist noch wenig bekannt. Dies mag zwei Gründe haben, die in den nachfolgenden Kapiteln näher ausgeführt werden: Zum einen wurde LRP1 relativ spät entdeckt, denn bis Anfang der 90er Jahre konzentrierte sich die mit einem Nobelpreis (für M. S. Brown und J. L. Goldstein, 1985) ausgezeichnete Lipoprotein-Forschung in großen Teilen auf den LDL-Rezeptor. Zum anderen stellte sich LRP1 als experimentell sehr schwer zugänglich heraus. Dies lag nicht zuletzt an seiner Größe von 600 kD, die zu Beginn der 90er Jahre noch eine methodische Herausforderung war und molekularbiologische Ansätze fast unmöglich machte. Eine etwa zehn Jahre später erhaltene *knockout*-Maus erwies sich homozygot als embryonal letal, ein Rückschlag, der das Interesse an LRP1, gemessen an der Zahl der Publikationen, nachhaltig dämpfte. Vor ungefähr fünf Jahren erlebte LRP1 durch die aufkommende Forschung zur Signaltransduktion eine Renaissance. Seitdem konzentrieren sich die Untersuchungen an LRP1 hauptsächlich auf die Rolle von LRP1 im Zusammenhang mit Signalwegen in extrahepatischen Geweben und auf einen möglichen Zusammenhang zwischen LRP1 und der Alzheimer-Demenz. Die vorliegende Arbeit versucht nun, mit Hilfe der mittlerweile verbesserten oder neu zur Verfügung stehenden Methoden einen neuen Anlauf zu nehmen, um die Funktion von LRP1 im Lipoproteinstoffwechsel der Leber zu charakterisieren. Überlegungen, die in den folgenden Kapiteln detailliert beschrieben sind, ließen es sinnvoll erscheinen, die spezifische Funktion von hepatischem LRP1 in der postprandialen Phase zu untersuchen, was eine weitere thematische Fokussierung bedeutete. Als Ergebnis liegt nun eine Arbeit vor, die die Rolle von hepatischem LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel des Menschen beschreibt.

## 1.1 Lipoproteinstoffwechsel

Im Zentrum dieser Arbeit steht die Funktion von LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel. Daher wird in diesem Kapitel zunächst ein allgemeiner Überblick über den Lipoproteinstoffwechsel unter besonderer Berücksichtigung der anschließend vertieft dargestellten postprandialen Phase gegeben. Die Beschreibung von LRP1 und seinen verschiedenen Funktionen folgt in Kapitel 1.2.

### 1.1.1 Übersicht über den Lipoproteinstoffwechsel<sup>1</sup>

Der Großteil der Lipide ist wasserunlöslich und benötigt daher spezielle Mechanismen, um im Blut transportiert werden zu können. Während kurzkettige Fettsäuren in der Blutbahn überwiegend an Albumin als Transportprotein gebunden vorkommen, werden die meisten anderen Lipide in Form von Lipoproteinen transportiert. Diese enthalten insbesondere Fettsäuren in Form von Triacylglycerolen (TG) oder in Cholesterolestern (CE), die die vorherrschende Transportform von Cholesterol sind, sowie Phospholipide (PL) und lipophile Vitamine. Lipoproteine bestehen aus einem hydrophoben Lipidkern, der hauptsächlich TG und CE enthält, sowie einer amphiphatischen Oberfläche aus PL, deren polare Kopfgruppen die Löslichkeit im wässrigen Milieu vermitteln (s. Abbildung 1). Eingelagert in diese Oberfläche sind verschiedene Apolipoproteine, die zum einen eine strukturell stabilisierende Funktion ausüben und zum anderen durch die Interaktion mit Enzymen und Membranrezeptoren für die Verstoffwechslung des jeweiligen Lipoproteins sorgen.



**Abbildung 1: Struktur der LDL**

LDL als klassisches Modell eines Lipoproteins besteht aus einem hydrophoben Kern (rot) mit CE und TG sowie einer amphiphatischen Oberfläche, die von PL (schwarz-gelb) gebildet wird. In die Oberfläche ist ApoB-100 eingelagert.

(Abbildung modifiziert nach Segrest et al. 2001)

Man unterscheidet mehrere Lipoproteinklassen, die sich sowohl durch ihre Größe als auch durch ihre Lipid- und Apolipoprotein-Zusammensetzung unterscheiden. Lipoproteine werden klassisch durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt, wobei ihre Dichte invers mit ihrer Größe, d. h. ihrem Lipidgehalt korreliert. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Eigenschaften der wichtigsten Lipoproteine.

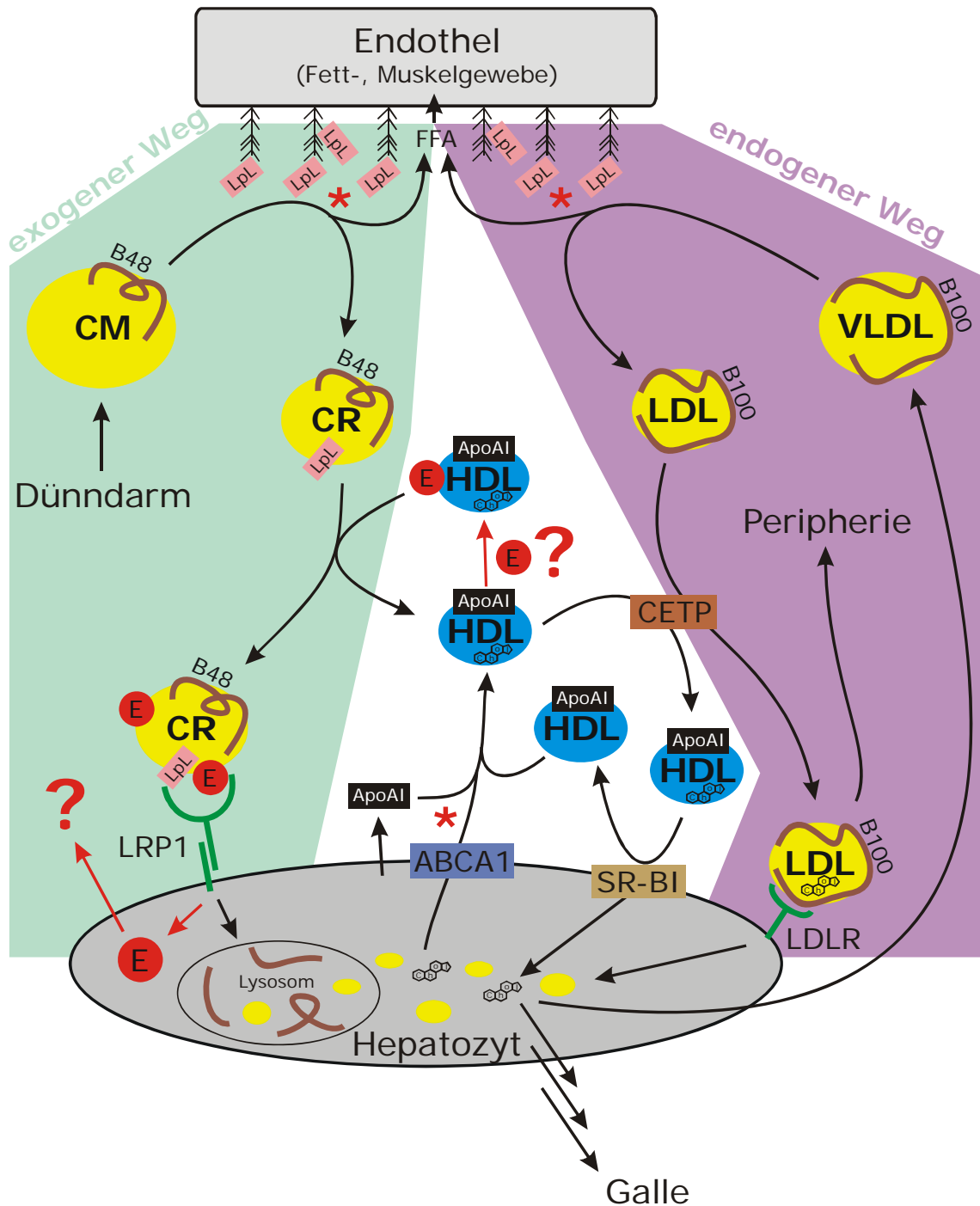
<sup>1</sup> Eine ausführliche Übersicht über den Lipoproteinstoffwechsel ist von Havel und Kane (2001) erschienen. Darin finden sich weiterführende Referenzen für die Zusammenhänge, die in diesem Kapitel dargestellt werden.

**Tabelle 1: Eigenschaften der wichtigsten Lipoproteine (nach Havel und Kane 2001)**

Lipoprotein	Dichte [g·mL <sup>-1</sup> ]	Durchmesser [nm]	Apo-Lp	Apo-Lp [%]	TG [%]	CE [%]	PL [%]	Chol [%]
Chylomikronen	~ 0.93	75 - 1200	B48	2	86	3	7	2
VLDL	0.93 - 1.006	30 - 80	B100, C	8	55	12	18	7
IDL	1.006 - 1.019	25 - 35	B100, C, E	19	23	29	19	9
LDL	1.019 - 1.063	18 - 25	B100	22	6	42	22	8
HDL	1.063 - 1.3	5 - 12	A, C, E	40 - 90	0 - 5	0 - 17	5 - 33	5

Die Klassen der wichtigsten Apolipoproteine lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: Die erste Gruppe besteht aus ApoA, ApoC und ApoE, die relativ klein (ca. 5 bis 50 kD) sind und viele amphiphatische  $\alpha$ -Helices enthalten, die auf genetischer Ebene aus Tandem-Wiederholungen von elf Codons bestehen. Die Hypothese, daß sie aus einem Ursprungsgen hervorgegangen sind, liegt aufgrund dieser Ähnlichkeit nahe, insbesondere, da sie sich auf nur zwei Gencluster verteilen (ApoCI/-II/-IV/ApoE auf Chromosom 19q3.2-q3.3 und ApoAI/-IV/-V/ApoCIII auf Chromosom 11q23-q24; Genomische Sequenz *Homo sapiens*, Build 35.1, www.ncbi.nih.gov). Diese Apolipoproteine sind in der Lage, intravaskulär zwischen einzelnen Lipoproteinpartikeln auszutauschen. Im Gegensatz dazu steht die zweite Gruppe mit ApoB48 und ApoB100. Beide Proteine werden von demselben Gen transkribiert. ApoB48, das nur aus den N-terminalen 48 % von ApoB100 besteht, entsteht durch RNA-Editing ausschließlich im Dünndarm. Dabei wird durch die Desaminierung eines spezifischen Cytosylrestes zu einem Uracylrest ein Stopcodon in die ApoB100-mRNA eingefügt (Übersicht von Anant und Davidson 2001). ApoB besteht überwiegend aus großflächigen, amphiphatischen  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die vermutlich der Grund für die feste Assoziation mit dem Lipidkern sind, so daß ApoB nicht in der Lage ist, zwischen einzelnen Lipoproteinen auszutauschen.

Der Lipoproteinstoffwechsel (schematische Übersicht in Abbildung 2) läßt sich grob in drei Bereiche einteilen: Den exogenen/postprandialen Weg (der für diese Arbeit am wichtigsten ist und in Kapitel 1.1.2 detaillierter beschrieben wird), den endogenen Weg und den Stoffwechselweg der Lipoproteine hoher Dichte (HDL). Der postprandiale Weg transportiert exogene Nahrungslipide vom Darm zur Leber sowie in Muskel- und Fettgewebe, der endogene Weg verteilt analog körpereigene Lipide aus der Leber in extrahepatische Gewebe. Der Stoffwechselweg der HDL weist Verknüpfungspunkte mit exogenem und endogenem Weg auf, ist jedoch als eigenständige Einheit zu sehen.



**Abbildung 2: Übersicht über den Lipoprotein-Stoffwechsel**

In der linken Bildhälfte ist der Weg der exogenen Nahrungslipide dargestellt, in der rechten Bildhälfte der Weg der endogenen Lipidverteilung. Der verbindende HDL-Stoffwechsel ist (ohne Berücksichtigung der Makrophagen als Cholesterolquelle) in der Mitte dargestellt. Details s. Text. Das Cholesterol-Symbol steht gleichzeitig auch für CE, die Veresterung findet in der HDL durch LCAT, zellulär durch ACAT statt. Die roten Pfeile und Fragezeichen markieren die Hauptansatzpunkte der vorliegenden Arbeit. Die roten Sternchen markieren Vorgänge, an deren Untersuchung als Nebenaspekt dieser Arbeit mitgewirkt wurde (Funktion von ApoAV bei der LpL/HSPG-vermittelten Hydrolyse und die Bedeutung von hepatischem ABCA1 für die HDL-Formation und den postprandialen Lipidstoffwechsel); diese Ergebnisse wurden für die Promotionsarbeit nicht verwendet (vgl. Publikationsliste).

Exogener und endogener Weg sind sich mechanistisch ähnlich, verwenden jedoch unterschiedliche Lipoproteine. Während Lipide im Darm in TG-reiche Chylomikronen

verpackt werden, synthetisiert die Leber ebenfalls TG-reiche VLDL für den endogenen Weg. Letztere treten, wie die Chylomikronen auch, im Kapillarbett von Muskel- und Fettgewebe mit der endothelständigen Lipoproteinlipase (LpL) in Kontakt. Einige der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten, die nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit LRP1 stehen und deshalb hier nicht dargestellt sind, sind in eine kürzlich erschienene Publikation (Merkel et al. 2005) eingeflossen, die zeigt, daß die LpL-abhängige TG-Hydrolyse durch ApoAV moduliert wird, ein Apolipoprotein, das erst 2001 beschrieben wurde (Pennacchio et al. 2001, van der Vliet et al. 2001). Die LpL hydrolysiert die TG des Lipidkerns der Chylomikronen bzw. der VLDL in Anwesenheit des Kofaktors Apolipoprotein C-II (ApoCII), und die freigesetzten FFA werden über Fettsäuretransporter in Muskel- und Fettzellen zur Energiegewinnung bzw. Speicherung aufgenommen. Die Chylomikronen verarmen dadurch an TG und werden zu kleinen, cholesterolreichen Chylomikronen-Remnants (VLDL werden analog zu LDL). Die LDL wird schließlich über den LDL-Rezeptor (LDLR), der positiv cholesterolreguliert und ubiquitär exprimiert ist, zellulär als Cholesterolquelle aufgenommen. Dieser letzte Schritt stellt einen Unterschied zum postprandialen Weg dar und ist ein klassisches Beispiel für die metabolische Steuerungsfunktion von Apolipoproteinen. Bedingt durch die Anwesenheit von ApoB48 auf CR bzw. ApoB100 auf LDL (vgl. Tabelle 1, S. 9) beruht sie mechanistisch auf den strukturellen Unterschieden zwischen diesen Apolipoproteinen: ApoB48 fehlt die C-terminal gelegene LDLR-Bindungsdomäne, so daß CR nicht ApoB-abhängig über den ubiquitären LDLR in extrahepatische Gewebe aufgenommen werden können, sondern über alternative Wege überwiegend von der Leber internalisiert werden (s. Kapitel 1.1.2).

Der HDL-Stoffwechsel ist eng mit dem Cholesteroltransport verknüpft und in seiner gesamten Komplexität in vielen Bereichen noch nicht ausreichend verstanden. Grundsätzlich ist die HDL für den „Reversen Cholesteroltransport“ verantwortlich und transportiert überschüssiges Cholesterol aus extrahepatischen Geweben zurück zur Leber, die das einzige Organ ist, das Cholesterol über die Synthese von Gallensäuren abbauen und letztlich ausscheiden kann. Lipidarme HDL-Vorstufen, deren zentraler Bestandteil ApoAI ist, werden vorrangig von der Leber sezerniert und erst im Plasma zu reifer HDL lipidiert. An diesem Prozeß ist der *ATP Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1)* in der Leber und in Makrophagen beteiligt, der den Transfer von Cholesterol aus Zellen zur HDL vermittelt. Entgegen der bisherigen Annahme, daß insbesondere ABCA1 in Makrophagen für den Erhalt des HDL-Plasmapools verantwortlich sei, konnte mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Methodik ergänzend zu den Ansätzen anderer Gruppen (Haghighpassand et al. 2001) gezeigt werden, daß das Fehlen von hepatischem ABCA1 zu einem Einbruch der HDL-Spiegel führt und überdies die postprandiale Lipidantwort inhibiert (Ragozin et al. 2005). Das auf diese Weise auf die HDL übertragene Cholesterol wird durch die *Lecithin: Cholesterol*

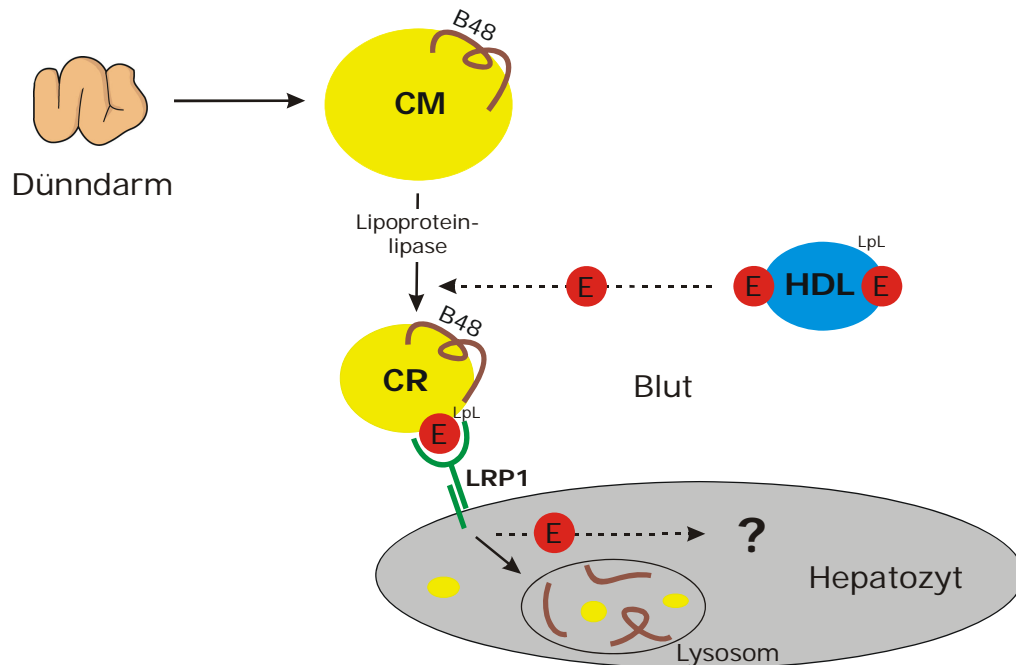
*Acyltransferase (LCAT)*, die mit der HDL assoziiert ist, mit einem Fettsäurerest aus Lecithin verestert. Die so entstandenen CE werden über den *Scavenger Receptor Class B Type 1 (SR-B1)*, der als Docking-Rezeptor für HDL fungiert, in einem „selektive CE-Aufnahme“ genannten Prozeß wieder in Hepatozyten aufgenommen. Alternativ werden sie intravaskulär durch das *Cholesterol Ester Transfer Protein (CETP)* auf LDL übertragen, die auf diese Weise eine zusätzliche Anreicherung an CE erfahren. Die so auf LDL übertragenen CE stehen für die Aufnahme in periphere Organe zur Verfügung. An dieser Stelle besteht ein entscheidender Unterschied zwischen dem Menschen und dem häufig verwendeten Modellorganismus der Maus, da kein murines Analog zum humanen CETP existiert. Folglich sind Mäuse sogenannte „HDL-Tiere“, deren Plasmacholesterol nahezu vollständig in der HDL-Fraktion vorliegt. Im Gegensatz dazu findet man im Menschen den Großteil des Cholesterols in der LDL-Fraktion. Niedrige LDL- und hohe HDL-Spiegel gehen klinisch mit einem geringen Atherosklerose-Risiko einher, da LDL leicht in Läsionen der Gefäßwand eindringt und in dorthin rekrutierte Makrophagen aufgenommen wird. Diese müssen nun die großen Mengen an aufgenommenem Cholesterol an HDL abgeben. Ist die Aufnahmekapazität der Plasma-HDL nicht ausreichend, werden die Makrophagen zu Schaumzellen, sterben ab, und es entsteht ein atherosklerotischer Plaque.

### 1.1.2 Postprandialer Lipoproteinstoffwechsel

Die Nahrungslipide, insbesondere TG und Cholesterol, werden in den Mucosazellen des Dünndarms mit amphiphatischen PL und Apolipoproteinen, im wesentlichen dem Struktur-Apolipoprotein B-48, zu Chylomikronen assoziiert (s. Abbildung 3). Diese Lipoproteinklasse mit einer Größe von 100 nm bis 1 µm wird in das Lymphsystem abgegeben und gelangt über den *Ductus thoracicus* zum *Angulus venosus*, an dem der Übergang in den Blutkreislauf stattfindet. Im Kapillarbett von Fett- und Muskelgewebe treffen die CM auf die durch Insulin in ihrer Expression und Sekretion stimulierte LpL (Spooner et al. 1979), die an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) der extrazellulären Matrix (ECM) der Endothelzellen gebunden ist und *in vivo* mit den CM assoziiert (Heeren et al. 2002). Bei Anwesenheit von ApoCII als Kofaktor der LpL werden die TG der CM hydrolysiert. Die entstehenden freien Fettsäuren (FFA) werden vom umliegenden Gewebe aufgenommen, die CM verarmen an TG, werden kleiner, und der relative Anteil an Cholesterol und CE steigt. Am Ende dieses Prozesses stehen cholesterolreiche CR, die ApoE aus HDL aufgenommen haben (Imaizumi et al. 1978, van't Hooft und Havel 1981). ApoE und LpL fungieren als Liganden insbesondere für den Membranrezeptor LRP1, der so die Aufnahme der CR in die Leber vermittelt (Beisiegel et al. 1989, Hussain et al. 1991, Beisiegel et al. 1991, Vergés et al. 2004). Dieser Prozeß geschieht sehr schnell, die Halbwertszeit von CR im Blut beträgt nur



wenige Minuten (Shafi et al. 1994). In Mäusen ist nach Injektion von CR mit radioaktiv markierten CE bereits nach 20 Minuten eine quantitative Aufnahme der Radioaktivität in die Leber erfolgt (Qiu et al. 1998).



### Abbildung 3: Postprandialer Lipoprotein-Stoffwechsel

Nahrungslipide (gelb) werden im Darm mit ApoB48 zu CM komplexiert und gelangen in die Blutbahn. Am Endothel treffen sie auf LpL, die die TG des CM-Kerns spaltet und freisetzt, so daß CM in CR umgewandelt werden. Diese werden mit ApoE aus HDL angereichert, das zusammen mit der partikelgebundenen LpL die Aufnahme der CR über LRP1 in die Leber vermittelt. Intrazellulär wird ApoB48 zusammen mit dem Lipid-Kern lysosomal abgebaut. ApoE entgeht dem Abbau auf bislang unbekannte Weise und wird nach dem Wissensstand zu Beginn dieser Arbeit auf ebenfalls unbekannte Weise von der Zelle wieder abgegeben. Details s. Text.

Das für die zelluläre Aufnahme von CR benötigte ApoE (Plump et al. 1992, Zhang et al. 1992) kommt beim Menschen in den drei Isoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4 vor (Weisgraber et al. 1981). Die häufigste Isoform, ApoE3 (Zannis und Breslow 1981), besitzt an Position 112 ein Arginin und an Position 158 ein Cystein, während ApoE2 an beiden Positionen ein Cystein und ApoE4 an beiden Positionen ein Arginin aufweist (Weisgraber et al. 1981).

ApoE2 bindet im Vergleich mit ApoE3 den LDLR praktisch nicht (Schneider et al. 1981, Weisgraber et al. 1982). Homozygote Träger des  $\epsilon 2$ -Allels sollten daher aufgrund des Ausfalls eines Aufnahmeweges eine Hyperlipoproteinämie Typ III (HLP-III, erhöhte Remnant-Lipoproteine) entwickeln, die mit erhöhten TG-Werten im Serum und einem erhöhten Atherosklerose-Risiko einhergeht. Das klinische Bild stellt sich jedoch wesentlich komplexer dar, und tatsächlich liegt in 95 % der Fälle nur eine Dyslipoproteinämie vor (Utermann et al. 1977, Übersicht von Mahley et al. 1999). Die Prävalenz ändert sich in diesem Personenkreis jedoch deutlich beim Auftreten von Diabetes mellitus Typ II: Die Zahl der HLPs, insbesondere der HLP-III, nimmt nach

Manifestation des Diabetes zu (Eto et al. 1989). Die Mechanismen, die diesen klinischen Beobachtungen zugrunde liegen, sind bislang nicht bekannt. Ji et al. (1994) vermuten, daß eine HSPG-vermittelte ApoE2-Aufnahme die Ausprägung einer HLP-III modulieren könne, jedoch vermag dieser Ansatz nicht den Zusammenhang mit Diabetes zu erklären.

Die pathophysiologische Relevanz von ApoE4 liegt in dem erhöhten Risiko, eine Alzheimer-Demenz zu entwickeln (Corder et al. 1993). Im Bereich des Lipidstoffwechsels besteht eine Assoziation mit erhöhten TG-Werten sowie hohen LDL- und niedrigen HDL-Spiegeln, die klinisch mit einem erhöhten Atherosklerose-Risiko einhergehen (Davignon et al. 1988). Verglichen mit ApoE3 hat ApoE4 gegenüber dem LDLR eine leicht erhöhte Affinität (Knouff et al. 1999) und ist mehr mit VLDL und weniger mit HDL assoziiert (Gregg et al. 1986, Weisgraber 1990). Trotz der höheren Affinität zum LDLR und einer kürzeren Plasmahalbwertszeit von ApoE4 (Gregg et al. 1986), ist die Aufnahme von CR in Personen mit ApoE4 verzögert (Bergeron und Havel 1996).

Zu Beginn dieser Arbeit waren keine publizierten Daten zur Bindungsaffinität der unterschiedlichen ApoE-Isoformen gegenüber LRP1 bekannt. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen in dieser Arbeit wurde jedoch mittlerweile von Ruiz et al. (2005) beschrieben, daß sich im Gegensatz zur Bindung an den LDLR die einzelnen Isoformen von ApoE in ihrer Affinität gegenüber LRP1 nicht unterscheiden. Dies bedeutet, daß LRP1 möglicherweise für die fehlende Bindung von ApoE2 an den LDLR kompensieren kann.

Nach der rezeptorvermittelten Endozytose der CR stellt sich der intrazelluläre Metabolismus relativ komplex dar. Im Gegensatz zum klassischen, lysosomalen Abbau der LDL (Brown und Goldstein 1986) werden nicht alle Komponenten der CR degradiert. Statt dessen desintegrieren die internalisierten CR zunächst in peripheren Endosomen, woraufhin die verschiedenen Bestandteile der Partikel unterschiedlich sortiert werden (Übersicht von Heeren und Beisiegel 2001). In humanen Hepatomzellen und Fibroblasten wurde gezeigt, daß ApoE und LpL als Bestandteile der CR zusammen mit Cholesterol und Phospholipiden in Form sogenannter 'Surface Remnants' in peripheren Endosomen verbleiben und nicht wie ApoB und der verbleibende Lipidkern lysosomal degradiert werden (Heeren et al. 1999; s. Abbildung 3, S. 13). In Übereinstimmung mit diesen Daten findet *in vivo* in Leberzellen ein reduzierter Abbau von ApoE statt (Rensen et al. 2000), das statt dessen intrazellulär an lipoproteinähnlichen Komplexen gefunden (Fazio et al. 1999) und von der Zelle sezerniert wird (Swift et al. 2001). Neben ApoE wird auch LpL *in vitro* und *in vivo* resezerniert, und beide Proteine werden anschließend im Plasma in der HDL-Fraktion gefunden (Heeren et al. 1999 und 2001). Zu Beginn dieser Arbeit wurde daher

angenommen, daß dieses sogenannte „Recycling“ von ApoE durch HDL induzierbar ist (Heeren et al. 2001).

Dem Recycling von ApoE bzw. den ‘Surface Remnants’ kommt einerseits eine Funktion bei der hepatischen Synthese der VLDL zu (Fazio et al. 1999). Andererseits wurde zu Beginn dieser Arbeit aufgrund erster Daten vermutet, daß das ApoE-Recycling wesentlich zur Regeneration ApoE-haltiger HDL und dem Cholesterol-Efflux beiträgt (Fazio et al. 2000, Heeren und Beisiegel 2001). Darüber hinaus wiesen Arbeiten mit LDLR-defizienten Zellen und Mäusen darauf hin, daß LRP1 für das Recycling verantwortlich sein könnte (Fazio et al. 1999, Heeren et al. 2001). Seitdem sind einige Hypothesen bestätigt und einige neue Zusammenhänge entdeckt worden. Da dieser Prozeß auch von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beeinflusst wurde, erfolgt die Darstellung im Rahmen der Diskussion in Kapitel 4.

## 1.2 Low density lipoprotein receptor-related protein 1

Im Jahr 1988 wurde von Herz et al. ein Zelloberflächenprotein mit einer auffallenden Sequenzhomologie zum LDL-Rezeptor und dem Vorläufer des Epidermal Growth Factor (EGF) beschrieben (Abbildung 4). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit, einer hohen Expression in der Leber und der gemeinsamen Eigenschaft, Calcium zu binden, wurde das Protein *LDL-Receptor-related Protein (LRP)* genannt und in die LDL-Rezeptor-Familie (Abbildung 5; Übersicht von Hussain et al. 1999) eingeordnet. Da mittlerweile eine Reihe sehr ähnlicher Rezeptoren entdeckt wurde, setzt sich zunehmend die auch in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung „LRP1“ für den ursprünglich als „LRP“ beschriebenen Rezeptor durch, der jedoch in immunologischen Kontexten zuweilen noch als CD91 bezeichnet wird. In der Erstbeschreibung wurde postuliert, daß es sich bei LRP1 um einen Recycling-Rezeptor des Lipoproteinstoffwechsels handelt, u. U. mit zusätzlichen Eigenschaften bei der Modulation des Zellwachstums.

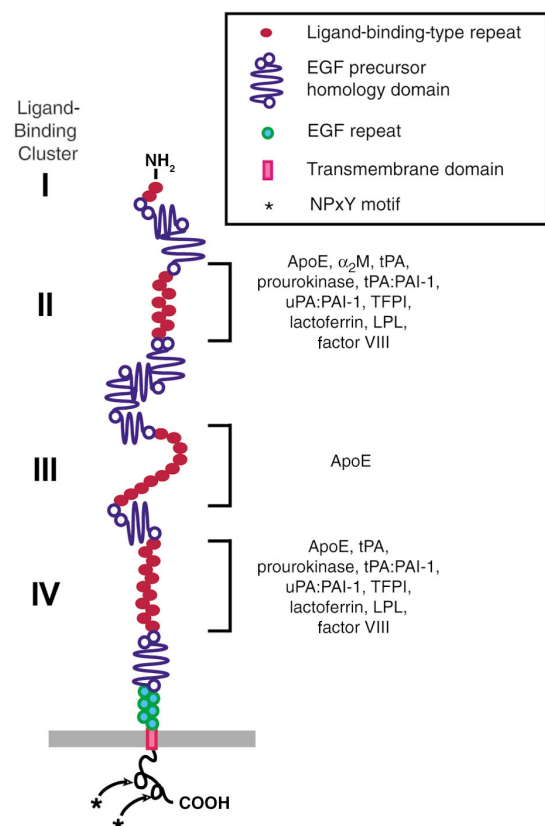
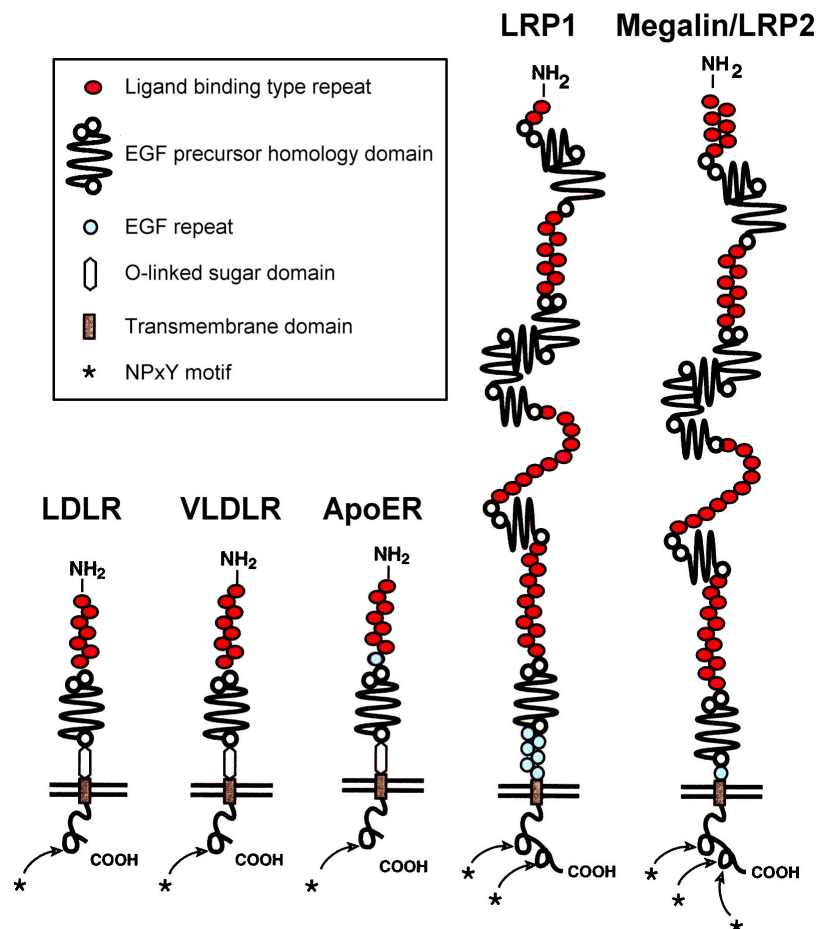


Abbildung 4: Struktur und Liganden von LRP1 (aus Übersicht von Herz und Strickland 2001)



**Abbildung 5: Wichtige Mitglieder der LDLR-Familie**

Die Mitglieder der LDLR-Familie sind durch den Aufbau aus einigen wenigen, immer wiederkehrenden strukturellen Motiven gekennzeichnet. Alle besitzen eine einzige Transmembrandomäne und mindestens ein NPXY-Motiv, das für die Endozytose und/oder eine Signaltransduktion relevant ist. Die Größenverhältnisse sind nicht maßstabsgetreu. (modifiziert nach May und Herz 2003)

LRP1 ist insbesondere in Leber und Gehirn stark exprimiert. Wie das verwandte Megalin/LRP2/gp330 ist LRP1 ca. vier- bis fünfmal so groß wie die übrigen Familienmitglieder (u. a. LDL-Rezeptor, VLDL-Rezeptor, ApoER2). Strukturell enthält es die für die Familie typischen Ligandenbindungs- und EGF-Vorläufer-Homologiedomänen im extrazellulären Teil sowie eine Transmembrandomäne und zwei NPXY-Motive in den C-terminalen 100 intrazellulären Aminosäureresten.

Ein Jahr nach der Erstbeschreibung lokalisierten Myklebost et al. (1989) das Gen für LRP1 auf Chromosom 12 im Bereich q13-14. Da dies ein bekannter Hotspot für neoplastische Mutationen ist, wurde LRP1 eine Zeit lang eine Rolle bei der Pathogenese bestimmter Tumoren zugeschrieben, tatsächlich konnte eine Beteiligung von LRP1 an chromosomalen Rearrangements jedoch nicht bestätigt werden. Die Forschung konzentrierte sich in den folgenden Jahren hauptsächlich auf die Bindung und Aufnahme extrazellulärer Liganden durch LRP1 und die Synthese von LRP1 selbst. Seit ungefähr fünf Jahren mehren sich Beobachtungen, die zeigen, daß LRP1 eine entscheidende Rolle im Rahmen der zellulären Signaltransduktion zukommt. Durch die

in diesem Zusammenhang vermutete und z. T. schon belegte Beteiligung an der neuronalen Differenzierung (Übersicht von May und Herz 2003) und Signalübertragung (Übersicht von Beffert et al. 2004), der Alzheimer-Demenz (Übersicht von Zerbinatti und Bu 2005), Zellmobilität (glatte Muskulatur der Gefäßwände, Übersicht von Herz und Hui 2004), Infektionskrankheiten (Hofer et al. 1994) und maligner Progression (Rozanov et al. 2004, Emonard et al. 2005) ist das Interesse an dem ehemals als reinem Internalisierungs-Rezeptor angesehenen LRP1 deutlich gestiegen; dieser Aufschwung der LRP1-Forschung umfaßt jedoch bisher nicht die klassische Funktion von LRP1 als Lipoproteinrezeptor in der Leber.

### 1.2.1 LRP1 als Endozytose-Rezeptor

Im Rahmen der Suche nach Liganden und Funktionen von LRP1 bestätigte sich schnell die ursprüngliche Vermutung, daß LRP1 in der Leber zusammen mit dem LDL-Rezeptor für die rezeptorvermittelte Endozytose von CR verantwortlich ist (Brown et al. 1991). Die Aufnahme wird vermittelt durch die Bindung von ApoE und LpL an LRP1 (Beisiegel et al. 1989, Kowal et al. 1989, Beisiegel et al. 1991, Vergés et al. 2004). Analog zum Aufnahmemechanismus über den LDL-Rezeptor sammeln sich nach der Bindung eines Liganden die LRP1-Moleküle in speziellen Membranbereichen, den 'clathrin-coated pits' (Übersicht von Kirchhausen 2000). Die Aufnahme wird auf der zytosolischen Membranseite durch die Anlagerung des Adaptors AP2 initiiert, der die Rezeptoren in die 'coated pits' dirigiert und die Anlagerung von Clathrin-Molekülen bewirkt, die eine netzartige Struktur unterhalb der PM bilden. Der Membranbereich stülpt sich ein, und eine mit Clathrin umhüllte Kugel bildet sich, die schließlich durch Dynamin von der PM getrennt wird. Anschließend löst sich die Clathrin-Hülle in Form von Clathrin-Monomeren wieder von dem Vesikel, das zu einem frühen Endosom wird und in dessen Lumen der pH-Wert durch den Protonentransport der vesikulären ATPase zu sinken beginnt. Der niedrige pH-Wert führt im Fall des LDL-Rezeptors zu einer Dissoziation der Bindung zu ApoB100 aus der aufgenommenen LDL, und der Rezeptor recycelt aus dem Vesikel zurück zur PM. Das verbleibende Vesikel entwickelt sich über eine weitere Ansäuerung zu einem späten Endosom und fusioniert schließlich mit Prälysosomen zu einem Lysosom, in dem der Vesikelinhalt degradiert wird.

Eine Inaktivierung von LRP1 oder ein LRP1-Knockout in der Leber führt zu einem Anstieg der cholesterinreichen Remnants in der Zirkulation von Mäusen, denen zusätzlich der LDL-Rezeptor fehlt (Willnow et al. 1994b, Rohlmann et al. 1998). In Tieren mit aktivem LDL-Rezeptor wird der Effekt aufgrund der Fähigkeit des LDLR, ebenfalls ApoE zu binden, teilweise kompensiert. Dennoch wurde auch in diesen Tieren eine Erhöhung der TG und des Cholesterols in ApoB48-haltigen Partikeln beobachtet.

Neben seiner Funktion im Lipoproteinstoffwechsel stellte sich heraus, daß LRP1 identisch mit dem  $\alpha_2$ -Makroglobulinrezeptor ist (Kristensen et al. 1990, Strickland et al. 1990). Proteasen und Protease-Inhibitor-Komplexe stellen eine große Gruppe von Liganden für LRP1 dar. Wichtige Vertreter sind aktiviertes  $\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2M^*$ ), Matrixmetalloproteinasen (MMP), tPA, uPA und PA-InhibitorI-1 (Übersicht über LRP1-Liganden mit zugehörigen Referenzen von Hussain et al. 1999 sowie Herz und Strickland 2001). Durch die häufige Beteiligung von Matrixmetalloproteinasen (Eccles et al. 1996) und dem uPA-System (Ossowski und Reich 1983) an der malignen Progression liegt ein Beitrag von LRP1 an der Kontrolle des invasiven Wachstums nahe. Tatsächlich kann bei einigen Tumoren eine Herunterregulation von LRP1 beobachtet werden (Kancha et al. 1994). Insbesondere das Wechselspiel von LRP1 und MMPs ist daher im Bereich der Tumorbilogie von großem Interesse (Rozanov et al. 2004, Emonard et al. 2005).

Zusätzlich zu den beschriebenen Ligandenfamilien aus dem Lipoproteinstoffwechsel und den Protease-Inhibitor-Komplexen wurden im Laufe der Zeit noch eine Reihe weiterer extrazellulärer Liganden für LRP1 beschrieben. Es handelt sich dabei u. a. um die weit verbreiteten humanen Rhinoviren des Typs 2 (Hofer et al. 1994), deren Bindung durch ein synthetisches Antikörperfragment blockiert werden kann (Hodits et al. 1995), sowie einen transkriptionellen Transaktivator von HIV-1, dessen LRP1-vermittelte Aufnahme in Neuronen ruhende Viren aktivieren soll. Letzterer trägt möglicherweise zu der im Spätstadium einer HIV-Infektion beobachtbaren Demenz bei, indem er kompetitiv die Aufnahme physiologischer Liganden stört (Liu et al. 2000). Ein weiterer Ligand, der insbesondere von experimentellem Interesse für die Selektion LRP1-negativer Zellen ist, ist das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* (PEA, Willnow und Herz 1994), das seine zytotoxische Wirkung erst nach LRP1-vermitteltem Eintritt in die Zelle entfaltet.

Nachdem ein rezeptorassoziiertes Protein (RAP) aus LRP1-Präparationen charakterisiert worden war (Strickland et al. 1991), wandte man sich verstärkt der zelleigenen Synthese von LRP1 zu. Es stellte sich heraus, daß RAP unter physiologischen Bedingungen innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums (ER) an neu synthetisiertes LRP1 bindet (Bu et al. 1995). Dabei hilft es als Chaperon bei der Faltung der extrazellulären Domänen und verhindert die vorzeitige Bindung von LRP1-Liganden, die z. T. ebenfalls im ER synthetisiert werden (Willnow et al. 1995 und 1996b, Obermoeller-McCormick et al. 2001). Dementsprechend führt das Fehlen von RAP in Mäusen zu einem Phänotyp, der dem einer Inaktivierung von LRP1 vergleichbar ist (s. o., Willnow et al. 1995). Aufgrund der spezifischen Bindung von RAP an LRP1 dient die Aufnahme von extrazellulär zugegebenem RAP in vielen Experimenten als Marker für funktionelles LRP1.

Neben einer umfangreichen Glykosylierung von LRP1 besteht ein weiterer Schritt der posttranslationalen Prozessierung in einer proteolytischen Spaltung des ursprünglich ca. 600 kD großen Proteins in ein 85 kD und ein 515 kD großes Fragment durch die Protease Furin im *trans*-Golgi (Herz et al. 1990, Willnow et al. 1996a). Das 85-kD-Fragment besitzt eine Transmembrandomäne und bleibt mit dem extrazellulären 515-kD-Fragment nicht-kovalent verbunden. Die proteolytische Prozessierung scheint jedoch für die Funktion von LRP1 im Rahmen der Endozytose nicht notwendig zu sein (Befund an Hühner-LRP, Ko et al. 1998).

Mehrere Arbeitsgruppen gingen der Frage nach, wie es möglich ist, daß LRP1 eine so große Anzahl verschiedener Liganden mit hoher Affinität binden kann. In umfangreichen Studien wurde mit Hilfe von Rezeptorfragmenten versucht, die Bindungsstellen der einzelnen Liganden zu bestimmen (Willnow et al. 1994a, Neels et al. 1999, Obermoeller-McCormick et al. 2001). Abbildung 4 (S. 15) gibt einen Überblick über die Verteilung der Bindungsstellen für die verschiedenen Liganden. Von den Bindungsclustern I bis IV scheinen sich II und IV recht ähnlich zu sein, sie sind evolutionär möglicherweise aus einer Duplikation hervorgegangen. RAP ist der einzige Ligand, der an jeden der Cluster II bis IV binden kann; dem sehr kleinen Cluster I konnte bisher kein Ligand zugeordnet werden. Es sieht so aus, als ob die Bindungsflexibilität von LRP1 durch die Kooperation und Konformationsänderung der ausgedehnten, für die Bindung der Liganden notwendigen Sequenzbereiche zustande kommt.

### 1.2.2 LRP1 als Signalrezeptor

In den letzten Jahren hat sich das Spektrum an Funktionen, das LRP1 und anderen Mitgliedern der LDL-Rezeptor-Familie zugeordnet wird, deutlich erweitert (Übersicht von Willnow et al. 1999 sowie Schneider und Nimpf 2003). Über ihre Funktion als reine Endozytose-Rezeptoren hinaus kommt vielen Vertretern der Familie offenbar eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion in einer Vielzahl von Geweben zu. Insbesondere im ZNS (Übersicht von Cooper und Howell 1999 sowie Beffert et al. 2004) gelten verschiedene Zusammenhänge bereits als gesichert. Dazu zählt z. B. im Rahmen der embryonalen Hirnentwicklung die vom Signalprotein Reelin über ApoER2 und den VLDL-Rezeptor vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung des Adaptorproteins Disabled-1 (Benhayon et al. 2003), das sowohl mit Phospholipiden als auch mit den intrazellulären Domänen von LRP1 und dem LDL-Rezeptor interagieren kann (Trommsdorff et al. 1998). Ein umfangreicher Yeast-two-hybrid-Screen führte zur Identifikation einer Reihe von intrazellulären Bindungspartnern der LDL-Rezeptor-Familienmitglieder (Gotthardt et al. 2000). Der Großteil der dabei gefundenen Proteine gehört in die Gruppe bekannter Adaptor- oder Gerüstproteine mit Phosphotyrosin-Interaktionsdomänen oder ähnlichen Protein-Interaktionsdomänen, was eine intensive Verschaltung von LRP1 und seinen Verwandten mit zellulären Signalwegen vermuten läßt.

Bereits zu einem früheren Zeitpunkt wurden Hinweise gefunden, die auf eine Beteiligung von LRP1 an der Entwicklung der Alzheimer-Demenz hindeuten (Übersicht von Zerbinatti und Bu 2005). An der Pathogenese ist vermutlich die übermäßige Ablagerung des schwer löslichen Amyloid- $\beta$ -Peptids ( $A\beta$ ) beteiligt, das ein proteolytisches Fragment des in der Plasmamembran vorkommenden Amyloid-Precursor-Proteins (APP) ist (Übersicht von Gandy 2005). Freigesetzt wird  $A\beta$  letztlich durch die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase, einem Multiproteinkomplex, der Preseniline als aktive Komponenten enthält (Übersicht von Brunkan und Goate 2005). Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die Expression von inaktivem Presenilin-1 als auch die Überexpression von aktivem Presenilin-1, das mit LRP1 kolokalisiert, zum Absinken des LRP1-Levels führt (van Uden et al. 1999). Weiterhin kann LRP1 die Prozessierung von APP zu  $A\beta$  modulieren: Die Inhibition von LRP1 durch RAP führt reversibel zu erhöhten APP-Levels in der Plasmamembran und einem geringeren Abbau zu  $A\beta$  (Ulery et al. 2000). Ergebnisse, daß die zytoplasmatische Domäne von LRP1, analog zur  $\gamma$ -Sekretaseaktivität an APP und dem Signalrezeptor Notch (Übersicht von Fortini 2002), proteolytisch abgespalten werden kann (May et al. 2002), bestätigten sich jüngst mit dem Nachweis, daß LRP1, in Abhängigkeit von seiner Zelltyp-spezifischen Glykosylierung (May et al. 2003), ein  $\gamma$ -Sekretasesubstrat ist (von Arnim et al. 2005). Die freigesetzte intrazelluläre Domäne von LRP1 ist in der Lage, den Transkriptionsaktivator-Komplex aus APP und weiteren Molekülen in seiner Aktivität zu hemmen (Kinoshita et al. 2003). Ob diese Mechanismen auch den bereits erwähnten Zusammenhang zwischen ApoE4 und dem erhöhten Risiko erklären, die Alzheimer-Demenz zu entwickeln, ist bisher noch unklar.

Als weitere Funktion von LRP1 im ZNS kristallisiert sich eine Beteiligung an der Modulation neuronaler Stimuli heraus. LRP1 moduliert ligandenabhängig den Calciumeinstrom in Neuronen über *N*-Methyl-D-aspartat-Rezeptoren und beeinflusst durch diese Kontrolle des intrazellulären Calciumspiegels die Wirkung exzitatorischer Neurotransmitter wie Glutamat (Bacsikai et al. 2000, Qiu et al. 2002). Parallel dazu trägt LRP1 durch seine Rolle als Rezeptor für *tissue-type* Plasminogen-Aktivator (tPA) im Hippocampus zur Langzeitpotenzierung bei, einem Markerprozeß für die Gedächtnisbildung (Zhuo et al. 2000). Der Effekt wird wahrscheinlich durch die Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase A durch LRP1 vermittelt, ist mit RAP blockierbar und wirkt möglicherweise, indem durch die Rekrutierung der Serinprotease-Aktivität von tPA und die anschließende, lokale Auflösung der ECM Raum für die Bildung neuer synaptischer Kontakte geschaffen wird. Ebenfalls durch die spezifische Bindung an LRP1 wirkt der PA-Inhibitor 1 zusätzlich chemotaktisch (Degryse et al. 2004). Dazu passend wurde kürzlich gezeigt, daß verschiedene Liganden von LRP1 das Neuritenwachstum in primären Neuronen stimulieren (Qiu et al. 2004) und daß die Abwesenheit von LRP1 in ausdifferenzierten Neuronen in Mäusen trotz unauffälliger



Hirnhistologie zu schweren Störungen des Verhaltens und der Motorik führt (May et al. 2004).

In der Gefäßwand ist LRP1 ebenfalls an verschiedenen Prozessen beteiligt und von hoher pathophysiologischer Relevanz (Übersicht von Herz und Hui 2004). Die Zellen der glatten Muskulatur (SMC) der Gefäßwand wandern, induziert durch die entzündlichen Prozesse in atherosklerotischen Läsionen, in Richtung Gefäßlumen, wo sie durch den Kontakt mit Plasmafaktoren zu einer gesteigerten Proliferation stimuliert werden, die letztlich zusammen mit einer massiven Einlagerung von LDL zu einer fatalen Progression der Läsion führt. SMC sind über LRP1 in der Lage, einen Teil dieser aggregierten LDL aufzunehmen (Llorente-Cortés et al. 2000). Aktivierte Makrophagen, die gezielt in diesen Bereich einwandern, nehmen ebenfalls abgelagerte LDL, möglicherweise auch über LRP1, auf und exprimieren daraufhin in großen Mengen ApoE, vermittelt über den Transkriptionsfaktor LXR, der durch oxidiertes Cholesterol aus der aufgenommenen LDL aktiviert wird (Tangirala et al. 2002, Repa und Mangelsdorf 1999). Dieses ApoE inhibiert die von PDGF aus dem Blutplasma induzierte Proliferation und Migration der SMC durch die Bindung an LRP1 (Ishigami et al. 1998, Swertfeger et al. 2002). Dieser Mechanismus erfordert eine spezifische Signaltransduktion von LRP1, die auch tatsächlich gefunden wurde: LRP1 wird, ausgelöst durch PDGF, bei gleichzeitiger Aktivierung von Src-Kinasen am Tyrosinrest des zweiten NPXY-Motivs phosphoryliert und moduliert die Signalaktivität des PDGF-Rezeptors, z. B. indem die ApoE-Bindung an LRP1 eben diesen, letztlich mitogen wirkenden Weg inhibiert (Boucher et al. 2002b, Loukinova et al. 2002); nach diesen und vielen weiteren Hinweisen scheint sich mittlerweile ein echtes Ko-Rezeptorverhältnis von LRP1 und dem PDGF-Rezeptor zu bestätigen (Newton et al. 2005). Die Bindung von ApoE an LRP1 führt zusätzlich zu einer Proteinkinase A (PKA)-abhängigen Serin-Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von LRP1, die sich positiv auf die Endozytose-Aktivität auswirkt (Li et al. 2001) und gleichzeitig die Migration von SMC inhibiert (Zhu und Hui 2003). Somit könnte die Bindung von ApoE ein Umschalten der SMC in atherosklerotischen Läsionen von pathologischer Proliferation und Wachstum zu erwünschter Aufnahme von Plaque-Bestandteilen, insbesondere aggregierter LDL, bewirken. Darüber hinaus inhibiert LRP1 die Migration von SMC als Reaktion auf eine Plasminogenaktivierung durch die Aufnahme von uPA-Inhibitor 1/uPA-Rezeptor-Komplexen (Wijnberg et al. 1997). Dies geht mit einer cAMP-abhängigen PKA-Aktivierung einher (Goretzki und Mueller 1997) und involviert ein GTP-bindendes Protein (Goretzki und Mueller 1998). Entscheidender scheint jedoch ein Mechanismus über den PDGF-Rezeptor zu sein, denn in einem SMC-spezifischen LRP1-Knockout-Modell konnte gezeigt werden, daß das Fehlen von LRP1 schwere Atherosklerose zur Folge hat, die jedoch durch Gabe eines PDGF-Inhibitors verhindert werden kann (Boucher et al. 2003).

Mit Blick auf die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit liegen über die Funktionen von LRP1 im Lipoproteinstoffwechsel der Leber deutlich weniger Daten vor (Übersicht von Mahley und Ji 1999). LRP1 führt zusammen mit dem LDLR *in vivo* zur Aufnahme von CR in die Leber von Mäusen (Hussain et al. 1991). Der relative Anteil des LDLR einerseits und LRP1 andererseits ist jedoch schwer abzuschätzen. Choi und Cooper (1993), Herz et al. (1995) sowie de Faria et al. (1996) sehen in Mäusen nach intravenöser Gabe von CR nur einen geringen Beitrag von LRP1 an der Aufnahme. In Ratten konnte selbst dieser geringe Beitrag nicht bestätigt werden, da die Aufnahme von CR dort nicht durch den kompetitiven LRP1-Liganden  $\alpha_2M^*$  unterdrückbar war (Jäckle et al. 1993). Die Reduktion der LRP1-Expression in der Leber von Mäusen durch genetische Inaktivierung der RAP-Expression (Willnow et al. 1995) führte zu einem Anstieg der CR im Plasmaprofil; bei einer adenoviralen Überexpression von RAP und damit einer Blockade sowohl der LRP1-Aktivität als auch der Bindungsaktivität der HSPGs kam es zu einer noch weit stärkeren Zunahme von CR im Plasma (Willnow et al. 1994b).

Der homozygote Knockout in Mäusen ist, vermutlich aufgrund der Beteiligung von LRP1 an der Hirnentwicklung, mit vollständiger Penetranz in der zweiten Embryonalwoche letal (Herz et al. 1992). Ein genetischer Knockout in Lebern von adulten Mäusen gelang später durch die Injektion von Cre-Rekombinase-tragenden Adenoviren in Tiere, die homozygot ein *loxP*-flankiertes LRP1-Allel trugen, das dadurch inaktiviert wurde (Rohlmann et al. 1998). Wurden diese Experimente in LDLR<sup>-/-</sup>-Tieren durchgeführt, um die kompensatorisch erhöhte Expression des LDLR zu umgehen, fand man im Vergleich zu Kontrolltieren dramatisch erhöhte Mengen an LDL und CR im Plasma. Entsprechend erhöht waren die Mengen der zugehörigen Struktur-Apolipoproteine ApoB100 und ApoB48, aber auch der Plasmagehalt an ApoE war in Übereinstimmung mit der Charakterisierung von LRP1 als ApoE-Rezeptor (Beisiegel et al. 1989) drastisch erhöht (Rohlmann et al. 1998).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sehr deutliche Effekte in Bezug auf die Aufnahme von CR nur unter Bedingungen erhalten werden, die neben LRP1 auch die Aktivität des LDLR und/oder der HSPG als initialem Bindungsort inhibieren. Eine Studie von Veniant et al. (1998) mit Mäusen, die nur ApoB48 oder ApoB100 jeweils mit und ohne LDLR exprimieren, zeigt, daß die Inaktivierung von LRP1 (vgl. Willnow et al. 1994b) nur einen Einfluß auf die ApoB-Plasmaspiegel von Mäusen hat, die das vom LDLR nicht erkannte ApoB48 exprimieren. Dieser Einfluß war im Vergleich zu Kontrolltieren insbesondere postprandial sehr ausgeprägt und legt daher nahe, daß LRP1 in dieser Phase von besonderer Bedeutung ist. Dies paßt zu Arbeiten, die *in vitro* und *in vivo* zeigen, daß Adipocyten von Maus und Ratte nach Stimulation mit dem postprandialen Hormon Insulin mehr LRP1 in der Plasmamembran aufweisen, als nicht stimulierte Kontrollzellen und dies auch zu

einer verstärkten Aufnahme von spezifischen Liganden wie  $\alpha_2M^*$  und ApoE-angereicherten Lipoproteinen führt (Corvera et al. 1989, Descamps et al. 1993). Diese Befunde haben jedoch bislang noch keinen weiteren Niederschlag in der Untersuchung postprandialer Funktionen von LRP1 gefunden und sind daher ein Ansatzpunkt für die vorliegende Arbeit.

Es existieren keine Arbeiten, in denen in einem Überexpressions-Modell von vollständigem, humanem LRP1 metabolische Effekte untersucht wurden. Lediglich Avramoglu et al. (1998) zeigen die Überexpression von Hühner-LRP und in einer Folgearbeit, daß die proteolytische Prozessierung für die Endozytose-Aktivität dieses LRP-Konstrukts nicht essentiell ist (Ko et al. 1998).

### 1.3 RNA-Interferenz

„RNA-Interferenz“ (RNAi) wurde als Methode für einige Experimente dieser Arbeit verwendet. Da zu diesem Zweck sowohl eine Änderung als auch eine Erweiterung der etablierten Methodik durchgeführt wurde, werden die Grundlagen der RNAi an dieser Stelle kurz beschrieben. Das in dieser Arbeit entwickelte System wird in Kapitel 4.1 dargestellt und diskutiert.

Mit RNAi wird ein zellbiologischer Mechanismus bezeichnet, durch den spezifisch mRNA-Moleküle abgebaut werden, wenn ein ca. 21 bis 28 Nukleotide langes, komplementäres RNA-Oligonukleotid („small interfering RNA“, siRNA) in der Zelle vorhanden ist (Übersicht von Meister und Tuschl 2004). Dieser evolutiv offenbar sehr alte Mechanismus ist mittlerweile für das Pflanzen-, Pilz- und Tierreich nachgewiesen und unterscheidet sich mechanistisch zwischen einzelnen Organismengruppen auch innerhalb der jeweiligen Reiche in einigen Details. Grundsätzlich führt die Hybridisierung des RNA-Oligonukleotids mit seiner Ziel-mRNA zur Bildung eines *RNA-induced silencing complex (RISC)*, der zu einer Spaltung und damit Inaktivierung der Ziel-mRNA in der Mitte der Erkennungssequenz führt (Elbashir et al. 2001). Natürliche Quellen für siRNAs können doppelsträngige RNA-Moleküle sein, die durch die RNase „Dicer“ zu siRNAs prozessiert werden (Bernstein et al. 2001), oder genomisch kodierte, transkribierte RNAs, die eine Haarnadelstruktur ausbilden, die ebenfalls von Dicer prozessiert werden. Die im letzten Fall entstehenden RNAs werden üblicherweise als „micro-RNA“ (miRNA) bezeichnet und zeichnen sich in der Regel durch eine nicht ganz vollständige Komplementarität zu 3'-UTR-Bereichen von Genen aus, die im Rahmen der Entwicklung des Organismus zeitlich reguliert sind. miRNAs wurden mittlerweile in großer Zahl auch im Menschen nachgewiesen (Mattick und Makunin 2005) und führen, wie das klassische Beispiel der miRNA *let-7* aus *Caenorhabditis elegans*, im Gegensatz zu siRNAs nicht zum Abbau ihrer Ziel-mRNA, sondern aufgrund der nicht vollständigen Basenpaarung lediglich zu einer Inhibition der

Translation (Hutvagner und Zamore 2002). Das Auftreten von längeren, doppelsträngigen RNAs signalisiert üblicherweise eine virale Infektion, daher ist die durch Dicer initiierte RNAi in Säugetieren mit einer Interferon-Antwort gekoppelt (Übersicht von Sen und Sakar 2005), die umfassende zelluläre Reaktionen zur Folge hat (Stark et al. 1998), einschließlich einer vollständigen Blockade jeglicher mRNA-Transkription (Manche et al. 1992). Diese Interferon-Antwort verhinderte lange den breiten Einsatz von antisense-RNA in der humanmedizinischen Forschung, bis sich herausstellte, daß dsRNA mit weniger als 30 Nukleotiden Länge keine oder zumindest nur eine deutlich schwächere Interferon-Antwort auslöst (Übersicht von Bantounas et al. 2004). Seitdem wird RNAi massiv als Methode zur gezielten Ausschaltung einzelner Gene genutzt, indem auf unterschiedliche Weise siRNAs in Zellen eingeführt werden (Übersicht bei Dykxhoorn et al. 2003). Eine verbreitete Methode, die auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam, ist die Expression einer selbstkomplementären *small hairpin RNA (shRNA)* von einer Plasmid-DNA nach Brummelkamp et al. (2002, Kommentar von Tuschl 2002). Der Haarnadel-Vorläufer, der die Zielsequenz enthält, wird von Dicer zu aktiver siRNA prozessiert, die anschließend über die beschriebenen Mechanismen zur Inhibition der Expression des Zielproteins führt.

#### 1.4 Fragestellung und methodischer Ansatz

Ausgehend vom oben dargestellten Wissensstand liegt dieser Arbeit folgende Fragestellung zugrunde:

- In welcher Form ist LRP1 an der postprandialen Aufnahme von CR beteiligt?
- Gibt es eine insulinabhängige Translokation von hepatischem LRP1 und beeinflusst diese die Aufnahme von CR?
- Existiert eine Verbindung zwischen der Aufnahme von CR und dem postprandialem ApoE-Recycling, und ist LRP1 daran beteiligt?

Mit der Bearbeitung dieser Fragen sollen zwei zusammengehörige Hypothesen, die für diese Arbeit aufgestellt wurden, überprüft werden: 1) Falls LRP1 auch in der Leber insulinabhängig transloziert wird, könnte dies bedeuten, daß LRP1 in der Leber für den Lipoproteinstoffwechsel eine Bedeutung hat, die der des insulinsensitiven Glukosetransporters GLUT4 in Muskel- und Fettgewebe für den Kohlenhydratstoffwechsel analog ist. Stimuliert durch das postprandiale Hormon Insulin würden sowohl GLUT4 als auch LRP1 in die Plasmamembran gebracht werden, um eine rasche zelluläre Aufnahme von Glukose bzw. CR zu ermöglichen und damit deren postprandial erhöhte Plasmaspiegel rasch zu senken. 2) Da eine auf diese Weise stimulierte, LRP1-vermittelte Aufnahme von CR aufgrund der fehlenden Bindung von LRP1 an ApoB eine

Anreicherung von ApoE auf den CR erfordert, müßte gleichzeitig, insbesondere nach sehr fetthaltigen Mahlzeiten, eine hohe ApoE-Plasmaverfügbarkeit gewährleistet sein. Diese könnte durch ein Recycling von aufgenommenem ApoE über HDL auf neue CR zustände kommen. LRP1 würde somit sowohl direkt an der gesteigerten postprandialen CR-Aufnahme beteiligt sein als auch die molekularen Voraussetzungen für diesen Prozeß schaffen.

Für die Experimente in dieser Arbeit wurde zum einen auf ein im Rahmen der Diplomarbeit des Autors erstelltes Expressionsplasmid für LRP1 zurückgegriffen, um durch Überexpression von LRP1 spezifische Effekte zu untersuchen. Als komplementäre Strategie wurde zum anderen ein auf RNA-Interferenz basierendes System zur spezifischen Suppression der LRP1-Expression entwickelt, um ein LRP1-freies Modellsystem für vergleichende Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Die Analyse erfolgte hauptsächlich mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (LSM), um die zugehörigen zellbiologischen Vorgänge räumlich und – sofern sinnvoll – in lebenden Zellen zeitlich darstellen zu können. Um auch LRP1 für die Lebendzellmikroskopie zugänglich zu machen, wurde ein Plasmidvektor zur Expression eines LRP1-EGFP-Fusionsproteins konstruiert.

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit ist es, über die Klärung der formulierten grundlagenwissenschaftlichen Fragen hinaus einen Beitrag zum Verständnis pathophysiologischer Zusammenhänge im Menschen zu liefern. Durch eine Integration solcher Erkenntnisse über LRP1 in die klinische Forschung könnte sich auch auf diesem Gebiet langfristig die Möglichkeit der Entwicklung neuer Behandlungsmethoden in der Medizin eröffnen.

## 2 Material und Methoden

Dieses Kapitel enthält die Beschreibung der Materialien und Methoden, die im Rahmen der Arbeit verwendet wurden. In Unterkapitel 2.1 sind die verwendeten Materialien aufgelistet, die Methoden sind unter 2.2 beschrieben, und gesondert unter 2.3 sind die benötigten Lösungen mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung aufgeführt.

Eingetragene Warenzeichen, Handelsnamen, Produktbezeichnungen usw. sind nicht immer besonders gekennzeichnet. Aus dem Fehlen einer entsprechenden Kennzeichnung kann keine freie Benutzbarkeit geschlossen werden. Ebenso wenig ist zu entnehmen, ob Patente oder Gebrauchsmuster vorliegen. Alle verwendeten Warenzeichen, Handelsnamen etc. gehören ihren jeweiligen Eigentümern.

### 2.1 Material

#### Antikörper

- $\alpha$ AP1: Maus monoklonal anti AP1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, A4200  
1:100 in Immunfluoreszenz
- $\alpha$ EEA1: Maus monoklonal anti EEA1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA, 610457  
1:100 in Immunfluoreszenz
- $\alpha$ LAMP1: Maus monoklonal anti LAMP1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA, 611042  
1:100 in Immunfluoreszenz
- $\alpha$ LRP-5A6: Maus monoklonal anti 85-kD-LRP-Fragment, ProGen, Queensland, Australien, 61066  
1:20 in Immunfluoreszenz, 1:100 im Western-Blot
- $\alpha$ LRP-8G1: Maus monoklonal anti 515-kD-LRP-Fragment, ProGen, Queensland, Australien, 61065  
1:100 in Immunfluoreszenz, 1:250 im Western-Blot
- $\alpha$ M-Cy3: Cy3-gekoppeltes Esel anti Maus IgG, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, 715-166-151  
1:500 in Immunfluoreszenz
- GARPO: Peroxidase-gekoppeltes Ziege anti Kaninchen IgG, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, 111-035-144  
1:5000 im Western-Blot

#### Kits

- Bac-to-Bac<sup>®</sup> Baculovirus Expression System, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 10359-016
- EndoFree<sup>™</sup> Plasmid Maxi, Qiagen, Hilden, Deutschland, 12362
- NucleoSpin<sup>®</sup> Extract, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, 740590
- NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, 740588
- NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, 740955

## Plasmide

pEGFP-N1, Clontech, Mountain View, CA, USA, 6085-1, GenBank U55762  
 pEGFP-N1, Clontech, Mountain View, CA, USA, 6900-1, kein GenBank-Eintrag  
 pUC19, New England Biolabs, Beverly, MA, USA, N3041S, GenBank L09137

## Reagenzien

AlexaFluor<sup>®</sup> 488 Protein Labeling Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, A-10235  
 Cy3 Mono-Reactive Dye, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden, PA23001  
 Cy5 Mono-Reactive Dye, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden, PA25001  
 DiI, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, D-282  
 Filipin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, F9765  
 FuGENE 6, Roche, Basel, Schweiz, 1814443  
 Heparin, als „Liquemin“ (Heparin-Natrium), N25000, Roche, Basel, Schweiz  
 NBD-Cholesterol, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, N-1148  
 Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 18418-012  
 SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 4309155  
 Chemikalien soweit nicht anders angegeben von Merck, Darmstadt, Deutschland

## Spezielle Proteine, Enzyme

BSA: PAA Laboratories, Pasching, Österreich, 41-001  
 HDL: human, ApoE-frei, freundlich zur Verfügung gestellt von L. Rellin, Hamburg  
 Insulin: human, rekombinant aus *Saccharomyces cerevisiae*;  
 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, I9278  
 M-MLV-Polymerase: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 28025; Puffer 18057  
*PfuTurbo*: Stratagene, La Jolla, CA, USA, 600250  
 RAP: mit His-Tag rekombinant aus *E. coli*,  
 freundlich zur Verfügung gestellt von B. Löffler, Hamburg  
 rApoE: Isoformen 2, 3 und 4 mit His-Tag, rekombinant aus *E. coli*,  
 freundlich zur Verfügung gestellt von K.-A. Rye, Sydney  
 RNasin Ribonuklease-Inhibitor, Promega, Madison, WI, USA, N2111  
 Restriktionsenzyme und sonstige DNA-modifizierende Enzyme soweit nicht anders angegeben von  
 New England Biolabs, Beverly, MA, USA

## Sonstiges

*E. coli* DH5 $\alpha$ , subclonig efficiency, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 18265-017  
 GeneRuler<sup>™</sup> DNA Ladder Mix, ready-to-use, MBI Fermentas, Ontario, Kanada, SM0333, vgl. Anhang  
 Gradientengel NuPAGE 4-12% Bis-Tris, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, NP0321BOX; Puffer: NP0002  
 Nitrozellulose-Membran, Whatman, Brentford, England, 10401196  
 PD10 Gelfiltrationssäulen, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden, 17-0851-01  
 Röntgenfilm Kodak BioMax MR Film, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, LZ353949-50EA  
 Slide-A-Lyser Dialyse Kassetten, 10 kD Ausschlußgröße, Pierce, Rockford, IL, USA, 66408

## Primer und sonstige Oligonukleotide

### PCR-Primer

*fett*: verwendete Schnittstelle im 5'-Überhang, *unterstrichen*: Zielsequenz, vgl. Plasmidübersicht, S. 109

ALae05: GAG <b>CTC GAG</b> TGA TCT GAC GGT TCA CTA AAC	30 bp, XhoI, pEGFP-N1
ALaf01: TTA <b>GCG GCC GCC</b> TAG GCA TGC ATT AGT TAT TAA TAG TAA TC	41 bp, NotI, pEGFP-N1
ALaf03: TTT <b>AGG GAC CCC</b> TTTG <u>GCC ACC ATG GTG AGC AAG</u>	33 bp, PpuMI, pEGFP-N1
<i>kursiv</i> : LRP1-Sequenz	
ALaf04: GCC <b>CAA GCT TAA</b> TTA <u>ACG GCC GCT TTA CTT GTA C</u>	34 bp, HindIII, pEGFP-N1

### qPCR-Primer

exemplarisch ist ein mögliches Template angegeben, vgl. Plasmidübersicht, S. 109

ALac07: TTC AGG TTC AGG GGG AGG TG	20 bp, pFB-LRP-EGFP, 3'-UTR
ALac08: GGA GAG CCT TGG CAA AGT GTC	21 bp, humanes LRP1, 3'-UTR
ALai01: AAG CTT GTC GAG AAG TAC TAG AGG ATC ATA AT	32 bp, pFB-LRP-EGFP, 3'-UTR
ALai02: CAT GCT GCC TTC AGG GAG AC	20 bp, humanes LRP1, 3'-UTR
GAPDH-FP: ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	20 bp, humane GAPDH (NM_002046)
GAPDH-RP: TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	20 bp, humane GAPDH (NM_002046)

### Mutagenese-Primer für pALae01 (vgl. Kapitel 3.1.1, S. 47)

*fett*: gewünschte Mutation, *klein*: stille Mutation, *unterstrichen*: generierte Kontrollschnittstelle

ALae01: CCT CAT GAA <b>CCC CCG</b> <u>gGC</u> CCT GGA CTT CC	29 bp, SmaI
ALae02: GGA AGT CCA GGG <u>CcC GGG</u> <b>GGT</b> TCA TGA GG	29 bp, SmaI
ALae03: CCA ATG CCC AGC AGA <u>AGa</u> <u>CtA</u> <b>GTG</b> TGA TCC GTG TGA ACC	39 bp, SpeI
ALae04: GGT TCA CAC GGA <b>TCA</b> <u>CAC TaG</u> <u>TCT</u> TCT GCT GGG CAT TGG	39 bp, SpeI

### Sequenzierprimer

sAE02a: GCG GCA TCA GAG CAG ATT G	19 bp, Pos. 1753 auf pALae02, revers
sAE02b: CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT AC	26 bp, Pos. 204 auf pALae02

### Oligonukleotide für shRNA in pALag01 (vgl. Kapitel 3.1.2, S. 55)

*fett*: zur Ziel-mRNA komplementärer Teil der shRNA, *unterstrichen*: Halbpalindrom

ALag04: <b>GAA CTC TCC CTT CCC AGA ATT AGC</b> TAA TTC TGG GAA GGG AGA GTT CTT	48 bp
Position 14493-14516 im 3'-UTR-Bereich der endogenen LRP1-mRNA (GenBank X13916)	
ALag05: <b>CTG CTT GGG GCT GCA AGT CTT</b> AAG ACT TGC AGC CCC AAG CAG TT	44 bp
Position 538-559 auf der endogenen LRP1-mRNA (GenBank X13916) und Position 349-370 auf pALaf04	



## 2.2 Methoden

Molekularbiologie .....	29
Datenbankrecherche .....	29
DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen und von PCR-Produkten .....	29
DNA-Minipräparation mit Säulenreinigung .....	30
DNA-Minipräparation ohne Säulenreinigung .....	30
DNA-Sequenzierung .....	30
DNA-Trennung im Agarosegel .....	31
Glycerolstock für Bakterien .....	31
Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen .....	31
Ligation und Ligationsprogramm .....	31
Plasmid-Transformation, thermisch .....	33
Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	33
Quantitative PCR (qPCR) .....	34
Restriktionsansätze .....	34
RT-PCR .....	35
Proteinchemie .....	35
Fluoreszenzmarkierung von ApoE und Assoziation an CR .....	35
Fluoreszenzmarkierung von HDL und RAP .....	35
Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung .....	36
In-gel Fluoreszenzdetektion .....	36
SDS-PAGE .....	37
Western-Blot für Zellkulturprotein .....	37
Sonstige Techniken .....	38
Aufnahme-, Bindungs- und Recycling-Assays .....	38
Chylomikronen-Isolation aus Plasma .....	38
Chylomikronen-Remnant - Präparation .....	39
DNA-Transfektion in Säugerzellen .....	39
Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	39
Lipidmarkierung von Chylomikronen-Remnants .....	41
Zellkultur von Säugerzellen .....	41

In diesem Abschnitt sind die Beschreibungen aller regelmäßig verwendeten Standardmethoden zusammengefaßt, die im Rahmen der in Kapitel 3 beschriebenen Arbeiten verwendet wurden.

### Molekularbiologie

#### Datenbankrecherche

Alle Datenbank-Recherchen wurden auf [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov) durchgeführt. Für Sequenzanalysen wurden verschiedene der dort zur Verfügung stehenden Varianten des BLAST-Algorithmus verwendet.

#### DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen und von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten und die Extraktion aus Agarosegelen wurde das Kit „NucleoSpin® Extract“ von Macherey-Nagel nach dem mitgelieferten Protokoll verwendet. Es wurden alle optionalen Waschschriffe durchgeführt und die DNA abweichend vom Protokoll immer mit 30 µL 1 mM TRIS, pH 8, 70 °C von der Säule eluiert.

**DNA-Minipräparation mit Säulenreinigung**

Zur Präparation säulengereinigter Plasmid-DNA wurde das Kit „NucleoSpin® Plasmid“ nach dem mitgelieferten Protokoll inklusive des optionalen Waschschriffs verwendet. Die Elution erfolgte abweichend immer mit 1 mM TRIS, pH 8, 70 °C.

Für die Präparation Endotoxin-freier DNA wurde das „EndoFree™ Plasmid Maxi“-Kit von Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem mitgelieferten Protokoll.

**DNA-Minipräparation ohne Säulenreinigung**

2 mL einer über Nacht (< 16 h) im Schüttler bei 37 °C, > 200 rpm gewachsenen Bakterienkultur wurden in ein 2-mL-Gefäß überführt und 20 s bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde durch Vortexen vollständig in 300 µL Lösung I resuspendiert. Es wurden 300 µL frisch angesetzte Lösung II zugegeben und sofort durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach spätestens fünf Minuten wurden 300 µL gekühlte Lösung III zugegeben und wieder sofort durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Das Gefäß wurde anschließend für 5 min bei 4 °C mit maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand unter Vermeidung präzipitierter Flocken in ein neues 1.5-mL-Gefäß überführt. Es wurden 0.8 bis 1.0 Volumen (ca. 800 µL) ungekühltes Isopropanol<sup>2</sup> zugegeben oder vorgelegt und vorsichtig, aber gründlich, durchmischt, 10 min bei 4 °C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Das kleine, meist glasig durchsichtige Pellet wurde mit 0.5 mL 70 % Ethanol<sup>3</sup> gewaschen, 5 min mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, der Alkohol abgenommen und das Gefäß geöffnet bei Raumtemperatur oder bis zu 60 °C stehen gelassen, bis kein Alkoholgeruch mehr wahrgenommen werden konnte. Abschließend wurde das Pellet in einem adäquaten Volumen (z. B. 50 µL) 1 mM TRIS/HCl, pH 8, aufgenommen.

**DNA-Sequenzierung**

Alle Sequenzierungen wurden beim Sequenzierservice der MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland, als „ValueRead“ mit kundendefinierten Primern in Auftrag gegeben. Als Template wurden jeweils 1.5 µg säulengereinigte DNA verwendet.

---

<sup>2</sup> F; R 11; S 7-16

<sup>3</sup> F; R 11; S 7-16

### DNA-Trennung im Agarosegel

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0.5 % bis 2.0 % (w/v) Agarose<sup>4, 5</sup> in TAE-Puffer oder TBE-Puffer<sup>6</sup> durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf < 50 °C wurde Ethidiumbromid<sup>7</sup> für eine Endkonzentration von 0.1 µg·mL<sup>-1</sup> zugegeben und die Lösung in den vorbereiteten Gelträger<sup>8</sup> gegeben.

Nach dem Erstarren wurde der Gelträger in die mit 1x TAE bzw. 1x TBE gefüllte Gelkammer eingesetzt und der Taschenkamm unter Puffer aus dem Gel gezogen. Die aufzutragenden Proben wurden mit Gelladepuffer versetzt und in die Taschen gefüllt. Der Gellauf erfolgte in Abhängigkeit vom Trennproblem im Normalfall für 30 min bis 60 min bei Spannungen um 100 V.

### Glycerolstock für Bakterien

Eine Flüssigkultur mit Bakterien zu Beginn oder kurz vor der Plateauphase wurde zu gleichen Teilen mit Glycerolstock-Medium versetzt und direkt in einem Gefrier- röhren bei -70 °C eingefroren.

### Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die DNA-Konzentrationsbestimmungen erfolgten photometrisch mit Hilfe des „BioPhotometer“ der Firma Eppendorf in 50-µL-Küvetten mit einem Durchmesser von 10 mm ( $c = 0.05 \cdot \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot v^{-1} \cdot E_{260}$  mit  $0 \leq v \leq 1$  als Verdünnungsfaktor). Die Verdünnungen wurden so gewählt, daß die Extinktionen bei 260 nm in der Größenordnung von 0.05 bis 1.0 lagen, da die Verlässlichkeit der Meßergebnisse in diesem Bereich am größten ist<sup>9</sup>.

### Ligation und Ligationsprogramm

Die Konzentration der DNA für Ligationsreaktionen wurde aufgrund der technischen Schwierigkeiten bei der DNA-Messung nach Gelextraktion nicht exakt bestimmt. Statt dessen wurden als Erfahrungswert in der üblichen 10-µL-Reaktion 7.5 µL aufgereinigtes Insert (vgl. S. 29) und 1.0 µL aufgereinigter Vektor (jeweils aus 1 µg bis 1.5 µg umfassenden Restriktionsansätzen) mit 3 WU T4-DNA-Ligase eingesetzt. Bei extremen Größenverhältnissen der DNA-Fragmente untereinander wurde bereits im Restriktionsverdau oder bei den DNA-Verhältnissen im Ligationsansatz korrigiert, so

<sup>4</sup> Agarose, Electrophorese Grade, GibcoBRL, 15510-027

<sup>5</sup> 0.5%: 1 kb bis 30 kb, 0.7%: 0.8 kb bis 12 kb, 1.0%: 0.5 kb bis 7 kb, 1.2%: 0.4 kb bis 6 kb, 1.5%: 0.2 kb bis 3 kb, 2.0%: 0.1 kb bis 2 kb; nach Mülhardt 2000, S. 48

<sup>6</sup> TBE-gepufferte Gele können gegenüber TAE-gepufferten mit höheren Feldstärken eingesetzt werden und ergeben schärfere Banden, was die Empfindlichkeit für Fragmente <0.5 kb erhöht. Größere Fragmente tendieren jedoch dazu, dichter zusammenzulaufen als in TAE-Puffer; letzterer läßt sich zudem in 10fach konzentrierteren Stocks aufbewahren. Die Verwendung von TBE empfiehlt sich nicht, wenn Gelextraktionen vorgenommen werden sollen.

<sup>7</sup> T+, Xi; R 22-26-36/37/38-40; S 26-28.2-36/37-45

<sup>8</sup> Gelkammer Mini-Sub Cell GT, BioRad, 25 cm Elektrodenabstand, 40 mL Gelvolumen

<sup>9</sup> QIAGEN Plasmid Purification Handbook, 9/2000, S. 52

daß sich größenordnungsmäßig ein molares Verhältnis von 10:1 zwischen Insert und Vektor ergab.

Aufgrund der Vorstellung, daß die Temperatur eines Ligationsansatzes Effekte kontrolliert, die z. T. gegenläufige Auswirkungen auf die Effizienz haben, wurde ausgehend von folgender Überlegung ein neues Ligationsprotokoll entwickelt: Die Temperatur bestimmt als kritischer Parameter der Ligationsreaktion die Diffusionsgeschwindigkeit der beteiligten DNA-Moleküle und ihre mittleren Annealingzeiten sowie die Aktivität und Stabilität der Ligase. Die optimale Arbeitstemperatur der T4-DNA-Ligase liegt im Bereich von 16 °C; darunter nimmt die Aktivität ab, darüber sinkt die Halbwertszeit des Enzyms dramatisch. Entsprechend gibt es für jede Ligationsreaktion in Abhängigkeit von der Größe und der Beschaffenheit der Enden der beteiligten DNA-Fragmente eine üblicherweise unbekannte Temperatur, in der Diffusionsgeschwindigkeit und mittlere Annealingzeiten zu einer maximalen Präsentation ligierbarer Konkamere der gewünschten Zusammensetzung führen. Demnach existiert auch eine im Sinne der Ligationseffizienz optimale Temperatur zwischen dieser optimalen Rearrangement/Annealing-Temperatur und der optimalen Arbeitstemperatur der Ligase. Da diese Idealtemperatur ebenfalls unbekannt ist, erscheinen die üblichen Protokolle (10 min bei Raumtemperatur, 4 h bei 16 °C oder über Nacht bei 4 °C) für schwierige Ligationsreaktionen nicht befriedigend. Deshalb wurde ein Protokoll etabliert, bei dem die Reaktion in einer PCR-Maschine durchgeführt wird, die wiederholt einen langsamen, asymmetrisch wellenförmigen Temperaturzyklus durchläuft, in dem die optimale Temperatur enthalten sein sollte. Aufgrund der geringeren Aktivität der Ligase bei tieferen Temperaturen wurden die Verweilzeiten dort länger als bei den höheren Temperaturen gewählt, bei denen zusätzlich Aktivitätsverlust durch Denaturierung droht. Die Temperaturstufen bei 15 °C und 16 °C wurden ebenfalls verbreitert, da dieser Temperaturbereich als der für die meisten Anwendungen optimale angesehen wird. Die genauen Zyklusdaten sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Ein vollständiger Zyklus dauert ungefähr 2 Stunden und wurde zehn Mal durchlaufen.

**Tabelle 2: Optimiertes Temperaturprofil für Ligationsreaktionen in einer PCR-Maschine (Deckeltemperatur: 30 °C bis 40 °C)**

Temperaturplateaus [°C] (Schrittweite 1 °C)	Plateauzeit [s]	Heiz-/Kühlrate [°C·s <sup>-1</sup> ]
2 bis 10	180	0.01
11 bis 14	120	0.01
15	180	0.01
16	120	0.01
17	60	0.02
18	30	0.03
19	10	0.05
20	1	0.10
21	1	0.15

weiter bei 20 °C: zurück und wiederholen

### Plasmid-Transformation, thermisch

30  $\mu\text{L}$  bis 50  $\mu\text{L}$  bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  eingefrorener, chemisch kompetenter Bakterien wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in gefrorenem Zustand aus dem Vorratsgefäß gekratzt und die Spitze zum Auftauen in ein vorgekühltes 1.5-mL-Gefäß auf Eis gegeben. Direkt nach dem Auftauen wurde die Bakteriensuspension aus der Spitze in das Gefäß pipettiert und die zu transformierende DNA (für die Retransformation von supercoiled DNA in der Größenordnung von 1 ng) in einem Volumen nach Möglichkeit  $< 10\text{ }\mu\text{L}$  vorsichtig zugegeben. Es soll keine vollständige Durchmischung entstehen, sondern ein Konzentrationsgradient größtmöglichen Volumens, um eine maximale Zahl an Bakterien in den Bereich der optimalen, aber unbekanntenen DNA-Konzentration zu bringen.

Nach Zugabe der DNA verblieb das Gefäß für 15 min bis 30 min auf Eis. Anschließend wurde für 1 min auf  $42\text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt und danach weitere 2 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurde das Gefäß auf  $37\text{ }^\circ\text{C}$  gebracht und 300  $\mu\text{L}$  SOC-Medium mit Raumtemperatur ohne Antibiotika zugegeben. Nach einigen Minuten wurde mit vorsichtigem Schütteln begonnen und bei zunehmender Schüttelintensität für ca. 1 h inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das gesamte Volumen auf eine Agarplatte mit LB-Medium und dem gewünschten Antibiotikum ausgestrichen, bei Bedarf in unterschiedlichen Verdünnungen. Die Inkubation erfolgte bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht.

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Reaktionsansätze enthielten ca. 10 ng bis 100 ng Template-DNA, 400  $\mu\text{M}$  dNTPs, 400 nM jeden Primers und 1 U *PfuTurbo* DNA-Polymerase in 20  $\mu\text{L}$  einfach konzentriertem, mitgelieferten Polymerase-Puffer. Die Denaturierungstemperatur lag bei  $95\text{ }^\circ\text{C}$  für 25 s, die Synthesephase dauerte 1 min pro Kilobase bei  $72\text{ }^\circ\text{C}$ . Die Temperatur der 25 s langen Annealingphase wurde wie folgt ermittelt: Mit Hilfe der *nearest-neighbour*-Methode (nach Freier et al. 1986, Breslauer et al. 1986 und Wetmur 1991) wurde zunächst die Schmelztemperatur der Primer berechnet. Die Schmelztemperatur des Produkts wurde, leicht modifiziert nach Baldino et al. (1989), mit der Gleichung  $T_m \cdot ^\circ\text{C}^{-1} = 81.5 + 16.6 \cdot \lg([J^+] \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}) + 41 \cdot p_{\text{GC}} - 675 \cdot n^{-1}$  (mit  $[J^+]$  als Konzentration monovalenter Kationen,  $0 \leq p_{\text{GC}} \leq 1$  als Anteil an GC-Paaren und  $n$  als Fragmentlänge in Basenpaaren) abgeschätzt. Die verwendete Annealingtemperatur wurde schließlich mit  $T_a = 0.3 \cdot T_m^{\text{Primer}} + 0.7 \cdot T_m^{\text{Produkt}} - 14.9\text{ }^\circ\text{C}$  nach Rychlik et al. (1990) ermittelt. Die Reaktion wurde in einem „T3 Thermocycler“ (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

### **Quantitative PCR (qPCR)**

Von der zu quantifizierenden DNA-Probe wurde eine Ausgangslösung mit einer Konzentration von ca.  $0.1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  Gesamt-DNA sequentiell 1:4, 1:16 und 1:64 verdünnt. Von den vier erhaltenen Lösungen wurden je  $2 \mu\text{L}$  für jedes Amplikon in einem Reaktionsvolumen von  $20 \mu\text{L}$  mit SYBR Green PCR Master Mix (2fach konzentrierte Stocklösung) und dem zugehörigen Primerpaar in einer Konzentration von  $200 \text{ nM}$  pro Primer eingesetzt, d. h. es ergaben sich vier Reaktionsansätze pro Amplikon. Als Referenz wurde die cDNA der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) bestimmt, als Kontrolle wurden mindestens zwei Reaktionen ohne Template-DNA durchgeführt.

Die Reaktion wurde in einem Mx4000 Cyclyer (Stratagene, La Jolla, CA, USA) unter Verwendung der zugehörigen Reaktionsgefäße durchgeführt. Die PCR-Zyklen wurden nach der im Abschnitt „PCR“ (s. o.) angegebenen Methode festgelegt. Detektiert wurde die Fluoreszenz von SYBR Green und ROX als Referenzfarbstoff während der Synthesephase bei  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ . Im Anschluß an das 40 Zyklen lange Amplifikationsprogramm wurde eine Schmelzanalyse der entstandenen Produkte erstellt. Anhand der ersten Ableitung der SYBR Green-Fluoreszenzintensität wurde die Abwesenheit von Nebenprodukten mit Schmelzpunkten oberhalb der Temperatur der Fluoreszenzdetektion überprüft. Um sicherzugehen, daß keine Fehlquantifizierung vorlag, wurden während der Etablierungsphase die entstandenen Produkte nach dem PCR-Lauf zusätzlich in einem Agarosegel auf ihre Identität und Freiheit von Nebenprodukten überprüft.

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der Geräte-Software, Version 3.01 (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Aus der Verdünnungsreihe pro Amplikon und Probe wurde die PCR-Effizienz berechnet. Nur Datensätze mit einer Effizienz von ca.  $98 \%$  oder mehr wurden verwendet. Anschließend wurden die zugehörigen Ct-Werte (Zyklus, bei dem ein im Bereich der logarithmischen Amplifikation festgelegter Schwellenwert überschritten wird) verdünnungsbereinigt und gemittelt. Aus den Differenzen der gemittelten Ct-Werte der einzelnen Amplikons in den verschiedenen Proben zu dem zugehörigen, gemittelten Ct-Wert der GAPDH-Messung wurden die relativen Mengenverhältnisse bestimmt.

### **Restriktionsansätze**

Die Reaktionen wurden, soweit nicht anders angegeben, im Rahmen der vom Hersteller für die verwendeten Endonukleasen angegebenen Bedingungen durchgeführt. Im Fall von Reaktionen mit zwei verschiedenen Enzymen wurde entsprechend den Angaben des Herstellers ein kompatibler Puffer oder ein Puffergemisch verwendet, bzw. bei schwierigeren Gegebenheiten eine sequentielle Reaktion mit Inaktivierung des ersten Enzyms und anschließender Einstellung der

Pufferbedingungen für das zweite Enzym gewählt. Auf diese Weise ließen sich verlustreiche bzw. materialintensive Zwischenfällungen vermeiden.

Üblicherweise wurde jeweils ca. 1 µg DNA eingesetzt. Die Enzymmenge und die Inkubationszeit wurden entsprechend der DNA-Menge und der Halbwertszeit der Nuklease sowie ggf. unter Berücksichtigung der reduzierten Aktivität gegenüber superspiralierter DNA gewählt (Daten aus der Dokumentation des Herstellers). Für alle Ansätze galt eine Höchstgrenze von 5 % Glycerol (aus der Stocklösung des Enzyms) in der Reaktionslösung. Daraus und/oder aus der DNA-Konzentration ergab sich das Reaktionsvolumen. Die Inkubation erfolgte bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur im Wärmeschrank oder einer PCR-Maschine, um Verdunstung und Kondensation am Gefäßrand zu minimieren.

### **RT-PCR**

2 µL einer RNA-Lösung, die zuvor mit dem Kit NucleoSpin RNA II isoliert worden war, wurden mit 0.35 µL Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primern (0.5 µg·µL<sup>-1</sup>) und 0.35 µL des RNase-Inhibitors RNasin sowie 2.3 µL Wasser auf 70 °C erwärmt und langsam auf 37 °C abgekühlt. Anschließend wurden 3 µL dNTP (jeweils 2.5 mM in der Stocklösung), 2 µL 0.1 M DTT, 4 µL 5fach konzentrierter M-MLV-Polymerase-Puffer und 1 µL (200 U) M-MLV-Polymerase zugegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurzzeitiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt.

### **Proteinchemie**

#### **Fluoreszenzmarkierung von ApoE und Assoziation an CR**

Die Markierungsreaktion wurde wie unter „Fluoreszenzmarkierung von HDL und RAP“ (s. u.) mit 200 µg rekombinantem ApoE durchgeführt. Nach dem Stoppen der Reaktion wurden 300 µg (Proteinanteil) CR zu dem Ansatz gegeben und für 2 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Lösung wurde in einem Zentrifugenröhrchen unter PBS geschichtet und bei ca. 40000 g für 0.5 h in einem *swing-out* Rotor zentrifugiert. Der Überstand (s. Abbildung 31, S. 69) wurde quantitativ mit einer Kanüle abgenommen und anhand des abgenommenen Volumens die ungefähre Konzentration der erhaltenen CR/ApoE\* berechnet. Zur exakten Konzentrationsbestimmung des erhaltenen ApoE\* wurde anschließend mit den CR/ApoE\* eine SDS-PAGE in einem 10%igen Gel durchgeführt und die Fluoreszenz im Gel qualitativ überprüft und quantifiziert.

#### **Fluoreszenzmarkierung von HDL und RAP**

Für die Markierung wurden ca. 0.5 mg (Proteinanteil) HDL bzw. 0.5 mg bis 1.0 mg RAP in 0.9 mL PBS in das Röhrchen mit dem getrockneten, aktivierten Farbstoff (Alexa488, Cy3, oder Cy5) gegeben. Nach vollständiger Lösung des Farbstoffes wurden

100  $\mu\text{L}$  1 M Natriumhydrogencarbonat zugegeben und für 0.5 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  1 M TRIS/HCl, pH 7.4, gestoppt. Die Abtrennung des markierten Liganden von überschüssigem freien Farbstoff erfolgte durch Ausschlußchromatographie mit einer PD10-Säule bzw. für HDL durch Dialyse in einer Slide-A-Lyser Kassette gegen PBS über Nacht bei 4 °C.

### **Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung**

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einem geeigneten Zellkulturgefäß zusammen mit Coverslips ausgesät, so daß sie zum Zeitpunkt der Untersuchung für eine optimale mikroskopische Auswertbarkeit zu einer nicht zu hohen Dichte gewachsen waren. Mit den bewachsenen Coverslips wurde vor der Färbung gegebenenfalls noch ein Assay (s. S. 38) durchgeführt. Die Coverslips wurden kurz in PBS geschwenkt und 5 min in PBS abgelegt. Es folgten 30 min Inkubation in 4 % PFA<sup>10</sup>/PBS in einer 12-well-Platte zum Fixieren, gefolgt von fünfmal 5 min PBS und einmal 5 min PBS/Glycin/Saponin<sup>11</sup> zum Permeabilisieren der Zellen. Blockiert wurde für 30 min bei 37 °C mit je 80  $\mu\text{L}$  2 % BSA in PBS/Glycin/Saponin pro Coverslip. Danach wurde für eine Stunde bei 37 °C mit je 50  $\mu\text{L}$  der ersten Antikörper in Blockierlösung inkubiert, zweimal mit PBS/Glycin/Saponin gewaschen und analog für 45 min mit fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörpern inkubiert. Für eine Cholesterolfärbung wurden 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Filipin zur Zweitantikörperlösung zugegeben. Abschließend wurde fünfmal 5 min in PBS gewaschen, 3 min für eine DNA-Färbung in ca. 5  $\mu\text{M}$  DAPI in PBS inkubiert und die Coverslips aus PBS heraus mit je 5  $\mu\text{L}$  PPD<sup>12</sup>/Mowiol<sup>13</sup> (25  $\mu\text{L}$  1 % PPD + 225  $\mu\text{L}$  Mowiol) auf Objektträgern mit Nagellack eingedeckelt.

### **In-gel Fluoreszenzdetektion**

Nach der Durchführung einer SDS-PAGE mit fluoreszierenden Proben wurden die Fluoreszenzen mit Hilfe eines Typhoon 9400 Gelscanners (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) detektiert. Bei Mehrfachanregung wurde für jede Anregungswellenlänge ein separater Scan durchgeführt, um eine maximale Signaltrennung zu erreichen. Die Anregungswellenlänge sowie die Emissionsfilter wurden dabei für jedes Fluorophor individuell abgestimmt und sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die Intensitäten wurden so gewählt, daß die relevanten Bereiche ohne Über- oder Untersättigung den dynamischen Bereich des Detektors von  $2^{16}$  möglichst breit abdeckten. Nach der Aufnahme von mehreren Fluoreszenzen in einem Gel wurden die Signale mit der Software FluorSep 2.2 (MolecularDynamics, Amersham Biosciences, Uppsala,

<sup>10</sup> Xn, Xi; R 20/22-36/37/38-40-43; S 22-26-36/37

<sup>11</sup> 5 g Glycin und 500 mg Saponin (Xi; R 36/37; S 24) auf 1 L PBS

<sup>12</sup> T, N; R 23/24/25-43-50/53; S 28.1-36/37-45-60-61

<sup>13</sup> Mowiol® ist ein Polyvinylalkohol



Schweden) von Crosstalk bereinigt. Die Quantifizierung wurde mit dem Programm „ImageQuant 5.2“ (MolecularDynamics, s. o.) durchgeführt.

**Tabelle 3: Einstellungen zur Detektion verschiedener Fluorophore mit dem Typhoon 9400**

Fluorophor	Anregung	Detektionsfenster
ECFP	457 nm	(500-540) nm
EGFP, Alexa488	488 nm	(500-540) nm
Cy3	532 nm	(565-595) nm
Cy5	633 nm	(655-685) nm

### SDS-PAGE

Die zu untersuchenden, mit PBS gewaschenen Zellen wurden in einem kleinen Volumen Zell-Lysepuffer (ca. 100  $\mu$ L pro 50 cm<sup>2</sup>) mit PIC (1:100) auf Eis abgeschabt. Die gewünschte Menge wurde nach Zusatz von Gelladepuffer, ca. 5 % SDS und für reduzierte Gele ca. 5 % 2-Mercaptoethanol<sup>14</sup> für 15 min bei 40 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde eine SDS-PAGE mit dem Mini Protean 3 - System von BioRad (mit Ober- und Unterpuffer) durchgeführt. Die Polymerisation des 1 mm dicken Trenngels, das in Unterpuffer mit einer der Prozentigkeit des Gels entsprechenden Menge Acrylamid/Bis<sup>15</sup> gegossen wurde, wurde durch Zugabe von 1:200 Volumen 10 % APS<sup>16</sup> und 1:800 Volumen TEMED<sup>17</sup> gestartet. Das Sammelgel wurde entsprechend mit 3 % Acrylamid/Bis in 40 mM TRIS/HCl, pH 6.14, angesetzt und polymerisiert. Alternativ wurde ein kommerziell erhältliches Gradientengel in einem Bis-Tris-Puffersystem verwendet. Der Gellauf wurde bei ca. 30 mA bis zum Erreichen der gewünschten Auftrennung durchgeführt.

### Western-Blot für Zellkulturprotein

Der Proteintransfer aus einem SDS-PAGE-Gel erfolgte in Blot-Puffer auf eine Nitrozellulose-Membran mit einer Porengröße von 0.45  $\mu$ m in einer TransBlot™-Cell - Apparatur von BioRad über Nacht mit ca. 0.7 mA·cm<sup>-2</sup>. Zur Kontrolle der Blot-Effizienz wurde die Membran 10 min mit Ponceau-Lösung<sup>18</sup> gefärbt und nach Markierung der Markerbanden mit Waschpuffer A wieder entfärbt. Alle Inkubationen der Membran erfolgten unter leichtem Schütteln.

<sup>14</sup> T, C, N; R 22-23/24-34-51/53; S 26-36/37/39-45-61

<sup>15</sup> Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (37.5:1), Gehalt 40%, BioRad 161-0148;

T; R 45-46-23/24/25-48; S 53-20-27-36/37-43-45-60

<sup>16</sup> O, Xn; R 8-22-42/43; S 17-22-24-37-43.8

<sup>17</sup> F, C, Xn; R 11-20/22-34; S 16-26-36/37/39-45

<sup>18</sup> 0.2% in 3% TCA, Serva, 33427

Die Immundetektion erfolgte angelehnt an Beisiegel et al. (1982). Die noch freien Bindungsstellen der Membran wurden durch einstündige Inkubation mit 5 % BSA und 10 % entfettetem Milchpulver in Waschpuffer A blockiert. Anschließend wurde 5 min mit Waschpuffer A gewaschen und für zwei Stunden mit dem ersten Antikörper in 5 % BSA/Waschpuffer A inkubiert. Es folgten als Waschungen 1 min Waschpuffer A, zweimal 15 min Waschpuffer B und 1 min Waschpuffer A, danach wurde für eine Stunde mit einem Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörper in 5 % BSA/Waschpuffer A inkubiert. Nach der abschließenden Waschserie, die der zwischen den beiden Antikörperinkubationen entsprach, wurde die Membran mit einem Bogen Blot-Papier leicht abgetupft und für eine Minute mit ECL-Lösung bedeckt. Diese wurde abgegossen und je nach Signalstärke mehrfach hintereinander ein Röntgenfilm aufgelegt, auf dem nach Entwicklung die Banden als dunkle Bereiche zu erkennen waren.

## Sonstige Techniken

### Aufnahme-, Bindungs- und Recycling-Assays

Die zu untersuchenden Zellen auf Coverslips wurden gegebenenfalls über Nacht in serumfreiem Medium ausgehungert, kurz in PBS gewaschen und für die entsprechenden Zeiten mit Lösungen der jeweils im Ergebnisteil angegebenen Liganden inkubiert. Die Lösungen, deren Grundlage serumfreies Zellkulturmedium mit 2 % BSA war, wurden auf die in einer feuchten Kammer liegenden Coverslips aufpipettiert und bei 37 °C, bzw. 4 °C für Bindungsassays, inkubiert. Der PBS-Lösung für den anschließenden Waschschrift wurden bei Aufnahme- und Recycling-Assays 100 U·mL<sup>-1</sup> Heparin zugesetzt, um die nur oberflächlich gebundenen Liganden abzulösen. Nach ca. 10 min wurden die Coverslips in PBS überführt und immunzytochemisch gefärbt. Für Recycling-Assays wurde vor der Färbung noch mit einer HDL-Lösung inkubiert, dabei wurde analog zur oben beschriebenen ersten Inkubation vorgegangen. CR wurden in einer Konzentration von ca. 10 µg·mL<sup>-1</sup> (Proteinanteil) eingesetzt, HDL in einer Konzentration von ca. 20 µg·mL<sup>-1</sup> (Proteinanteil). In Aufnahme-Experimenten wurde RAP in einer Konzentration von 50 µg·mL<sup>-1</sup> verwendet, abweichende Konzentrationen sind im Ergebnisteil angegeben.

### Chylomikronen-Isolation aus Plasma

40 mL Blutplasma aus EDTA-Blut eines ApoCII-defizienten Spenders (ApoE2/3) wurden mit 7 mL 60 % (w/v) Saccharose versetzt. Zur Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA) wurden je 7 mL in einem Zentrifugenröhrchen für einen zugehörigen SW41-Rotor unter 4 mL PBS geschichtet. Nach einstündiger Zentrifugation mit 38000 rpm bei 4 °C wurde die flotierte Schicht abgenommen, in ca. 8 mL PBS gelöst, mit 2 mL der Saccharose-Lösung beschwert, auf

vier Röhrcchen verteilt jeweils unter PBS geschichtet und erneut wie oben zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde zur Entfernung des Serumalbumins noch zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Chylomikronen in ca. 4 mL PBS aufgenommen, aliquotiert und unter einer Stickstoff-Atmosphäre bei 4 °C aufbewahrt.

#### **Chylomikronen-Remnant - Präparation**

In einem 50-mL-Gefäß wurden Chylomikronen in 10 mL PBS auf 12 mg·mL<sup>-1</sup> TG eingestellt, mit 10 mL FCS und 1 µg·mL<sup>-1</sup> LpL versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 4 mL 60 % (w/v) Saccharose zugegeben und drei Zentrifugationen analog zur Präparation der Chylomikronen (s. o.) durchgeführt. Die aus der letzten Zentrifugation erhaltenen CR wurden in 3 mL PBS aufgenommen, aliquotiert und unter einer Stickstoff-Atmosphäre bei 4 °C aufbewahrt.

#### **DNA-Transfektion in Säugerzellen**

Die Transfektion von Plasmid-DNA in Zellkulturexperimenten wurde mit Hilfe des Transfektionsreagenz FuGENE 6 entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Vermeidung zytotoxischer Effekte wurde nur endotoxinfrei präparierte DNA verwendet. Die DNA wurde im Verhältnis 1:3 (w/v) mit Reagenz versetzt (vgl. Protokoll). Die anschließenden Experimente wurden am zweiten Tag nach der Transfektion durchgeführt. Nach der Transfektion von shRNA-Plasmiden wurde bis zum dritten Tag gewartet.

#### **Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

Alle konfokalen Darstellungen wurden mit einem LSM 510 META (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit der zum jeweiligen Zeitpunkt aktuellen Software-Version aufgenommen. Die Aufnahme der Fluoreszenzen erfolgte nach Einkopplung der zugehörigen Laserlinie (s. Tabelle 4) über einen der klassischen PMT-Detektoren hinter einem vorgeschalteten Farbfilter. Um eine korrekte Detektion der einzelnen Farbstoffe in Multifluoreszenz-Experimenten zu gewährleisten, wurde die Detektion von breiten Emissionspeaks, die in das Detektionsfenster eines nicht-zugehörigen Kanals übersprechen können („Crosstalk“), verhindert, indem die Probe mehrfach gescannt wurde, wobei bei jedem Scan nur ein Fluorophor angeregt und detektiert wurde. Experimente mit lebenden Zellen, die bei 37 °C in einem POC-Aufsatz (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) unter Zusatz von 10 mM HEPES-Puffer durchgeführt wurden, bildeten eine Ausnahme, da hier im Interesse der Gleichzeitigkeit der Aufnahme der Kanäle für die Detektion von kolokalisierten Signalen in bewegten Strukturen z. T. auf Mehrfachscans verzichtet wurde (im Ergebnisteil näher erläutert).

In allen Experimenten wurde grundsätzlich trotzdem die Abwesenheit von Crosstalk überprüft.

Die Pinhole-Einstellung orientierte sich an der Größe von einer Airy Unit (entspricht bei der Apertur des üblicherweise verwendeten 63x-Objektives und einer mittleren Wellenlänge einer Schichtdicke von knapp einem Mikrometer), um eine optimale Konfokalität zu gewährleisten. Für viele Fragestellungen, in denen die Auflösung in z-Richtung nur eine untergeordnete Rolle spielte, wurde von diesem Prinzip abgewichen, um bei zwei bis drei Airy Units (entspricht einer Schichtdicke von bis zu etwa drei Mikrometern, vgl. oben) stärkere Signale bei geringerer Strahlenbelastung der Probe zu erhalten und/oder schnellere Scanzeiten realisieren zu können. Die Detektorempfindlichkeit und Laserintensität pro Kanal wurde je nach Probe so gewählt, daß die größte im Experiment vorliegende Intensität im Bereich der Detektorsättigung lag. Die Grenze zur Untersättigung wurde üblicherweise in den Bereich der Signalintensität in den Zellzwischenräumen gelegt. Alle übrigen Einstellungen wie Auflösung, Scangeschwindigkeit und Signalmittelung wurden entsprechend den Anforderungen der Fragestellung und den Gegebenheiten in der Probe so gewählt, daß unter Berücksichtigung der Probenstabilität eine möglichst hohe Signalqualität erhalten wurde. Diese einmal festgelegten Einstellungen wurden während der Aufnahme der Präparate einer experimentellen Serie nicht verändert.

**Tabelle 4: Einstellungen zur Detektion verschiedener Fluorophore mit dem LSM 510 META**

<b>Fluorophor</b>	<b>Anregung</b>	<b>Detektionsfenster</b>
Filipin	364 nm	> 385 nm
DAPI	364 nm	(435-485) nm
ECFP	458 nm	(475-525) nm
NBD-Cholesterol	458 nm	(505-550) nm
EGFP, Alexa488	488 nm	(505-530) nm
Cy3	543 nm	(560-615) nm
DiI	543 nm	(560-615) nm
Cy5	633 nm	> 650 nm

Für dreidimensionale Rekonstruktionen wurden sogenannte z-Stapel von aufeinander folgenden optischen Schnitten in z-Richtung aufgenommen. Da aus physikalischen Gründen die im konfokalen Volumen des Schnittes enthaltenen Signale abhängig von ihrer Position in der z-Dimension nicht mit gleicher Intensität repräsentiert sind, sondern eine rhombische Struktur aufweisen, wurde der Abstand der Schnitte so gewählt, daß sich eine 50%ige Überlappung der einzelnen Schnitte ergab. Auf diese Weise wurden alle in der Probe enthaltenen Signale für die Erstellung von Projektionen und Rekonstruktionen berücksichtigt.

### **Lipidmarkierung von Chylomikronen-Remnants**

Zur Markierung von CR mit NBD-Cholesterol wurden 200 µg CR (Proteinanteil) mit 250 µg NBD-Cholesterol in PBS mit 1 mM EDTA bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Assoziation von CR mit DiI wurde analog durchgeführt (Pitas et al. 1981). Die Abtrennung der nicht inkorporierten Fluorophore erfolgte durch eine Gelfiltration mit einer PD10-Säule.

### **Zellkultur von Säugerzellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten Säugerzelllinien (HEK293, HuH7, TERT) wurden nach einer einheitlichen Methode kultiviert. Die Kultur erfolgte je nach Anforderung in üblichen, für Zellkultur vorgesehenen Kulturflaschen (25, 75, 175 cm<sup>2</sup>), Petrischalen (∅ 6, 8 cm) oder Multidishplatten (6-, 12-well). Zum Passagieren wurden die konfluenten Zellen mit 37 °C warmem PBS gewaschen und mit einem kleinen Volumen Trypsin (ca. 0.5 mL pro 25 cm<sup>2</sup>) innerhalb von maximal fünf Minuten vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Anschließend wurden sie nach Inhibition des Trypsins durch serumhaltiges Medium ggf. mit Trypanblau in einer Neubauerkammer gezählt, in der gewünschten Verdünnung (maximal 1:8) wieder ausgesetzt und Vollmedium (1 % Penicillin/Streptomycin und – soweit nicht anders angegeben – 10 % Serum, s. u.) zugegeben (ca. 4 mL pro 25 cm<sup>2</sup>). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid.

Die verwendeten Lösungen (alle Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) sind:

- Dulbecco's MEM with Glutamax-1, 31966-021
- Foetal Bovine Serum, 10106-169
- Trypsin-EDTA, 25300-054
- Penicillin-Streptomycin (10000 U·mL<sup>-1</sup>), 15140-122
- PBS Dulbecco's, 14190-094

## 2.3 Lösungen

Antibiotikakonzentrationen für Bakterienmedien.....	42
Blot-Puffer.....	42
DNA-Minipräparation: Lösung I.....	42
DNA-Minipräparation: Lösung II.....	42
DNA-Minipräparation: Lösung III.....	43
ECL-Lösung.....	43
Gelladepuffer für DNA in Agarosegelen, 6x.....	43
Gelladepuffer für Protein in Acrylamidgelen, 11x.....	43
Glycerolstock-Medium.....	43
Luria Broth - Medium/Agar (LB).....	43
Phosphate buffered Saline (PBS).....	43
Protease Inhibitor Cocktail (PIC).....	44
SDS-PAGE: Oberpuffer.....	44
SDS-PAGE: Unterpuffer.....	44
SOC-Medium.....	44
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), 50x.....	44
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE), 5x.....	44
Waschpuffer A (für Western-Blot).....	44
Waschpuffer B (für Western-Blot).....	45
Zell-Lysepuffer.....	45

Stoffeigenschaften, insbesondere Molekulargewichte und Sicherheitskennzeichnungen, sind dem Merck-Katalog (Darmstadt 1999) entnommen.

### Antibiotikakonzentrationen für Bakterienmedien

Ampicillin ..... 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , in Agar je nach Neigung zu Satellitenkolonien bis 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   
 Kanamycin ..... 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

### Blot-Puffer

12.1 g ..... Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)  
Xi; R 36/38  
 56.2 g ..... Glycin  
 1 L..... Methanol  
F, T; R 11-23/25; S 7-16-24-45  
 Aqua dest. ad 5 L

### DNA-Minipräparation: Lösung I

5.0 mL..... 1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (TRIS/HCl, 157.6  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), pH 8.0  
 2.0 mL..... 0.5 M Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)  
Xn; R 22  
 10 mg ..... RNase A  
 Aqua dest. ad 100 mL

### DNA-Minipräparation: Lösung II

100  $\mu\text{L}$ ..... 2 M Natronlauge (80  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Natriumhydroxid)  
C; R 35; S 26-37/39-45  
 100  $\mu\text{L}$ ..... 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)  
Xn; R 22-36/38  
 800  $\mu\text{L}$ ..... Aqua dest.

**DNA-Minipräparation: Lösung III**

24.6 g ..... Natriumacetat  
 11.5 mL ..... Eisessig  
                   C; R 10-35; S 23.2-26-45  
 Aqua dest. ad 100 mL

**ECL-Lösung**

10 mL ..... 0.1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (TRIS/HCl, 15.8 g·L<sup>-1</sup>), pH 8.5  
 + 50 µL ..... 250 mM 5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion (Luminol, 44.3 g·L<sup>-1</sup>)  
 + 25 µL ..... 90 mM Cumarin-3-carbonsäure (17.1 g·L<sup>-1</sup>)  
                   T; R 25; S 25-37-45

10 mL ..... 0.1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (TRIS/HCl, 15.8 g·L<sup>-1</sup>), pH 8.5  
 + 3 µL ..... 30 % Wasserstoffperoxid  
                   C; R 34; S 3-26-36/37/39-45

frisch ansetzen und direkt vor Gebrauch mischen

**Gelladepuffer für DNA in Agarosegelen, 6x**

6.0 mL ..... Glycerol  
 1.2 mL ..... 0.5 M Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)  
                   Xn; R 22  
 5 mg ..... Bromphenolblau  
 5 mg ..... Xylencyanol  
                   Xi; R 36  
 Aqua dest. ad 10 mL

**Gelladepuffer für Protein in Acrylamidgelen, 11x**

8.8 mL ..... Glycerol  
 8 mg ..... Bromphenolblau  
 Aqua dest. ad 10 mL

**Glycerolstock-Medium**

65 mL ..... Glycerol  
 10 mL ..... 1 M Magnesiumsulfat (120.4 g·L<sup>-1</sup>)  
 2.5 mL ..... 1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (TRIS/HCl, 157.6 g·L<sup>-1</sup>), pH 8.0  
 Aqua dest. ad 100 mL

**Luria Broth - Medium/Agar (LB)**

10 g ..... Trypton  
 5 g ..... Hefeextrakt  
 5 g ..... Natriumchlorid  
 Aqua dest. ad 1 L, pH 7.5 mit Natronlauge (C; R 35; S 26-37/39-45)

für LB-Agar vor Wasserzugabe 15 g bis 30 g Agar-Agar (je nach gewünschter Festigkeit) zugeben

**Phosphate buffered Saline (PBS)**

40 g ..... Natriumchlorid  
 1.0 g ..... Kaliumchlorid  
 1.0 g ..... Kaliumdihydrogenphosphat  
 5.75 g ..... Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat  
 Aqua dest. ad 1 L, pH 7.4

**Protease Inhibitor Cocktail (PIC)**

1 mM..... Pepstatin  
 10 mM..... Chymostatin  
 10 mM..... Leupeptin  
 10 mM..... Antipain

**SDS-PAGE: Oberpuffer**

24.8 g ..... Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)  
 Xi; R 36/38  
 12.4 g ..... Borsäure  
 Aqua dest. ad 5 L

**SDS-PAGE: Unterpuffer**

258.5 g ..... Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)  
 Xi; R 36/38  
 Aqua dest. ad 5 L, pH 9.5 mit Salzsäure (C; R 34-37; S 26-36/37/39-45)

**SOC-Medium**

20 g ..... Trypton  
 5 g ..... Hefeextrakt  
 3 g ..... Natriumchlorid  
 180 mg ..... Kaliumchlorid  
 Aqua dest. ad 1 L, pH 7.0 mit Natronlauge (C; R 35; S 26-37/39-45)  
 autoklavieren  
 + 10 mL..... 2 M Glucose (360.3 g·L<sup>-1</sup>), sterilfiltriert  
 + 7.5 mL..... 1 M Magnesiumsulfat (120.4 g·L<sup>-1</sup>) + 1 M Magnesiumchlorid (95.2 g·L<sup>-1</sup>), sterilfiltriert

**TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), 50x**

242 g ..... Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)  
 Xi; R 36/38  
 57.1 mL..... Eisessig  
 C; R 10-35; S 23.2-26-45  
 100 mL..... 0.5 M Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)  
 Xn; R 22  
 pH 8.0 mit Essigsäure (C; R 10-35; S 23.2-26-45)  
 Aqua dest. ad 1 L

**TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE), 5x**

54 g ..... Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)  
 Xi; R 36/38  
 27.5 g ..... Borsäure  
 20 mL..... 0.5 M Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)  
 Xn; R 22  
 pH 8.0 mit Essigsäure (C; R 10-35; S 23.2-26-45)  
 Aqua dest. ad 1 L

**Waschpuffer A (für Western-Blot)**

12.1 g ..... Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)  
 Xi; R 36/38  
 45 g ..... Natriumchlorid  
 5 g ..... Tween 20  
 Aqua dest. ad 5 L, pH 7.4 mit Salzsäure (C; R 34-37; S 26-36/37/39-45)



**Waschpuffer B (für Western-Blot)**

- 12.1 g ..... Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)  
Xi; R 36/38
- 45 g ..... Natriumchlorid
- 12.5 g ..... Natriumdesoxycholat  
Xi; R 22
- 5 g ..... Tween 20
- 5 g ..... Natriumdodecylsulfat (SDS)  
Xn; R 22-36/38
- Aqua dest. ad 5 L, pH 7.4 mit Salzsäure (C; R 34-37; S 26-36/37/39-45)

**Zell-Lysepuffer**

- 5 mL ..... 1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (TRIS/HCl, 157.6 g·L<sup>-1</sup>), pH 8.0
- 2 mL ..... 0.1 M Calciumchlorid (11.1 g·L<sup>-1</sup>)  
Xi; R 36; S 22-24
- 0.47 g ..... Natriumchlorid
- 1 mL ..... Triton X-100  
Xn, Xi; R 22-41; S 24-26-39
- Aqua dest. ad 100 mL

## 3 Ergebnisse

Dieses Kapitel gliedert sich in drei Teile: In Abschnitt 3.1 ist die Erstellung und funktionelle Überprüfung der molekularbiologischen Werkzeuge für die späteren Experimente dargestellt. Mit diesen in Abschnitt 3.2 und 3.3 dargestellten Experimenten wurde zunächst eine zellbiologische Charakterisierung von LRP1 durchgeführt und anschließend die Aufnahme von CR über LRP1, das Recycling von ApoE und die insulinabhängige Translokation von LRP1 untersucht.

Die am Rand von Abbildungen (Mikroskopische Aufnahmen, Gele) angegebene Nummer dient der Zuordnung der Gele entsprechend dem Laborbuch. Eine senkrechte, schraffierte Linie zeigt bei nachträglich zusammengeführten Gelabbildungen die Nahtstelle an.

Erwartete Signale werden in Gelen aus Gründen der Übersichtlichkeit, insbesondere bei Kontrollexperimenten, bereits in der Bildunterschrift inhaltlich zugeordnet und mit einer theoretischen Größenangabe versehen, deren Genauigkeit über der Aussagefähigkeit der elektrophoretischen Analyse liegt. Kenntlich gemacht ist dieses Vorgehen durch die nachgestellte Größenangabe in Klammern.

Neben den im Text überwiegend verwendeten funktionsbezogenen Plasmidbezeichnungen trägt jedes im Rahmen dieser Arbeit generierte Plasmid zusätzlich einen systematischen Namen der Form „pAL $xx$  $NN$ “ (z. B. „pALaf04“);  $xx$  steht dabei für einen fortlaufenden Buchstabencode, der das Projekt kennzeichnet, dem das Konstrukt entstammt,  $NN$  ist eine fortlaufende Numerierung innerhalb dieses Projekts. Insbesondere für Zwischenstufen von Klonierungen existiert regelmäßig nur die systematische Bezeichnung. Dieselbe Nomenklatur wurde für DNA-Primer verwendet. Als Unterscheidungsmerkmal gegenüber Plasmiden fehlt das „p“ am Beginn des Namens, so daß sich als allgemeine Form „AL $xx$  $NN$ “ ergibt. PCR-Produkte werden neben der Nennung des Templates durch die Kombination der verwendeten Primer bezeichnet, z. B. „ALag01/02“.

### 3.1 Molekularbiologische Werkzeuge

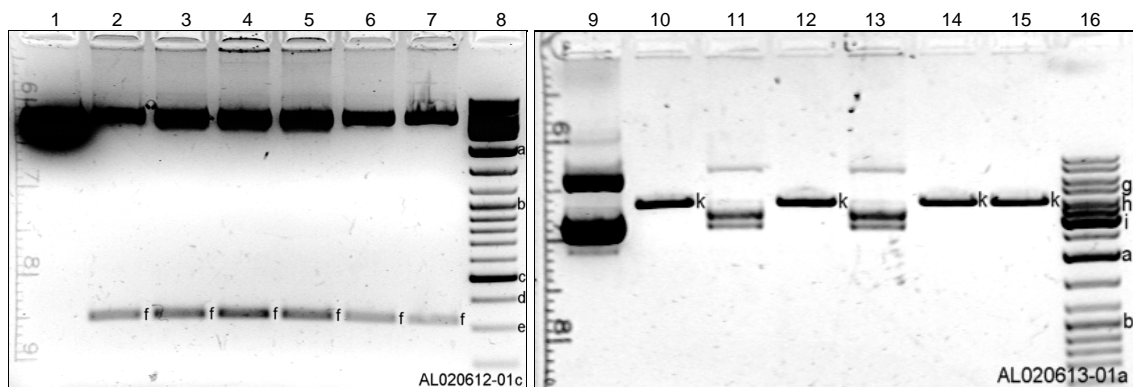
#### 3.1.1 GFP-fusioniertes LRP1

Die Konstruktion ging von dem Plasmid pFB-LRP (pALac03) aus, das die LRP1-Sequenz enthält und im Rahmen der Diplomarbeit des Autors als Expressionsplasmid für Säuger- und Insektenzellen aus einem publizierten cDNA-Klon (GenBank X13916) erstellt wurde. Nach der Kontrollsequenzierung eines ca. 15 kb großen Bereiches wurde am Ende der Diplomarbeit im LRP1-Leserahmen eine *missense*-Mutation T1316C (GTG zu GCG, Val zu Ala) und eine *nonsense*-Mutation in Form einer Deletion  $\Delta$ C1684

gefunden, die beide bereits im cDNA-Klon vorgelegen haben müssen. Letztere Mutation führt durch die Verschiebung des Leserasters zu einem Stopcodon an Position 1789 und damit zu einem um 87 % verkürzten Protein mit 596 Aminosäureresten ohne Membranverankerungsdomäne und einem berechneten Molekulargewicht von 66 kD.

Zuerst wurde der Bereich, der die Mutationen enthielt, in den Vektor pUC19 subkloniert. Dazu wurde das 1450 bp lange Fragment aus pFB-LRP:BamHI/NdeI in pUC19:BamHI/NdeI ligiert<sup>19</sup>. Das erhaltene Plasmid pALae01 (3903 bp) wurde einer gerichteten Mutagenese zu pALae02 unterworfen<sup>20</sup>. Für jede korrigierte Mutation im LRP1-Leserahmen wurde mit dem entsprechenden Primerpaar eine stille Mutation eingeführt (unter Beachtung der Codonfrequenzen), um eine Schnittstelle zu generieren, die für einen Restriktionstest der erhaltenen Klone genutzt werden konnte.

Die erfolgreiche Rückmutation von  $\Delta$ C1684 führte zu einer zweiten SmaI-Schnittstelle. Als Folge ist im SmaI-Verdau ein 321-bp-Fragment (Fragment f in Abbildung 6) zu erwarten, während ohne diese Mutation nur eine Linearisierung auftreten sollte. Analog führt die Korrektur von T1316C zur Einführung einer bisher nicht vorhandenen SpeI-Erkennungssequenz, d. h. zu einer Linearisierung im Kontrollverdau (Fragment k in Abbildung 6).



**Abbildung 6: SmaI- und SpeI-Kontrollverdau der pALae02-Ligationsklone (TAE, 2.0 % bzw. 1.0%)**

Die gleichzeitige Anwesenheit von Fragment f und k zeigt korrekte Klone in den Spuren 2/10, 4/12, 6/14 und 7/15 an.

1: pALae01:SmaI (Negativkontrolle), 2-7: pALae02-Ligationsklone 1-6 :SmaI, 8: 7.5  $\mu$ g GeneRuler

a: 2.0 kb, b: 1.0 kb, c: 500 bp, d: 400 bp, e: 300 bp

f: SmaI-Fragment (321 bp)

9: pALae01:SpeI (Negativkontrolle), 10-15: pALae02-Ligationsklone 1-6 :SpeI, 16: 7.5  $\mu$ g GeneRuler

g: 5.0 kb, h: 4.0 kb, i: 3.0 kb

k: linearisierter Vektor (3903 bp)

<sup>19</sup> Die Beschreibung des Vorgehens bei Klonierungen ist in Kapitel 2.2 auf die Einzelschritte aufgeteilt: Restriktionsverdau (S. 34), Agarosegel (S. 31), Gelextraktion der DNA (S. 29), Ligation (S. 31), Transformation in Bakterien (S. 33), DNA-Präparation (S. 30), Konzentrationsbestimmung (S. 31), Kontrollverdau (s. o.), Glycerolstock eines positiven Klons (S. 31).

<sup>20</sup> Verwendet wurde ein Protokoll entsprechend dem „QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, 200519) mit der Änderung, daß beide Mutationen in einem Schritt eingefügt wurden.

Die Klone 1, 3, 5 und 6, die alle sowohl Fragment f als auch Fragment k aufwiesen sowie in einem nicht gezeigten Kontrollverdau mit Sall die erwarteten Banden zeigten, wurden zur Verifizierung und Kontrolle auf Mutationen, die während der Reaktion der Polymerase entstanden sein könnten, sequenziert<sup>21</sup>. Klon 6 wurde aufgrund seiner korrekten Sequenz und hohen Qualität der Sequenzdaten als pALae02 ausgewählt.

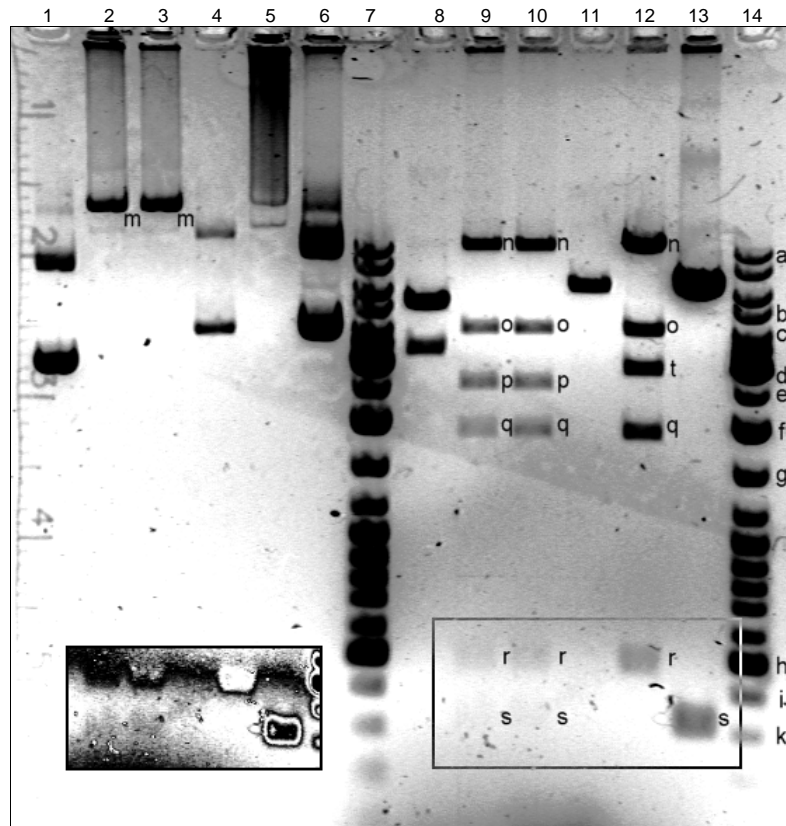
Aufgrund der schwierigen Gegebenheiten hinsichtlich der Verfügbarkeit geeigneter Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme in den 19 kb großen LRP1-Plasmiden war es nicht möglich, ein so kleines Fragment um die korrigierten Mutationen herum, wie es in pALae02 aus technischen Gründen<sup>22</sup> vorlag, in den Ausgangsvektor pFB-LRP zurückzuübertragen. Daher wurde in einem zusätzlichen Klonierungsschritt dieses subklonierte und in pALae02 korrigierte LRP1-Fragment um ein BamHI-Fragment aus pFB-LRP verlängert. Dadurch enthielt das subklonierte LRP1-Fragment in dem resultierenden Plasmid pALae03 (6121 bp) in seinem 3'-Bereich eine Erkennungssequenz für NsiI. Zusammen mit der Schnittstelle für NdeI, die zur Generierung von pALae01 genutzt wurde, ließ sich anschließend ein NdeI/NsiI-Fragment (2712 bp) mit korrektem LRP1-Leserahmen in pFB-LRP austauschen. Als Ergebnis wurde pFB-LRPwt (pALae04) erhalten. Dieser Vektor enthält den kompletten korrigierten Leserahmen für humanes LRP1.

Abbildung 7 zeigt den SmaI-Kontrollverdau der erhaltenen Klone nach der Ligation für pFB-LRPwt. Die erwarteten Fragmentgrößen sind 9988, 3896, 2825, 1842, 478 bp für den nicht korrigierten Ausgangsvektor pFB-LRP und 9988, 3896, 2505, 1842, 478, 321 bp für pFB-LRPwt aufgrund der im Rahmen der Mutagenese zusätzlich eingeführten Erkennungssequenz für SmaI. In Klon 2 und Klon 3 (Spuren 2/9 und 3/10) sind alle Signale vorhanden; durch den geringen Massenanteil der kleinen Fragmente (das 321 bp lange Fragment s entspricht nur 1.7 % der Gesamtsequenz) sind diese nur schwach zu erkennen. Zur Kontrastverbesserung ist dieser Bereich des Gels zusätzlich solarisiert<sup>23</sup> dargestellt.

<sup>21</sup> Sequenzierprimer sAE02a und sAE02b, s. S. 28.

<sup>22</sup> Ein größeres Fragment wäre nur unter großem Aufwand mit dem verwendeten Mutageneseansatz vereinbar gewesen: Zwar ist die komplette Amplifikation auch sehr großer Plasmide mit *PfuTurbo* DNA-Polymerase möglich und wurde in der Diplomarbeit des Autors durchgeführt, jedoch erhöht sich mit wachsender Fragmentlänge der Sequenzieraufwand bei sinkender Wahrscheinlichkeit, ein fehlerfreies Produkt zu erhalten.

<sup>23</sup> Durch die Solarisation wurde die Graustufenskala des Bildes so transformiert, daß dicht beieinander liegende Helligkeitswerte alternierend auf Schwarz und Weiß abgebildet werden. Dadurch entsteht auf Kosten des tatsächlichen Helligkeitswertes eine Vielzahl sehr steiler Helligkeitsgradienten, die die Grauwertverläufe im Bild extrem kontrastieren. Die Minima und Maxima der Solarisationskurve wurden manuell so gewählt, daß sich eine alternierende hell/dunkel-Markierung identischer Helligkeitsbereiche, vergleichbar mit Höhenlinien, ergibt.



**Abbildung 7: Plasmidgel und SmaI-Kontrollverdau der pFB-LRPwt-Ligationsklone (TAE, 1.0%)**  
 Klon 2 und Klon 3 (Spuren 2/9 und 3/10) zeigen das erwartete Bandenmuster für pFB-LRPwt inklusive des Fragments s aus pALae03.

1-4: pFB-LRPwt-Ligationsklone 1-4, 5: pFB-LRP, 6: pALae03, 7: 5 µg GeneRuler

8-11: pFB-LRPwt-Ligationsklone 1-4 :SmaI, 12: pFB-LRP:SmaI, 13: pALae03:SmaI, 14: 5 µg GeneRuler

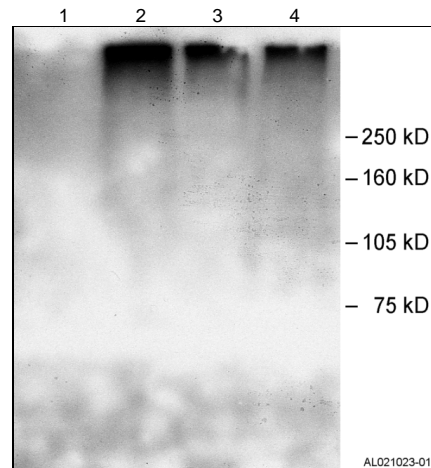
a: 10.0 kb, b: 5.0 kb, c: 4.0 kb, d: 3.0 kb, e: 2.5 kb, f: 2.0 kb, g: 1.5 kb, h: 500 bp, i: 400 bp, k: 300 bp  
 erwartete Fragmente:

m: Plasmidsignal, pFB-LRPwt (19 kb), n: (9988 bp), o: (3896 bp), p: (2505 bp), q: (1842 bp), r: (478 bp), s: (321 bp), t: (2825 bp)

Im Kasten unten links ist der markierte Ausschnitt solarisiert dargestellt (s. Text).

Nachdem die Transfektion von pFB-LRPwt in HEK293-Zellen nicht zu einer Überexpression von LRP1 führte, wurde in analoger Weise ein im Rahmen der Diplomarbeit aus pFB-LRP generierter Vektor korrigiert, dem der CMV-Promotor fehlt. Ohne den CMV-Promotor steht der LRP1-Leserahmen im erhaltenen pFB-polhLRPwt unter der Kontrolle des in pFB-LRPwt ebenfalls vorhandenen polh-Promotors. Dadurch ist eine Expression in der Insektenzelllinie Sf9 aus *Spodoptera frugiperda* möglich, um die Funktion der LRP1-Sequenz unabhängig von dem aus dem cDNA-Vektor übernommenen CMV-Promotor zu überprüfen.

Das Gesamtzellprotein aus den Produktionszellen für Baculoviren, die die LRP1-Kassette aus pFB-polhLRPwt enthalten<sup>24</sup>, wurde einer SDS-PAGE unterzogen. Im anschließenden Western-Blot gegen LRP1 (s. Abbildung 8) ist in allen Klonen deutlich das für LRP1 erwartete, hochmolekulare Signal (über 500 kD) zu erkennen (Spuren 2 bis 4). Dieses Signal fehlt in der virusfreien Kontrolle (Spur 1).



**Abbildung 8: Western-Blot gegen LRP1 in Sf9-Zellen**

Nach SDS-PAGE in einem 6%igen Gel deuten die Signale des Western-Blots in den Spuren 2 bis 4 auf eine erfolgreiche Überexpression von LRP1 in Sf9-Zellen hin.

1: Negativkontrolle, 2-4: LRP1-Baculovirus Klon 1-3

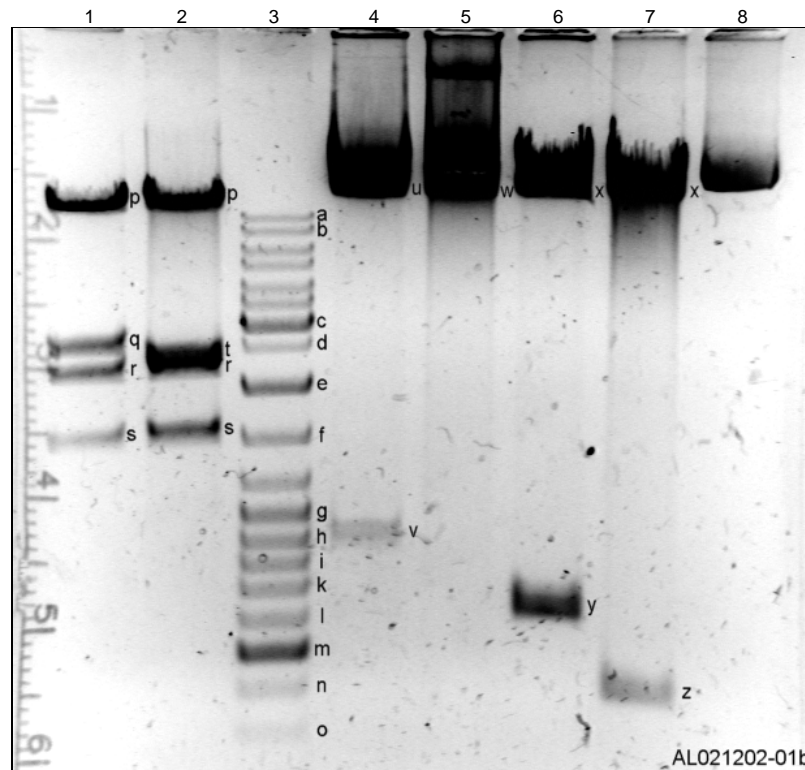
6 % PAA, nicht-reduziert; AK: 8G1/GAMPO; je 10 µg Gesamtprotein pro Spur

Aufgrund des Hinweises auf eine erfolgreiche LRP1-Expression durch pFB-polhLRP wurde für die Expression im humanen System der vorhandene und vermutlich zu kurze CMV-Promotor gegen eine längere Version aus pEGFP-N1 ausgetauscht. Als Ausgangsplasmid wurde statt pFB-LRPwt das in analoger Weise mutationskorrigierte pFB-cmvLRPwt verwendet. Letzteres wurde im Rahmen der Diplomarbeit erstellt und unterscheidet sich von pFB-LRPwt durch das Fehlen der LRP1-5'-UTR-Sequenz aus dem ursprünglichen cDNA-Klon. Durch den Verzicht auf diese Sequenz zwischen Promotor und LRP1-ORF sollte ein möglicher regulatorischer Einfluß der UTR-Sequenz ausgeschlossen werden.

Der Austausch der Promotorsequenz erfolgte durch Ligation der NotI/XhoI-geschnittenen PCR ALaf01/ALae05 auf pEGFP-N1 in pFB-cmvLRPwt:NotI/XhoI. Erhalten wurde pFB-cmv2LRP (pALae07). Abbildung 9 zeigt ein Kontrollgel des

<sup>24</sup> Die Generierung dieser Viren erfolgte entsprechend dem Kit „Bac-to-Bac<sup>®</sup> Baculovirus Expression System“: Die LRP1-Kassette ist in pFB-polhLRP1 von Erkennungssequenzen für eine bakterielle Transposase flankiert, die von einem Plasmid in *E. coli* DH10Bac kodiert wird. Diese Zellen enthalten zusätzlich ein baculovirales Genom als episomales Bacmid, das eine pUC-abgeleitete lacZ-Sequenz trägt, in die die Zielsequenz der Transposase eingefügt ist. Die Transformation von pFB-polhLRPwt in diese Bakterien führt daher zur Transposition der LRP1-Kassette in die lacZ-Sequenz des Bacmids. Die gewünschten Klone werden durch eine dreifache Antibiotikaresistenz und ausbleibende X-Gal-Färbung selektioniert. Die präparierten Bacmide sind infektiös und führen nach Transfektion in Sf9-Zellen zur Produktion von Baculoviren.

verwendeten Klons von pFB-cmv2LRP im Vergleich zum Ausgangsplasmid pFB-cmvLRPwt. Das Fragmentmuster entspricht den Erwartungen.



**Abbildung 9: Kontrollgel pFB-cmv2LRP gegen pFB-cmvLRP (TAE, 1.2%)**

Bei dem im Vergleich zum Ausgangsplasmid pFB-cmvLRP (Spuren 2, 5, 7) untersuchten Klon (Spuren 1, 4, 6 und 8) handelt es sich um das gewünschte Plasmid pFB-cmv2LRP.

1, 2: :BamHI, 3: 5 µg GeneRuler, 4, 5: :NdeI, 6, 7: :NotI/XhoI, 8: pFB-cmv2LRP

a: 10.0 kb, b: 8.0 kb, c: 3.0 kb, d: 2.5 kb, e: 2.0 kb, f: 1.5 kb, g-o: 1.0, 0.9, ..., 0.3 kb erwartete Fragmente:

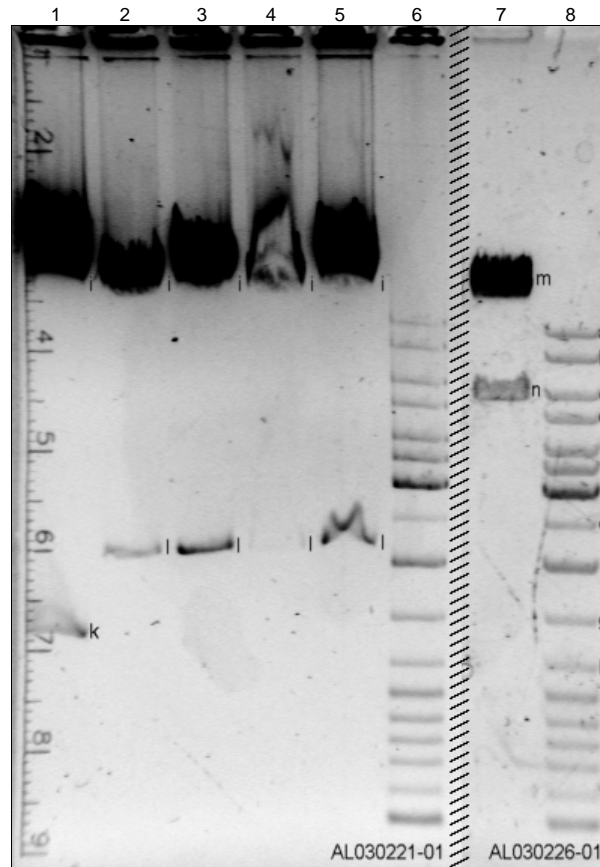
p: (12588 bp), q: (2637 bp), r: (2217 bp), s: (1522 bp), t: (2409 bp), u: (18102 bp), v: (876 bp),

w: (18750 bp), x: (18369 bp), y: (609 bp), z: (381 bp)

Da grundsätzlich das Ziel verfolgt wurde, ein fluoreszierendes Fusionsprotein aus LRP1 und EGFP für die Lebendzellmikroskopie herzustellen, wurde parallel zu den oben beschriebenen Arbeiten ein für EGFP kodierendes Plasmid zur Ligation in pFB-cmv2LRP vorbereitet.

Für den ersten Schritt wurde das Plasmid pALac01 verwendet, das ebenfalls im Rahmen der Diplomarbeit des Autors erstellt wurde und das das 3'-Ende des LRP1-Leserahmens enthält. Der EGFP-Leserahmen wurde als PCR-Produkt von ALaf03/04 auf pEGFP-N1 über die Schnittstellen für PpuMI und HindIII an das Ende des subklonierten LRP1-Fragments in pALac01 ligiert. Durch das entfallene Stopcodon der LRP1-Sequenz und die entsprechende Primerwahl (vgl. S. 28) wurde die LRP1-Sequenz im richtigen Leserahmen um die EGFP-Sequenz erweitert und endet nun mit dem Stopcodon aus pEGFP-N1. Vor das so erhaltene, mit EGFP-fusionierte 5'-Ende der LRP1-3'-Sequenz in dem erhaltenen Plasmid pALaf03 wurde die fehlende

LRP1-5'-Sequenz inklusive des funktionalen CMV-Promotors als 14.2-kb-Fragment aus pFB-cmv2LRP:Bsui36I/NotI ligiert (in pALaf03:Bsui36I/NotI). Abbildung 10 zeigt Restriktionsfragmente der erhaltenen Klone. Alle Klone zeigen die erwarteten Fragmentgrößen. Klon 1 wurde als pFB-LRP-EGFP (pALaf04) ausgewählt.



**Abbildung 10: Kontrollgel der pFB-LRP-EGFP-Ligationsklone (TAE, 0.8%)**

Klon 1 in Spur 2 zeigt am deutlichsten das erwartete Bandenmuster und wurde daher als pFB-LRP-EGFP ausgewählt.

1: pFB-cmv2LRP:HindIII (Negativkontrolle), 2-5: pFB-LRP-EGFP-Ligationsklon 1-4 :HindIII,  
6: 7.5 µg GeneRuler, 7: 0.5 µg pFB-LRP-EGFP-Ligationsklon 1 :Bsui36I/NotI, 8: 7.5 µg GeneRuler  
a: 10.0 kb, b: 8.0 kb, c: 6.0 kb, d: 5.0 kb, e: 2.5 kb, f: 2.0 kb, g: 1.5 kb, h: 1.2 kb

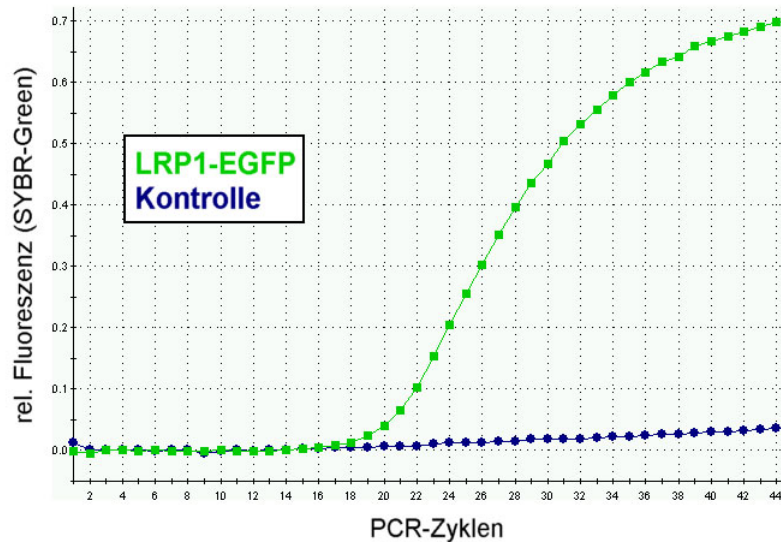
erwartete Fragmente:

i: (17535 bp), k: 3'-LRP1-Fragment (1443 bp), l: 3'-LRP1-EGFP-Fragment (2177 bp), m: (14218 bp),  
n: (5494 bp)

Der Vektor pFB-LRP-EGFP wurde zur Expressionsanalyse in HEK293-Zellen transfiziert und die Zellen nach zwei Tagen mittels quantitativer RT-PCR auf die Expression der zugehörigen mRNA getestet. Die verwendeten Primer ALai01 und ALac07 flankieren im 3'-Bereich der LRP1-EGFP-mRNA eine Sequenz, die bereits nicht mehr in der endogenen mRNA vorkommt, sondern sich aus der SV40-PolyA-Sequenz und einigen Basen Übergangssequenz zusammensetzt. Das erhaltene Produkt stammt daher ausschließlich von mRNA-Molekülen, die vom transfizierten pFB-LRP-EGFP transkribiert wurden. Der in der PCR-Reaktion vorhandene Farbstoff SYBR-Green fluoresziert in Gegenwart von dsDNA, die während der Reaktion gebildet wird.



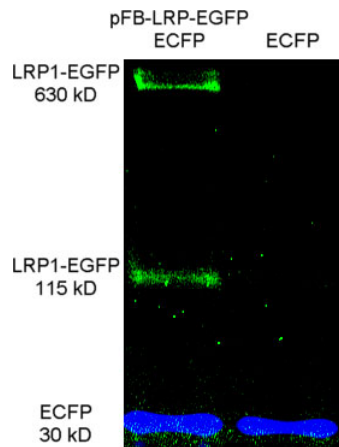
Eine absolute Quantifizierung der dsDNA ist jedoch nur mit zusätzlichen Standards möglich und wurde für diesen Expressionstest nicht durchgeführt. Die Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zyklenzahl der PCR ist in Abbildung 11 dargestellt. Nach Abschluß der Reaktion wurde mit einem Agarosegel die Abwesenheit von unspezifischen Produkten bestätigt (nicht dargestellt), die das Signal verfälscht hätten.



**Abbildung 11: Quantitative RT-PCR zum Nachweis der LRP1-EGFP-mRNA**

Die Zunahme des Fluoreszenzsignals der SYBR-Green/dsDNA-Komplexe in Abhängigkeit von der Zyklenzahl der PCR-Reaktion mit ALac07/ALai01 zeigt die Anwesenheit der LRP1-EGFP-mRNA in transfizierten Zellen (grün) an. In der nicht-transfizierten Kontrolle (blau) ist ein solches Signal nicht zu beobachten.

Zur Analyse auf Proteinebene wurden HEK293-Zellen mit pECFP-N1 und gleichzeitig mit und ohne pFB-LRP-EGFP transfiziert, nach zwei Tagen lysiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Abbildung 12 zeigt die im Gel detektierten Fluoreszenzen. Neben dem Signal von ECFP (30 kD) sind in der linken Spur erwartungsgemäß zwei EGFP-Signale zu erkennen: Eines bei 115 kD, entsprechend dem prozessierten 85-kD-Fragment von LRP1, an das 30 kD EGFP fusioniert sind, sowie ein weiteres Signal im hochmolekularen Bereich, das dem unprozessierten Anteil an LRP1 und seinem Fusionspartner EGFP entspricht und rechnerisch 630 kD groß ist.

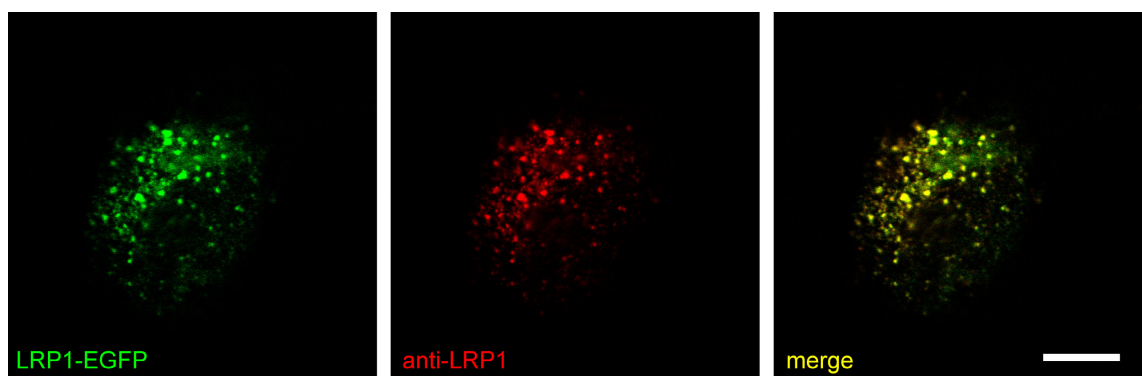


**Abbildung 12: In-gel Fluoreszenz von LRP1-EGFP**

HEK293-Zellen wurden mit pECFP-N1 sowie gleichzeitig mit bzw. ohne pFB-LRP-EGFP transfiziert. Nach der Detektion der Fluoreszenzen nach SDS-PAGE in einem 10%igen Gel sind Signale von ECFP bei 30 kD in beiden Proben sichtbar; nur die mit pFB-LRP-EGFP transfizierten Zellen zeigen EGFP-Signale (eine Bande bei 115 kD und eine weitere, sehr hochmolekulare Bande im Bereich über 500 kD).

Entsprechende Signale wurden im Western-Blot erhalten, d. h. die prozessierten Untereinheiten von LRP1-EGFP wurden von gegen LRP1 gerichteten Antikörpern erkannt. Ergebnisse eines solchen Western-Blots sind weiter unten im Zusammenhang mit RNAi gegen LRP1 dargestellt (Abbildung 17, links, Spur 1, S. 58).

Zur Überprüfung der intrazellulären Lokalisation von exprimiertem LRP1-EGFP wurde in transfizierten HEK293-Zellen LRP1 immunzytochemisch angefärbt. Etwaige, offensichtliche Fehlsortierungen und -prozessierungen sollten auf diese Weise ebenfalls erkennbar sein (weitergehende Daten zur intrazellulären Lokalisation s. Kapitel 3.2.1, S. 58).



**Abbildung 13: Intrazelluläre Darstellung von LRP1-EGFP**

Mit pFB-LRP-EGFP transfizierte HEK293-Zellen wurden immunzytochemisch mit dem LRP1-Antikörper 8G1 und einem Cy3-markierten Zweitantikörper gefärbt. Die konfokalen Aufnahmen zeigen eine vollständige Überlappung (gelb) der vesikulären Signale von LRP1-EGFP (grün) und der Antikörperfärbung (rot). Skalierungsbalken: 10  $\mu\text{m}$

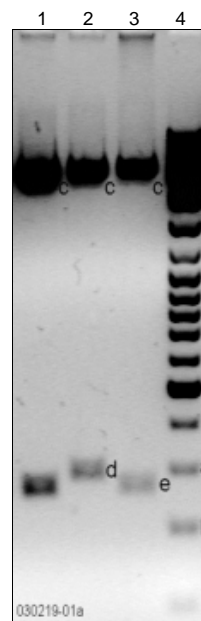
In Abbildung 13 ist deutlich die typische, vesikuläre Struktur des LRP1-Kompartiments zu erkennen. Die Signale aus der indirekten Immunfluoreszenz (rot, Mitte), die sowohl

LRP1-EGFP als auch endogenem LRP1 entsprechen, decken sich vollständig (gelb, rechts) mit den EGFP-Signalen von LRP1-EGFP (grün, links). Auffällige Fehllokalisationen sind nicht erkennbar.

Es wurde somit ein Vektor hergestellt, von dem humanes LRP1 in voller Länge als Fusionsprotein mit EGFP exprimiert werden kann. Das exprimierte Protein wird immunologisch korrekt erkannt und zeigt das typische zelluläre Lokalisationsmuster des endogenen LRP1.

### 3.1.2 RNA-Interferenz gegen LRP1

Zur Erstellung eines Plasmidvektors zur Expression von shRNA wurden die gepaarten Oligonukleotide ALag01/02 in pSUPER:BglII/SalI (Brummelkamp et al. 2002) ligiert. Das erhaltene Plasmid pALsh (pALag01) wurde durch einen doppelten Schnitt mit BseRI geöffnet und jeweils mit dem selbstgepaarten Oligonukleotid ALag04 oder ALag05 (s. S. 28) wieder geschlossen (vgl. Kapitel 4.1, S. 80), um entsprechend die shRNA-exprimierenden Plasmide pALag04 und pALag05 zu erhalten. Abbildung 14 zeigt exemplarisch für die Ligation von pALag04 den Kontrollverdau mit AvaI, der für Klon 2 (Spur 2) den erwarteten Größenzuwachs von Fragment e auf Fragment d zeigt.



**Abbildung 14: Kontrollgel der pALag04-Ligationsklone (TAE, 2.0%)**

Das in pALag04 insertierte Oligodeoxynukleotid führt zu einer Größenzunahme von Fragment e, das im korrekten Klon 2 (Spur 2) als Fragment d zu erkennen ist.

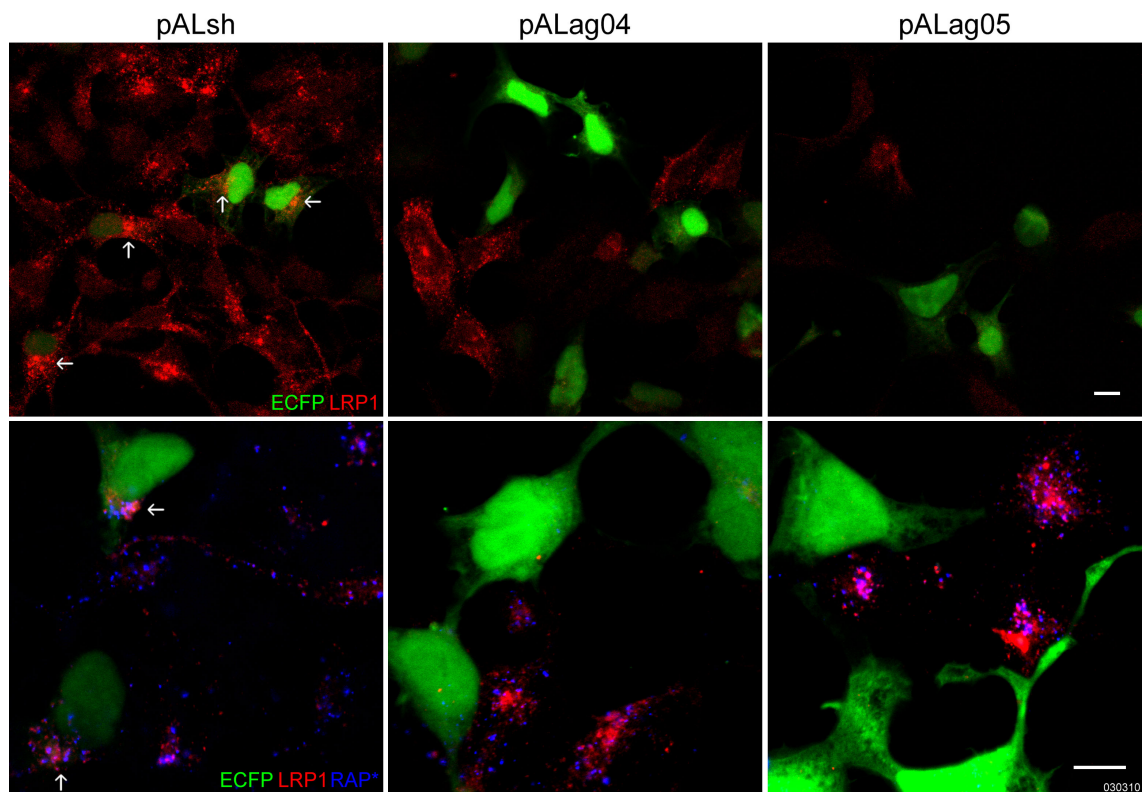
1-2: pALag04-Ligationsklon 1-2 :AvaI, 3: pALsh:AvaI (Negativkontrolle), 4: 7.5 µg GeneRuler

a: 300 bp, b: 200 bp

erwartete Fragmente: c: (2919 bp), d: (296 bp), e: (266 bp)

Zur Überprüfung der Funktionalität der shRNA-Plasmide wurden sie in HEK293-Zellen transfiziert und die Zellen nach drei Tagen immunzytochemisch gegen LRP1

gefärbt. Zusätzlich wurde mit einem Teil der Zellen ein Aufnahmeexperiment mit dem LRP1-spezifischen Liganden RAP durchgeführt. Der zu transfizierenden DNA wurde im Unterschuß (ca. 10%) pECFP-N1 zugesetzt, um transfizierte Zellen im Mikroskop erkennen zu können. Durch den starken Unterschuß sollten falsch-positiv als ko-transfiziert erscheinende Zellen ausgeschlossen werden, mit der Konsequenz einer erhöhten Zahl an falsch-negativ nicht mit ECFP markierten Zellen. Wie in Abbildung 15 zu sehen, ist nach der Transfektion mit dem leeren Kontrollvektor pALsh (links) typisch lokalisiertes, perinukleäres LRP1 (rot) in grünen, d. h. transfizierten Zellen zu erkennen. Das Verteilungsmuster unterscheidet sich nicht von dem in den umliegenden, nicht grün markierten Zellen. Entsprechend erfolgt die RAP-Aufnahme (blau, unten) sowohl in markierte als auch nicht markierte Zellen. Nach der Transfektion mit pALag04 (Mitte) und pALag05 (rechts) zeigen die grünen, tatsächlich transfizierten Zellen jedoch wie erwartet keinerlei LRP1-Signal mehr, noch nehmen sie RAP auf. Die umliegenden, nicht-transfizierten Kontrollzellen, deren Kerne nicht sichtbar sind, zeigen jedoch weiterhin das normale Signalmuster.

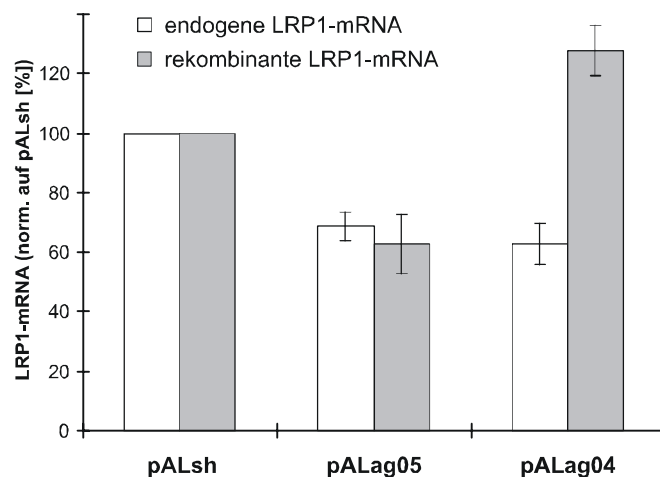


**Abbildung 15: Funktioneller Test der shRNA-Vektoren**

HEK293-Zellen wurden mit shRNA-Vektoren und pECFP-N1 im Massenverhältnis 9:1 ko-transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert (oben) bzw. zuvor eine RAP-Aufnahme für 30 min durchgeführt (unten). Anschließend wurde LRP1 immunzytochemisch mit dem Antikörper 8G1 detektiert. In der Kontrolle mit pALsh (links) zeigen die ko-transfizierten Zellen (grüne ECFP-Expression) genauso wie die nicht transfizierten Zellen im gleichen Bildausschnitt LRP1- und RAP-Signale (Pfeile). Diese Signale fehlen in den Zellen, die mit einem der Plasmide für eine LRP1-spezifische shRNA ko-transfiziert wurden (Mitte und rechts).

Fixierte Präparate; Dicke der optischen Schnitte: 3  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 10  $\mu\text{m}$

Da die mRNA-Zielsequenz von pALag04 in der 3'-UTR der humanen LRP1-mRNA liegt, die für diesen Bereich keine Sequenzähnlichkeit mit der aus SV40 abgeleiteten 3'-UTR des rekombinanten LRP1 aus pFB-LRP-EGFP aufweist, sollte es möglich sein, mit pALag04 endogenes LRP1 neben rekombinantes LRP1 selektiv zu supprimieren. pALag05 hingegen produziert eine shRNA, die komplementär zu einer Sequenz im 5'-Bereich der kodierenden LRP1-Sequenz ist. Dieser Vektor sollte demnach sowohl gegen endogene als auch rekombinante LRP1-mRNA gerichtet sein. Um diese Unterschiede zu zeigen, wurden Zellen drei Tage nach Ko-Transfektion mit einem shRNA-Vektor und pFB-LRP-EGFP mit RT-qPCR analysiert. In Abbildung 16 ist eine vergleichbare, wenn auch absolut gesehen moderate Reduktion von endogener und rekombinanter LRP1-mRNA mit pALag05 zu sehen. Die Wirkung des diskriminierenden Vektors pALag04 auf die endogene mRNA unterscheidet sich davon nicht, jedoch ist nach Transfektion von pALag04 die rekombinante mRNA wie erwartet nicht erniedrigt, sondern sogar merklich erhöht.

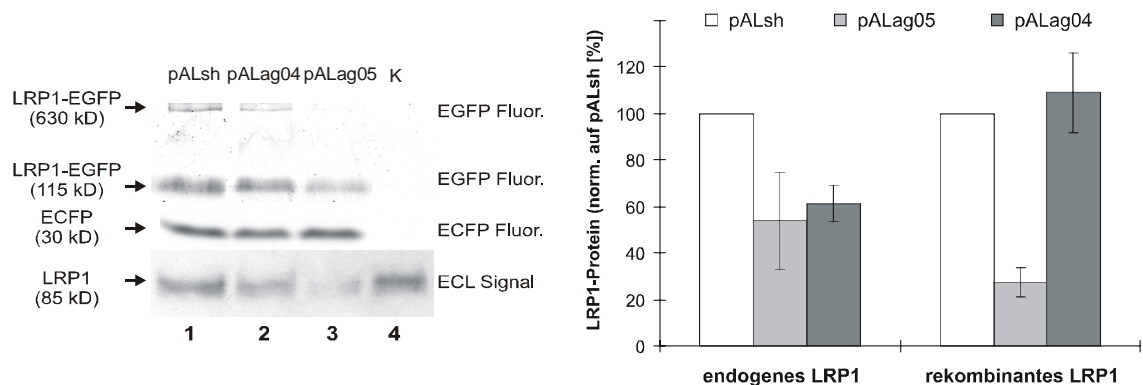


**Abbildung 16: Quantifizierung der RNAi-vermittelten mRNA-Degradation**

HEK293-Zellen wurden mit shRNA-Vektoren und pFB-LRP-EGFP ko-transfiziert. Nach drei Tagen wurde die mRNA isoliert und mittels RT-qPCR analysiert (Primer für endogenes LRP1: ALai02/ALac08, rekombinantes LRP1: ALai01/ALac07). Gezeigt sind die relativen Mengen an endogener und rekombinanter LRP1-mRNA gegen GAPDH mRNA jeweils bezogen auf den Gehalt in kontroll-transfizierten Zellen.

Trotz einer im ungünstigen Fall nur bei ca. 50 % liegenden Transfektionseffizienz blieb eine Diskrepanz zwischen der in Abbildung 15 gesehenen, vollständigen Abwesenheit von nachweisbarem LRP1 in transfizierten Zellen und der recht moderaten mRNA-Repression in Abbildung 16. Eine Wiederholung der qPCR mit Primerpaaren, die die jeweilige siRNA-Zielsequenz flankierten, erbrachte die gleichen Ergebnisse. Die in Abbildung 17 dargestellte Quantifizierung des Proteingehalts der Zellen ergab jedoch deutlichere Ergebnisse, die qualitativ den Daten auf mRNA-Ebene entsprechen. Dazu wurde das Zellprotein aus Zellen, die mit pFB-LRP-EGFP, pECFP-N1 und jeweils einem der shRNA-Vektoren ko-transfiziert worden waren, mit einer SDS-PAGE auf-

getrennt. Die fluoreszierenden Proteine (prozessiertes und unprozessiertes LRP1-EGFP sowie die Transfektionskontrolle ECFP) wurden mit einem Fluoreszenzscanner direkt im Gel detektiert und endogenes LRP1 als 85-kD-Fragment über einen Western-Blot mit dem Antikörper 5A6 nachgewiesen (Abbildung 17, links). Diese Signale wurden anschließend quantifiziert und relativ zur pALsh-Kontrolle im Diagramm in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Quantifizierung der RNAi-vermittelten Protein-Suppression**

HEK293-Zellen wurden mit shRNA-Vektoren, pECFP-N1 und pFB-LRP-EGFP ko-transfiziert. Nach drei Tagen wurde das Zellprotein mit einer SDS-PAGE analysiert (links, repräsentatives Experiment, Details s. Text) und quantifiziert (rechts). Gezeigt sind die relativen Mengen an endogenem und rekombinantes LRP1 jeweils bezogen auf den Gehalt in kontroll-transfizierten Zellen.

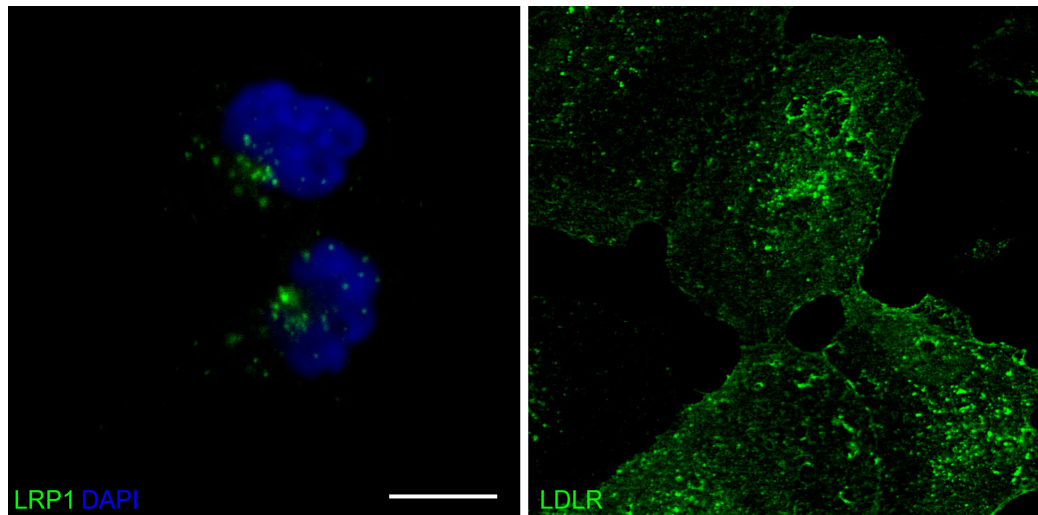
Es wurde somit ein Vektorsystem erstellt, das in der Lage ist, spezifisch die Expression von LRP1 zu unterdrücken. Darüber hinaus ist es damit möglich, endogenes LRP1 gegen rekombinantes LRP1 auszutauschen (Laatsch et al. 2004, weitere Details s. Kapitel 4.1, S. 80).

## 3.2 Zellbiologie von LRP1

### 3.2.1 Intrazelluläre Lokalisation von LRP1 und LRP1-EGFP

Zur Analyse der intrazellulären Verteilung von LRP1 wurde LRP1 immunzytochemisch angefärbt. Als Vergleich dient eine Färbung des LDLR. Verwendet wurde die humane Hepatom-Zelllinie HuH7 (Nakabayashi et al. 1982), die vor der Färbung zwei Tage in lipoproteinfreiem Medium gehalten wurde, um durch Cholesteralmangel die Expression des LDLR zu stimulieren.





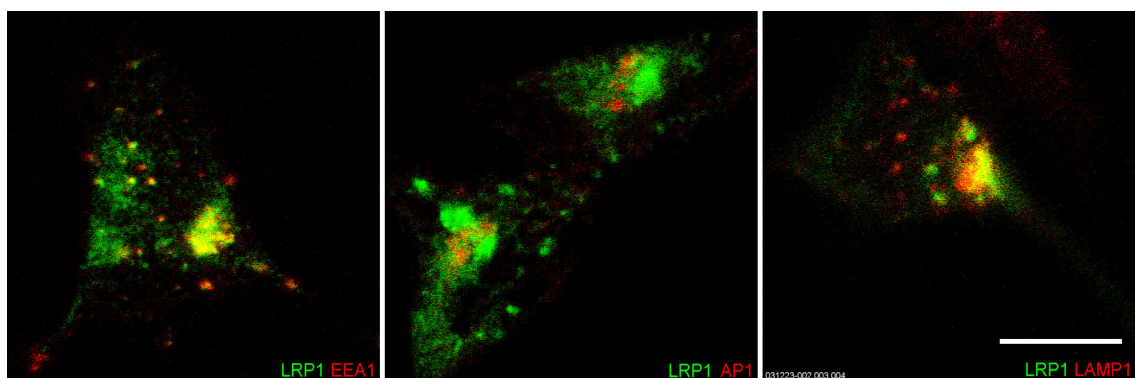
**Abbildung 18: Intrazelluläre Lokalisation von endogenem LRP1 in HuH7 im Vergleich zum LDLR**

HuH7-Zellen zeigen immunzytochemisch angefärbtes LRP1 ausschließlich in perinukleär lokalisierten Vesikeln (grün, links; vgl. auch Abbildung 34, S. 71). Im Gegensatz dazu führt die Anfärbung des LDLR (grün, rechts) zu einer deutlichen PM-Färbung. Das rechte Bild enthält aus technischen Gründen keine blaue Kernfärbung und wurde freundlich von J. Heeren, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

Fixierte Präparate; Dicke der optischen Schnitte: 1.5  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 10  $\mu\text{m}$

In Abbildung 18 gut zu erkennen ist die typische, regelmäßig beobachtete, perinukleäre Lokalisation des LRP1 in vesikulären Strukturen. Eine Färbung der Plasmamembran, wie sie für den LDLR typisch ist, ist für LRP1 nicht zu erkennen.

Abbildung 19 zeigt die Lokalisation von LRP1-EGFP in Relation zu intrazellulären Markerproteinen. Entsprechend Abbildung 18 ist der Großteil des LRP1-EGFP perinukleär konzentriert. Für die vesikulären Signale ist eine Kolokalisation mit EEA1 (frühe Endosomen) erkennbar. Keine vesikuläre Kolokalisation ergab sich mit AP1 (*Adaptor-related Protein 1*, ein Golgi-Marker) und LAMP1 (*Lysosomal-associated Membrane Protein 1*, ein lysosomaler Marker).



**Abbildung 19: Lokalisation von LRP1-EGFP**

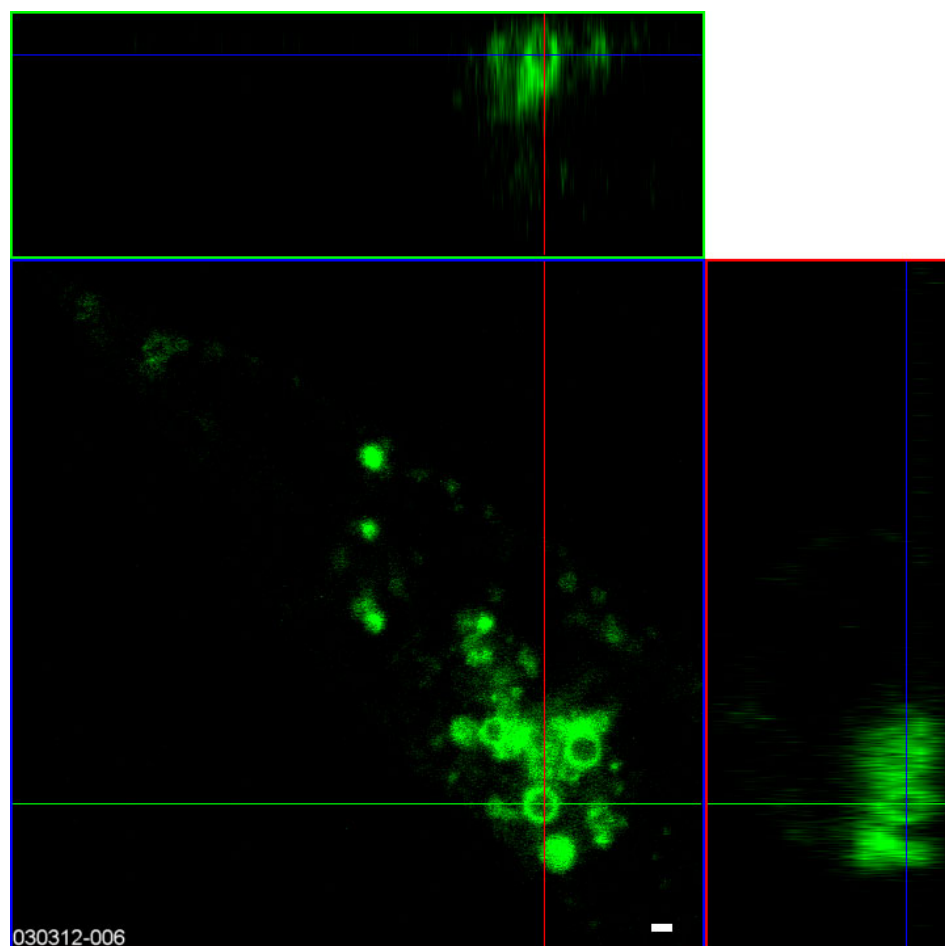
In über Nacht gehungerten HEK293-Zellen ist ein großer Teil des LRP1-EGFP (grün) perinukleär lokalisiert. Die vesikulären Signale kolokalisieren mit EEA1 (links, rot) aber nicht mit AP1 (Mitte, rot) oder LAMP1 (rechts, rot). Die perinukleäre Überlappung der LAMP1- und LRP1-EGFP-Signale ist wie der entsprechende Bereich in linken Bild für EEA1 nicht spezifisch. Entscheidend sind in beiden Aufnahmen die einzeln erkennbaren EEA1- bzw. LAMP1-Vesikel. Nur die EEA1-Vesikel zeigen eine Kolokalisation (gelb) mit LRP1-EGFP.

Fixierte Präparate; Dicke der optischen Schnitte: 1  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 10  $\mu\text{m}$

### 3.2.2 Morphologie des LRP1-Kompartiments

Aufgrund der in Kapitel 3.1.1 und 3.2.1 dargestellten Beobachtungen, daß LRP1-EGFP sich in Bezug auf Lokalisation und Ligandenbindung verhält wie endogenes LRP1, wurde das fluoreszierende LRP1-EGFP als Modell für endogenes LRP1 verwendet. Dies erlaubt die Untersuchung mit konfokaler Lebendzellmikroskopie und vermeidet das Auftreten von Artefakten durch die Immunfärbung und Fixierung der Zellen. Darüber hinaus ist mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie die Beobachtung zeitlich aufeinander folgender Prozesse in ein und derselben Zelle möglich. Dadurch ergibt sich ein wesentlich verlässlicheres Bild der zellbiologischen Vorgänge, als aus der Analyse verschiedener, zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixierter Zellpräparate.

Aufgrund der schlechten Transfizierbarkeit von Hepatomzellen, insbesondere mit großen Plasmiden wie pFB-LRP-EGFP, wurden Lebendzelleexperimente mit transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Zunächst wurden die LRP1-EGFP-haltigen Vesikelstrukturen mit hochauflösenden Aufnahmen untersucht.



**Abbildung 20: Dreidimensionale Darstellung von LRP1-EGFP-Vesikeln**

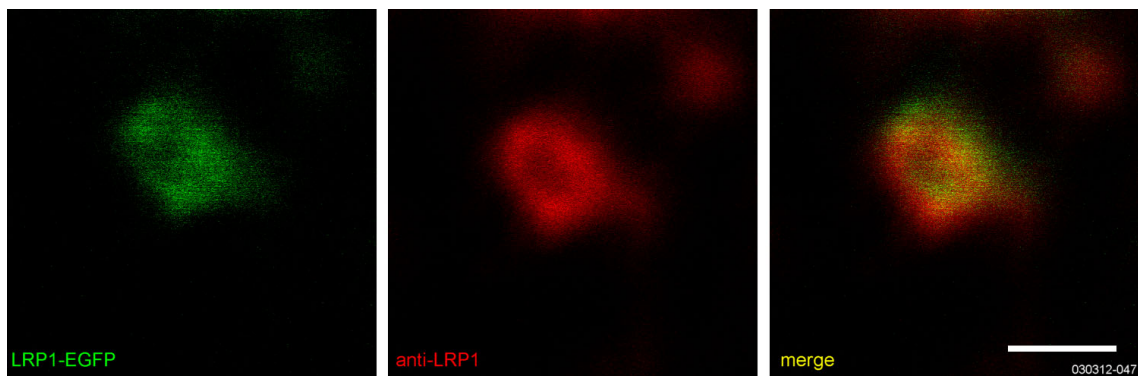
Die dreidimensionale Rekonstruktion zeigt Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 1 µm, die im konfokalen z-Schnitt (zentrale Fläche, höchste räumliche Auflösung) als Ring erscheinen. Auch in den rekonstruierten x- und y-Schnitten ist das angeschnittene Vesikel als ringförmige Struktur zu erkennen (oben und rechts; die Lage der Schnittebenen ist mit farbigen Linien markiert).

Live-imaging; Dicke der optischen Schnitte: 1.5 µm; Skalierungsbalken: 1 µm



Abbildung 20 zeigt LRP1-EGFP-haltige Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$ . Die dreidimensionale Rekonstruktion zeigt eindeutig eine sphärische, geschlossene Vesikelform mit einer LRP1-EGFP-haltigen Oberfläche und einem nicht-fluoreszierenden Lumen, was darauf hindeutet, daß LRP1-EGFP sich wie LRP1 in die Vesikelmembran integriert.

Da LRP1-Vesikel dieser Größe in fixierten Präparaten bisher nicht beobachtet wurden und sie daher ein Überexpressions- oder Sortierungsartefakt des LRP1-EGFP darstellen könnten, wurden einerseits fixierte Präparate mit LRP1-EGFP hergestellt und andererseits Immunfärbungen von endogenem LRP1 in großem Umfang auf derartige Strukturen hin untersucht.

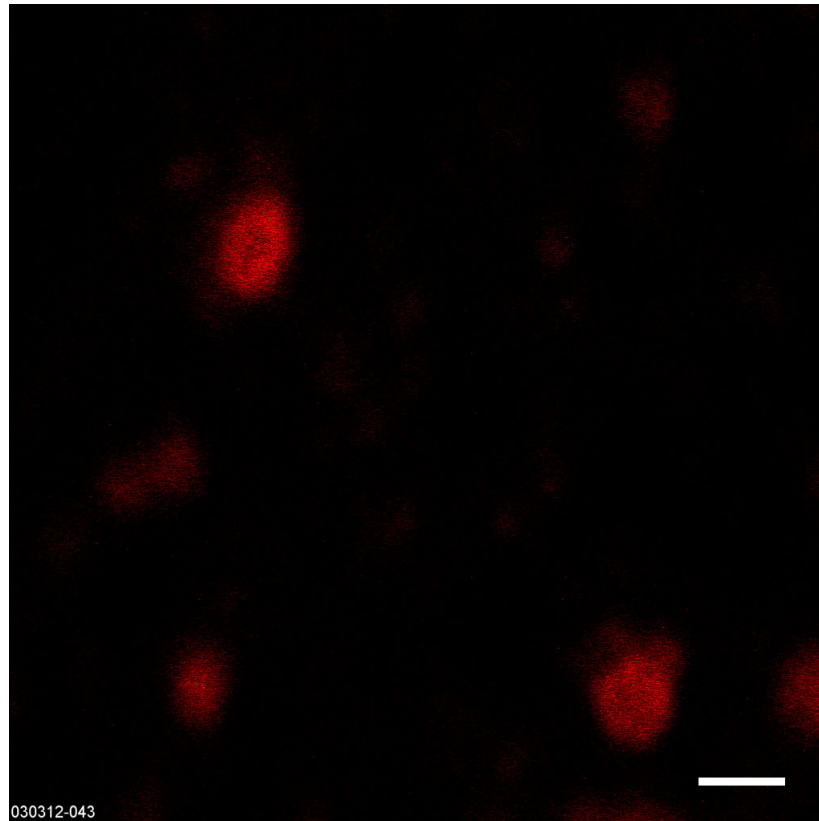


**Abbildung 21: LRP1-EGFP-Vesikel im fixierten Zellpräparat**

Die Großaufnahme zeigt eines der seltenen LRP1-EGFP-Vesikel, bei denen auch nach der Fixierung Lumen und Vesikeloberfläche mikroskopisch aufgelöst werden können. Die Gegenfärbung wurde mit dem Antikörper 8G1 und Cy3-Färbung durchgeführt (rot).

Fixiertes Präparat; Dicke des optischen Schnittes: 0.7  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 1  $\mu\text{m}$

Es bestätigte sich, daß in fixierten Präparaten das Lumen von LRP1-EGFP-Vesikeln in der Regel nicht dargestellt werden kann. Statt dessen finden sich lediglich kleinere, kompakte LRP1-EGFP-Signale. Abbildung 21 zeigt eines der wenigen fixierten Vesikel, deren Struktur nach der Fixierung und Färbung noch in einem der lebenden Zelle vergleichbaren Zustand erhalten geblieben ist. In nicht-transfizierten Zellen stellt sich die Situation genauso dar. Auch dort sind jedoch vereinzelt noch intakte Vesikel mit endogenem LRP1 nachweisbar, wie Abbildung 22 zeigt.



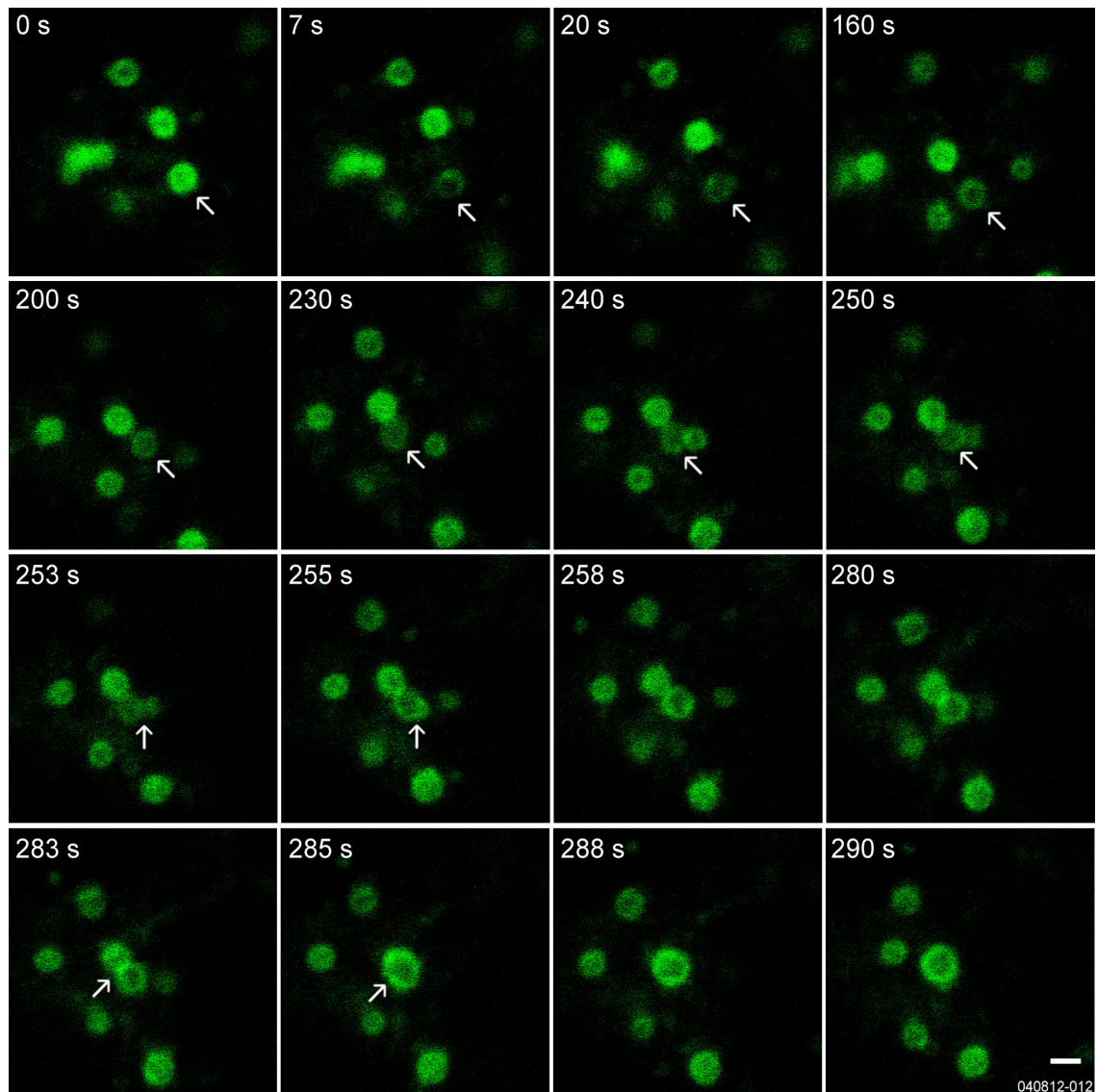
**Abbildung 22: Vesikel mit endogenem LRP1 im fixierten Zellpräparat**

LRP1-Vesikel in nicht-transfizierten Zellen stellen sich nach Färbung mit dem LRP1-spezifischen Antikörper 8G1 üblicherweise nur als kompaktes Signal dar. In dem hier gezeigten Ausschnitt ist jedoch auch eines der wenigen Vesikel zu sehen, bei dem LRP1-haltige Membran und Lumen gerade noch getrennt erkennbar sind. In seinen Dimensionen entspricht es Vesikeln wie in Abbildung 21.

Fixiertes Präparat; Dicke des optischen Schnittes: 0.8  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 1  $\mu\text{m}$

Da also einerseits große LRP1-EGFP-Vesikel in fixierten Zellen in genauso geringen Zahlen beobachtet wurden wie Vesikel mit endogenem LRP1 in nicht-transfizierten, ebenfalls fixierten Zellen, aber andererseits die großen Vesikel mit LRP1-EGFP in der Lebendzellmikroskopie dominieren, wurde davon ausgegangen, daß diese Vesikel während des Fixier- und Färbeprozesses kollabieren. Daher wurde angenommen, daß es sich bei den großen Vesikeln nicht um ein Artefakt aufgrund des überexprimierten Proteins handelt, sondern auch endogenes LRP1 in solchen Vesikeln vorkommt, diese jedoch mangels entsprechender Darstellungstechniken zuvor noch nicht nachgewiesen werden konnten.

Die weitere Untersuchung der LRP1-EGFP-Vesikel beschäftigte sich mit deren Verhalten über die Zeit. Die Zeitserie in Abbildung 23 zeigt exemplarisch die typische Mobilität dieser Vesikel, ihre Fusionsaktivität und ihr Verhalten nach partiellem Photobleichen.



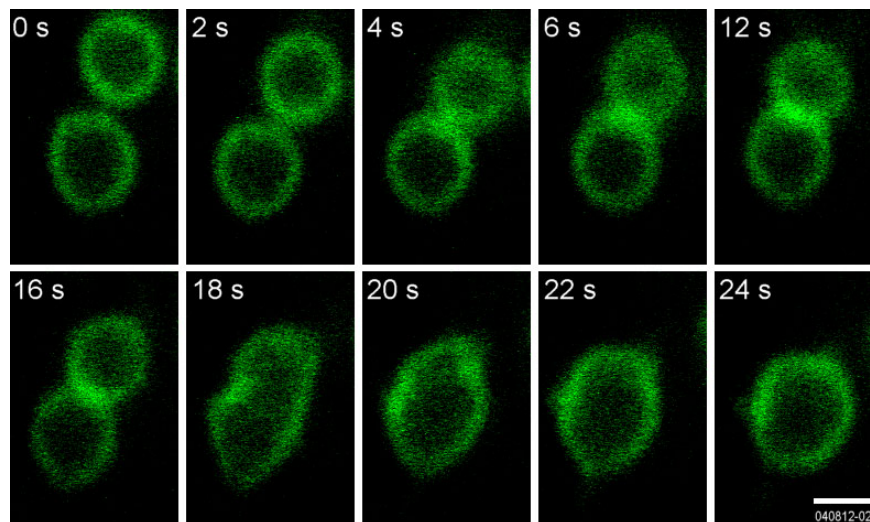
### Abbildung 23: Bewegung und Fusion von LRP1-EGFP-Vesikeln

Die Zeitreihe zeigt die Bewegung und Fusion von LRP1-EGFP-Vesikeln (Details s. Text). Zum Zeitpunkt 3 s wurden die Fluorophore in der unteren Hälfte des in der oberen Reihe markierten Vesikels durch kurze, intensive Bestrahlung mit einer 488-nm-Laserlinie ausgebleicht.

Live-imaging; Dicke der optischen Schnitte: 2.5  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 1  $\mu\text{m}$

Abbildung 23 zeigt die grundsätzliche Mobilität der Vesikel, die jedoch nicht durch eine extreme Beweglichkeit auffällt. Wesentlich schneller ist jedoch die Lateraldiffusion der LRP1-EGFP-Moleküle innerhalb der Vesikelmembran: Nach 3 s wurde mit Hilfe eines intensiven Laserstrahls mit einer Wellenlänge von 488 nm gezielt die untere Hälfte des in der oberen Reihe markierten Vesikels bestrahlt und die getroffenen Fluorophore ausgebleicht. Bereits zum Zeitpunkt der nächsten Aufnahme (7 s) sind die entsprechenden Membranbereiche wieder gefärbt, was auf eine schnelle Einwanderung von LRP1-EGFP-Molekülen aus dem nicht gebleichten Bereich hindeutet. Wenige Sekunden später ist die Fluoreszenzintensität wieder gleichmäßig verteilt. Diese Vorgänge wurden jedoch aufgrund der abweichenden Fragestellung dieser Arbeit bisher

nicht umfassender untersucht. Die weiteren Bilder zeigen die Bewegung der Vesikel, bis es zwischen 253 s und 255 s an der mit einem Pfeil gekennzeichneten Stelle zu einer Vesikelfusion unter Beteiligung des zu Beginn partiell gebleichten Vesikels kommt. Die Fluoreszenzintensität steigt nach der Fusion mit dem nicht gebleichten Vesikel wieder merklich an. Zu einer weiteren Fusion kommt es zwischen 283 s und 285 s. Das Vesikel, das aus dieser Fusion zweier etwa gleich großer Vesikel hervorgeht, weist einen merklich größeren Durchmesser als die Ausgangsvesikel auf. Eine ähnliche Fusion ist in Abbildung 24 in höherer Auflösung zu sehen.



**Abbildung 24: Fusion zweier LRP1-EGFP-Vesikel**

Die Zeitserie zeigt die Fusion von zwei LRP1-EGFP-Vesikeln. Das Signal der Vesikelmembran entspricht in seiner Breite sehr gut der etwa erreichbaren optischen Auflösung von  $\lambda:2 = 0.25 \mu\text{m}$ . Eine noch detailliertere Darstellung der Membranen an der Fusionsstelle ist daher mit dieser Technik nicht möglich. Aufnahmen mit einer höheren zeitlichen Auflösung von bis zu  $\Delta t = 0.2 \text{ s}$  ergaben keine zusätzlichen Informationen.

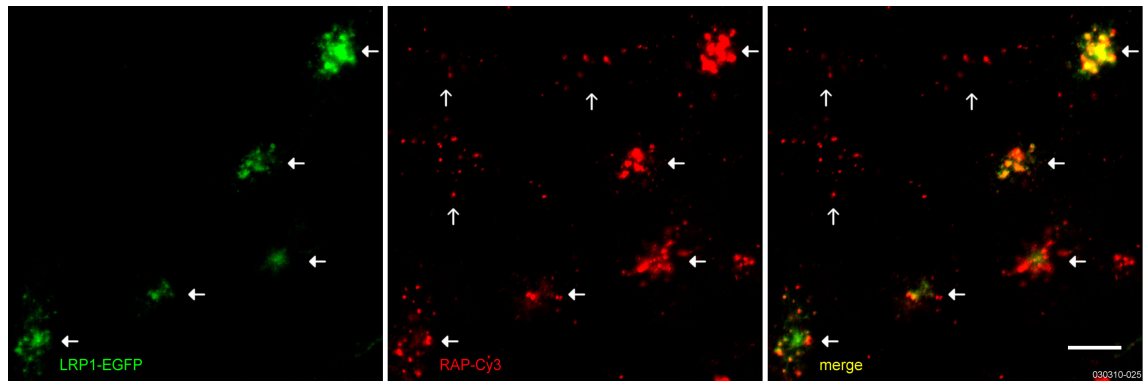
Live-imaging; Dicke der optischen Schnitte:  $3 \mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken:  $1 \mu\text{m}$

Die erhaltenen Daten zeigen, daß das Kompartiment, in dem sich LRP1 bzw. LRP1-EGFP befindet, in lebenden Zellen aus relativ großen, beweglichen Vesikeln besteht, die durch eine rege Fusionsaktivität gekennzeichnet sind.

### 3.2.3 Aufnahme von RAP

Das Chaperon RAP bindet an LRP1 und wird experimentell als LRP1-spezifischer Ligand verwendet (Williams et al. 1992, Willnow et al. 1994b und 1995). Daher wurde auch in dieser Arbeit RAP als exemplarischer Ligand verwendet, um die Endozytose-Aktivität von LRP1 bzw. LRP1-EGFP zu überprüfen (eine ausführliche Diskussion der Spezifität erfolgt in Kapitel 4.2 ab S. 85).



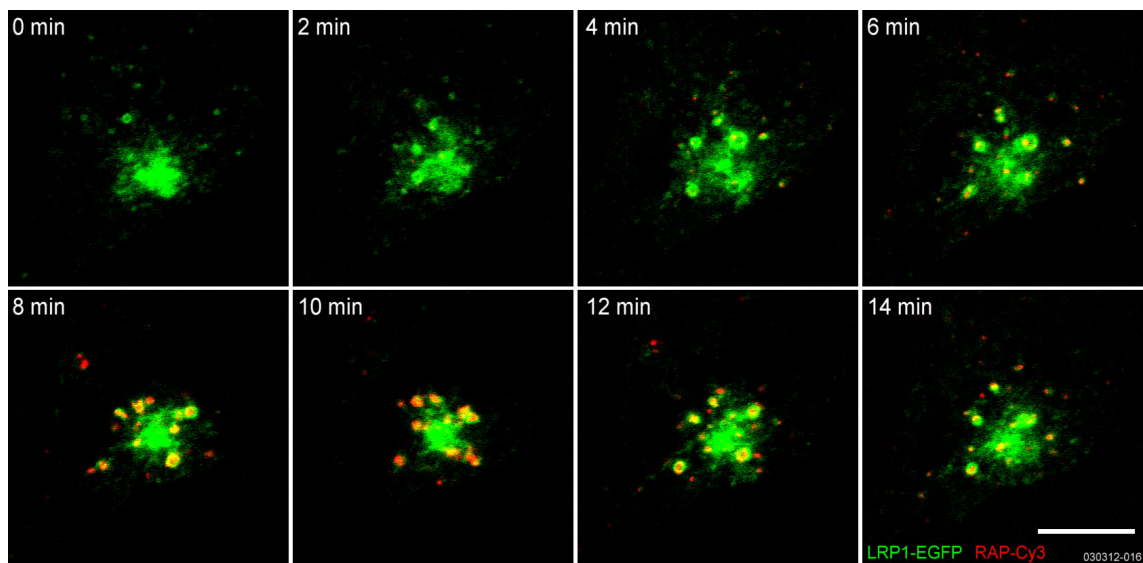


**Abbildung 25: RAP-Mehraufnahme durch Expression von LRP1-EGFP**

Die Aufnahme von  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  RAP-Cy3 (rot) ist nach 30 min in LRP1-EGFP exprimierenden Zellen (grün, geschlossene Pfeile) gegenüber nicht-exprimierenden Kontrollzellen (offene Pfeile) deutlich erhöht. Aufgenommenes RAP-Cy3 ist mit LRP1-EGFP kolokalisiert (gelb).

Fixiertes Präparat; Dicke des optischen Schnittes:  $3 \mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken:  $10 \mu\text{m}$

Abbildung 25 zeigt die Mehraufnahme von fluoreszenzmarkiertem RAP (RAP\*) in LRP1-EGFP exprimierenden Zellen nach 30 min Inkubationszeit. Das aufgenommene RAP kolokalisiert mit LRP1-EGFP. Der zeitliche Verlauf der RAP-Aufnahme ist in Abbildung 26 dargestellt.

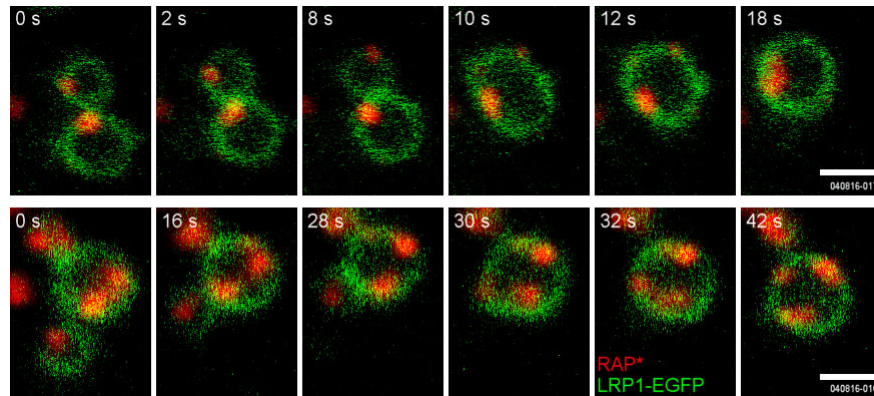


**Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der RAP-Aufnahme**

Die Aufnahme von  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  RAP-Cy3 (rot) führt in den ersten Minuten ( $< 30$  min) zur Akkumulation von RAP\* in zentralen, LRP1-EGFP-positiven Vesikeln (grün).

Live-imaging; Dicke der optischen Schnitte:  $1.5 \mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken:  $10 \mu\text{m}$

Nach der rezeptorvermittelten Endozytose an der Plasmamembran bewegt sich RAP, wie in Abbildung 26 zu erkennen, in kleinen LRP1-EGFP-Vesikeln in Richtung Zellmittelpunkt, wo die Vesikel mit großen LRP1-EGFP-Vesikeln fusionieren. Innerhalb des beobachteten Zeitraums akkumuliert RAP in diesen Vesikeln. Der Fusionsvorgang ist in hoher Auflösung in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27: Fusion von RAP-haltigen LRP1-EGFP-Vesikeln**

Die beiden Zeitserien (obere und untere Reihe) zeigen zwei Fusionen von RAP-haltigen LRP1-EGFP-Vesikeln (grün) eine Stunde nach Beginn der Inkubation mit RAP-Cy3 (rot). Nach der Fusion enthält das jeweils entstandene Vesikel die Summe der ursprünglichen RAP-Signale, die streng Membran/LRP1-assoziiert bleiben.

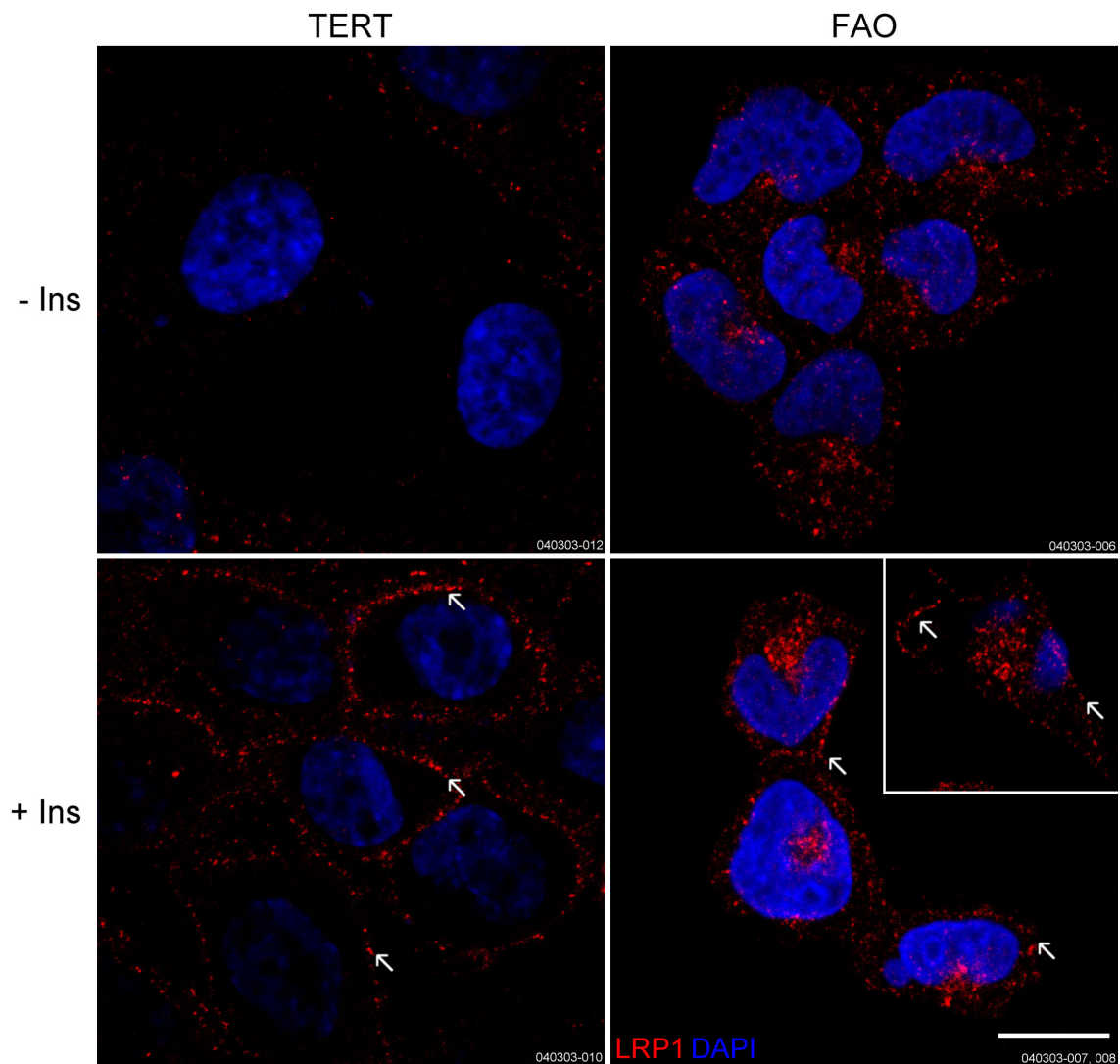
Live-imaging; Dicke der optischen Schnitte: 3  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 1  $\mu\text{m}$

Nach der Fusion enthält das entstandene, vergrößerte Vesikel (vgl. Abbildung 24) die Summe der RAP-Signale aus den Vorläufervesikeln. Die Größe der einzelnen RAP-Signale entspricht der maximal erreichbaren optischen Auflösung von ca. 0.25  $\mu\text{m}$ . Es ist daher möglich, daß es sich bei den Signalen um einzelne RAP-Moleküle handelt, zumal in keinem Experiment die Teilung eines solchen Signals beobachtet wurde. Aufgrund der partiellen Überschneidung der RAP-Signale mit dem LRP1-EGFP-Signal der Vesikelmembran ist es unter Berücksichtigung der beschriebenen Unschärfe sehr wahrscheinlich, daß die zugehörigen RAP-Moleküle noch an LRP1-EGFP gebunden sind und nicht frei im Vesikellumen vorliegen (vgl. Kapitel 3.3.2, Abbildung 41). Das Ausbleiben der RAP-Aufnahme nach Repression der LRP1-Expression mittels RNAi wurde bereits in Abbildung 15 (S. 56) gezeigt und spricht ebenfalls für diese Interpretation.

### 3.3 Postprandiale Effekte von LRP1

#### 3.3.1 Insulinabhängige Translokation von LRP1

Die in diesem Abschnitt dargestellten Experimente wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob LRP1 in Leberzellen durch die Stimulation mit Insulin in die PM transloziert werden kann, ob eine solche Translokation zu einer verstärkten Aufnahme von CR/ApoE führt und ob dieser Effekt abhängig ist von der ApoE-Isoform. Tatsächlich führte die Inkubation der Hepatozyten-Zelllinie FAO aus der Ratte (*Rattus norvegicus*) mit 100 nM Insulin ähnlich wie in hMSC-Adipozytenvorläuferzellen (TERT, Simonsen et al. 2002) zu einer Translokation von LRP1 in die Plasmamembran. Abbildung 28 zeigt eine immunzytochemische Färbung von endogenem LRP1 mit und ohne Insulinstimulation.



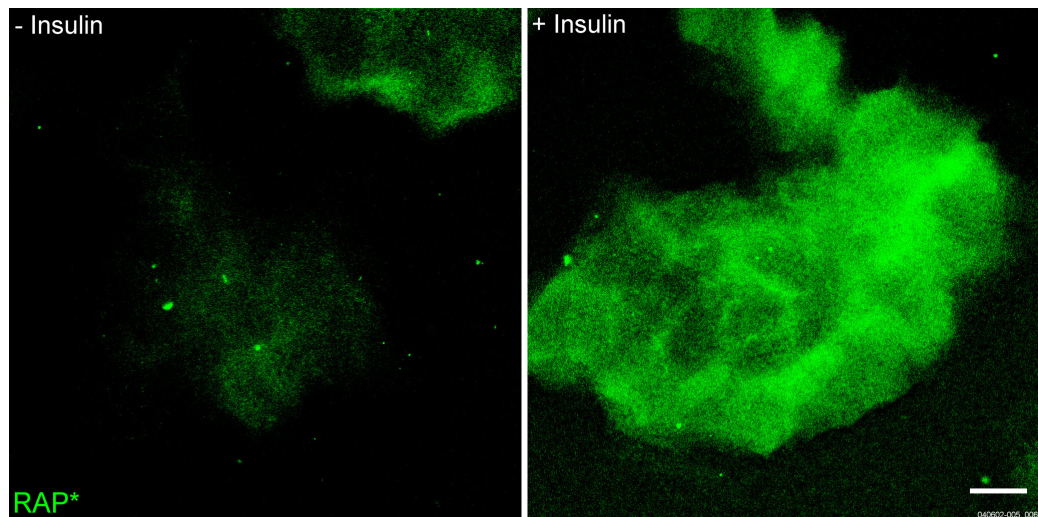
**Abbildung 28: Insulininduzierte Translokation von LRP1**

TERT- und FAO-Zellen wurden über Nacht gehungert, für 15 min mit und ohne 100 nM Insulin inkubiert und mit dem Antikörper 8G1 immunzytochemisch gegen endogenes LRP1 gefärbt (rot). Deutlich ist in den während der Färbung nicht permeabilisierten adipozytären Vorläuferzellen TERT (links) eine LRP1-Oberflächenfärbung auf Insulin-stimulierten Zellen (unten) zu erkennen, die sich konfokal als ringförmige Struktur darstellt (Pfeile). Da bei FAO-Zellen (rechts) eine Färbung von nicht-permeabilisierten Zellen nicht gelang, ist der entsprechende Effekt von Insulin (Pfeile) durch die Anfärbung des intrazellulären LRP1 weniger deutlich sichtbar. Eine Translokation von LRP1 in diesen Zellen ist trotzdem zu erkennen, sie ist jedoch nicht so prominent wie in der Kontrolllinie.

Fixiertes Präparat; Dicke der optischen Schnitte: 0,8  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 10  $\mu\text{m}$  (Einschub kleiner)

Um zu überprüfen, ob die in Abbildung 28 mikroskopisch beobachtete Translokation von LRP1 in FAO-Zellen tatsächlich zu einer gesteigerten Präsentation von LRP1 gegenüber dem extrazellulären Raum führt, wurden mit Insulin stimulierte und nicht-stimulierte Zellen in einem Bindungsassay bei 4 °C mit RAP als LRP1-spezifischem Liganden inkubiert. Abbildung 29 zeigt, daß die Stimulation mit Insulin tatsächlich zu einer drastisch erhöhten RAP-Bindung führt.





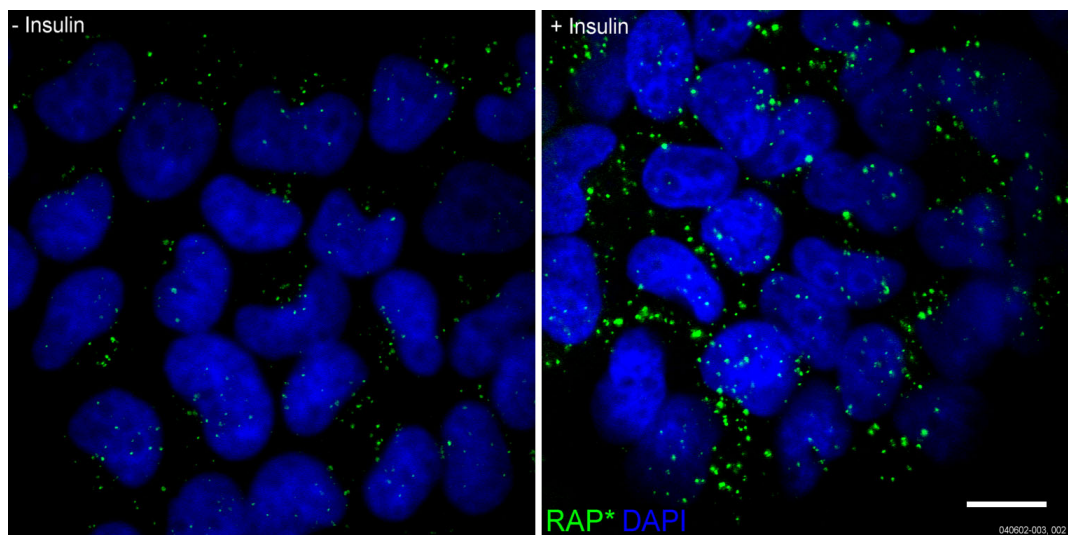
**Abbildung 29: RAP-Bindung an insulinstimulierte FAO-Zellen**

FAO-Zellen wurden über Nacht gehungert, für 15 min mit und ohne 100 nM Insulin stimuliert, für 30 min bei 4 °C mit 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  RAP-Alexa488 inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Deutlich erkennbar ist die erhöhte Bindungskapazität für RAP\* (grün) nach Stimulation mit Insulin.

Fixiertes Präparat; Projektion über die gesamte Zellschicht, Dicke der optischen Schnitte: 1.5  $\mu\text{m}$

Skalierungsbalken: 10  $\mu\text{m}$

Abbildung 30 zeigt, daß die in Abbildung 28 und Abbildung 29 gesehene Translokation von LRP1 und die erhöhte Bindung von RAP letztlich auch zu einer erhöhten Aufnahme von RAP führen.



**Abbildung 30: RAP-Aufnahme in insulinstimulierte FAO-Zellen**

FAO-Zellen wurden für über Nacht gehungert, für 15 min mit und ohne 100 nM Insulin stimuliert und für 10 min bei 37 °C mit 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  RAP-Alexa488 inkubiert. Wie im rechten Bild erkennbar, ist die Aufnahme von RAP\* (grün) nach Stimulation mit Insulin erhöht.

Fixiertes Präparat; Projektion über die gesamte Zellschicht, Dicke der optischen Schnitte: 1.5  $\mu\text{m}$

Skalierungsbalken: 10  $\mu\text{m}$

Zur Überprüfung der Aufnahme von CR/ApoE wurden CM aus einem ApoCII-defizienten Spender isoliert und *in vitro* mit LpL in CR umgewandelt. Rekombinantes



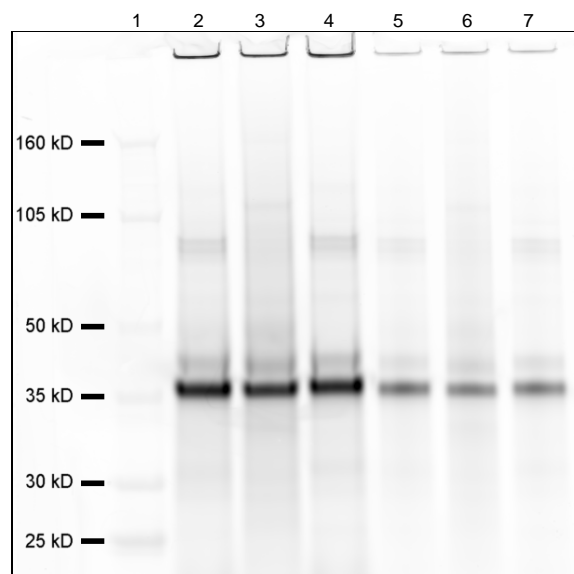
ApoE wurde fluoreszenzmarkiert (ApoE<sup>\*</sup>), mit den CR assoziiert und durch Ultrazentrifugation re-isoliert, um einerseits zu vermeiden, daß zusätzliche Apolipoproteine auf den Partikeln ebenfalls markiert wurden, und andererseits sicherzustellen, daß in der markierten CR/ApoE<sup>\*</sup>-Präparation kein freies, sondern nur partikelassoziiertes ApoE<sup>\*</sup> vorlag. Abbildung 31 zeigt das Zentrifugenröhrchen mit CR/ApoE<sup>\*</sup> nach der Re-Isolation.



**Abbildung 31: Re-isolierte CR/ApoE<sup>\*</sup>**

Der Inkubationsansatz von CR und dem Markierungsansatz mit ApoE<sup>\*</sup> wurde einer PBS-Lösung unterschichtet und zentrifugiert (Details s. Text). Nach Ultrazentrifugation flutieren die CR mit assoziiertem ApoE<sup>\*</sup>, im unteren Teil des Röhrchens bleibt nicht-assoziiertes ApoE<sup>\*</sup> und freier Farbstoff zurück.

Die Kontrolle der so erhaltenen Liganden mit einem Ligandengel und anschließender Fluoreszenzdetektion (Abbildung 32) zeigt eine gleichmäßige Beladung der CR für alle ApoE<sup>\*</sup>-Isoformen.

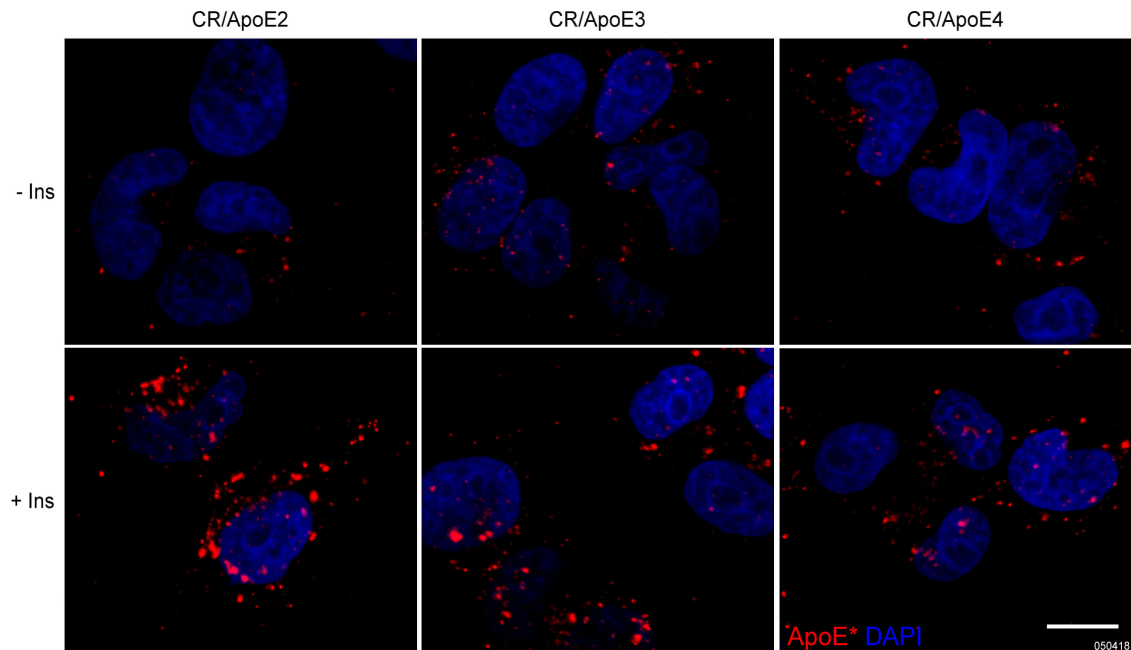


**Abbildung 32: Ligandengel der CR assoziiert mit ApoE<sup>\*</sup>-Isoformen**

Die Fluoreszenzdetektion zeigt für die beiden aufgetragenen Mengen eine gleichmäßige Beladung der CR für alle Isoformen. Es wurde ein Gradientengel (4 % bis 12 %) verwendet.

1: Marker; 2-4: 40 µL CR/ApoE2, -3, -4; 5-7: 10 µL CR/ApoE2, -3, -4

Abbildung 33 zeigt den Einfluß von Insulin auf die Aufnahme von CR/ApoE. Die Aufnahme ist nach Stimulation mit Insulin ebenfalls erhöht. Beim Vergleich der Isoformen zeigen sich Unterschiede; die stärkste Steigerung der Aufnahme ist für ApoE2 erkennbar, das gleichzeitig die geringste Aufnahme im unstimulierten Zustand zeigt.



**Abbildung 33: CR/ApoE-Aufnahme in Insulin-stimulierte FAO-Zellen**

FAO-Zellen wurden über Nacht gehungert, für 15 min mit und ohne 100 nM Insulin stimuliert und für 60 min bei 37 °C mit CR/ApoE2, -3, -4 -Cy5 entsprechend der Vorstimulation in insulinhaltigem oder -freiem Medium inkubiert. Mit Stimulation durch Insulin (unten) ist für alle ApoE-Isoformen (rot) eine Erhöhung der Aufnahme zu erkennen. Dieser Effekt ist für ApoE2 am deutlichsten ausgeprägt.

Fixiertes Präparat; Projektion über die gesamte Zellschicht, Dicke der optischen Schnitte: 2 µm  
Skalierungsbalken: 10 µm

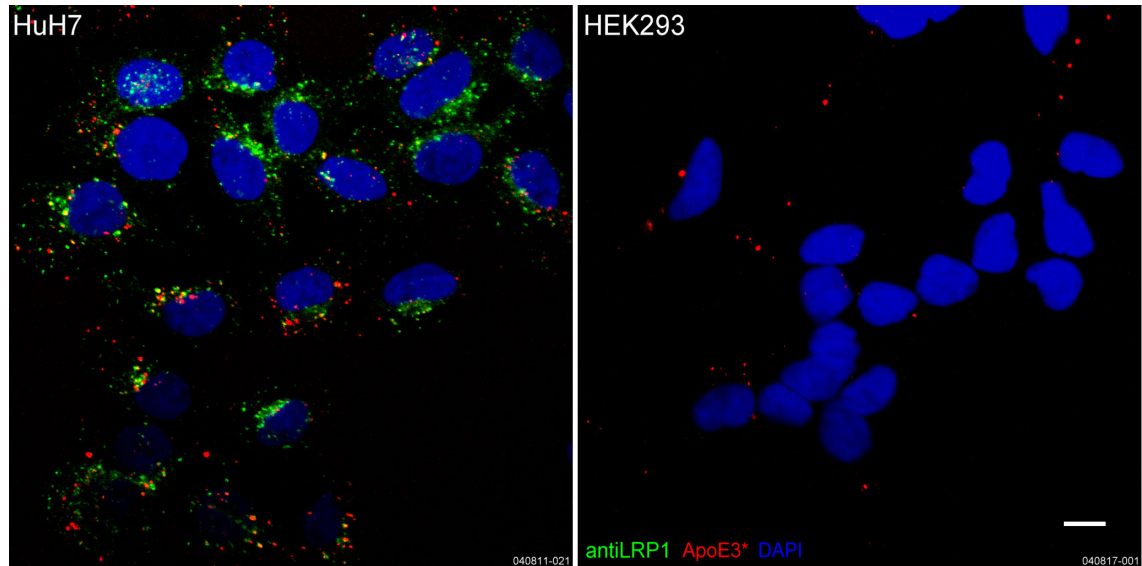
Zusammengefaßt konnte eine insulinstimulierte Translokation von LRP1 in hepatischen FAO-Zellen nachgewiesen werden, die endozytotisch aktives LRP1 in die PM bringt. Dies führt zu einer verstärkten Aufnahme von LRP1-Liganden, inklusive CR/ApoE. Im Vergleich der ApoE-Isoformen erhöht sich durch die LRP1-Translokation insbesondere die Aufnahme von CR/ApoE2.

### 3.3.2 Aufnahme von Chylomikronen-Remnants und Recycling von ApoE

Mit den in diesem Abschnitt beschriebenen Experimenten wurde die Aufnahme von CR/ApoE über LRP1 und die anschließende Wiederabgabe des ApoE an HDL untersucht. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Darstellung der intrazellulären Vorgänge.

Wie in Abbildung 34 dargestellt, führt die Inkubation mit CR/ApoE\* zu deren Aufnahme in Zellen. Die Aufnahme ist in Hepatomzellen deutlich stärker ausgeprägt als in HEK293-Zellen. Entsprechend stellt sich die Menge an endogenem LRP1 dar, das in

der Nierenzelllinie HEK293 im Vergleich zur Hepatomlinie HuH7 unter identischen Bedingungen nicht nachweisbar ist. In HuH7-Zellen kolokalisiert ein Teil der LRP1-Vesikel mit den ApoE<sup>\*</sup>-Signalen, was ein erster Hinweis auf die später detaillierter untersuchte Akkumulation von ApoE in LRP1-Vesikeln ist.

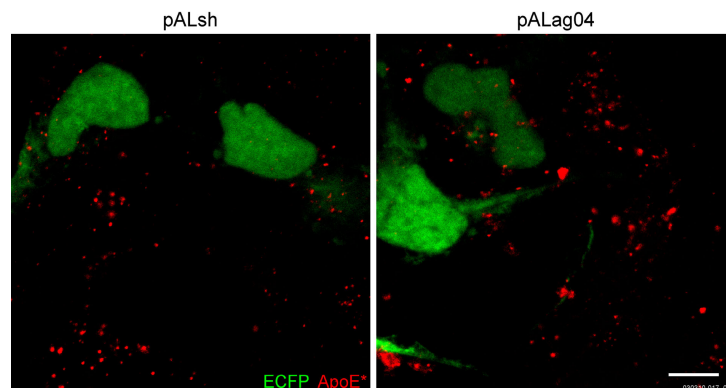


**Abbildung 34: Aufnahme von CR/ApoE3<sup>\*</sup> in HuH7- und HEK293-Zellen**

Nach einer Stunde Inkubation mit CR/ApoE3-Cy3 ist die Aufnahme in HuH7-Hepatomzellen deutlich größer als in HEK293-Zellen. Ein Teil des ApoE<sup>\*</sup> (rot) kolokalisiert in HuH7-Zellen mit LRP1 (grün). Endogenes LRP1 ist mit der für HuH7-Zellen verwendeten Sensitivität in HEK293-Zellen nicht nachweisbar. Beide Zelltypen wurden auf die gleiche Weise behandelt und mit identischen Mikroskopeinstellungen aufgenommen.

Fixiertes Präparat; Projektion zweier überlappender Schnitte, je 1.5  $\mu\text{m}$  dick; Skalierungsbalken: 10  $\mu\text{m}$

Um die Aufnahme von CR/ApoE in Abhängigkeit von LRP1 zu untersuchen, wurde das in Kapitel 3.1.2 (S. 55) beschriebene shRNA-Plasmid pALag04 verwendet, um die LRP1-Expression durch RNAi zu inhibieren. Die Repression von LRP1 führte jedoch nicht zu einer erkennbaren Reduktion der Aufnahme von CR/ApoE (Abbildung 35).

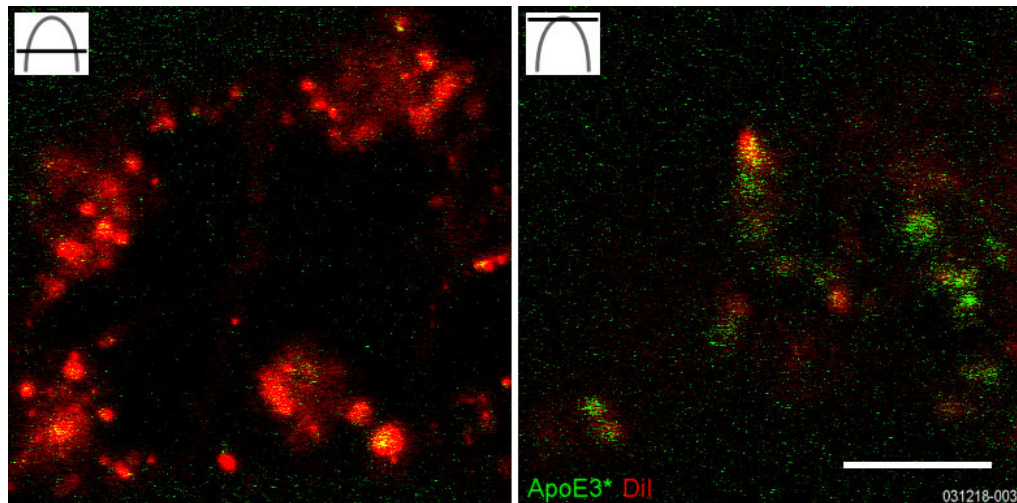


**Abbildung 35: Aufnahme von CR/ApoE3<sup>\*</sup> nach Inhibition der LRP1-Expression in HEK293-Zellen**

Nach der Inhibition der LRP1-Expression (grün durch Ko-Transfektion mit pECFP-N1, vgl. Abbildung 15, S. 56) mit pALag04 (rechts) ist keine Abnahme der Aufnahme von CR/ApoE<sup>\*</sup> (rot) im Vergleich zur Kontrolle (links) erkennbar.

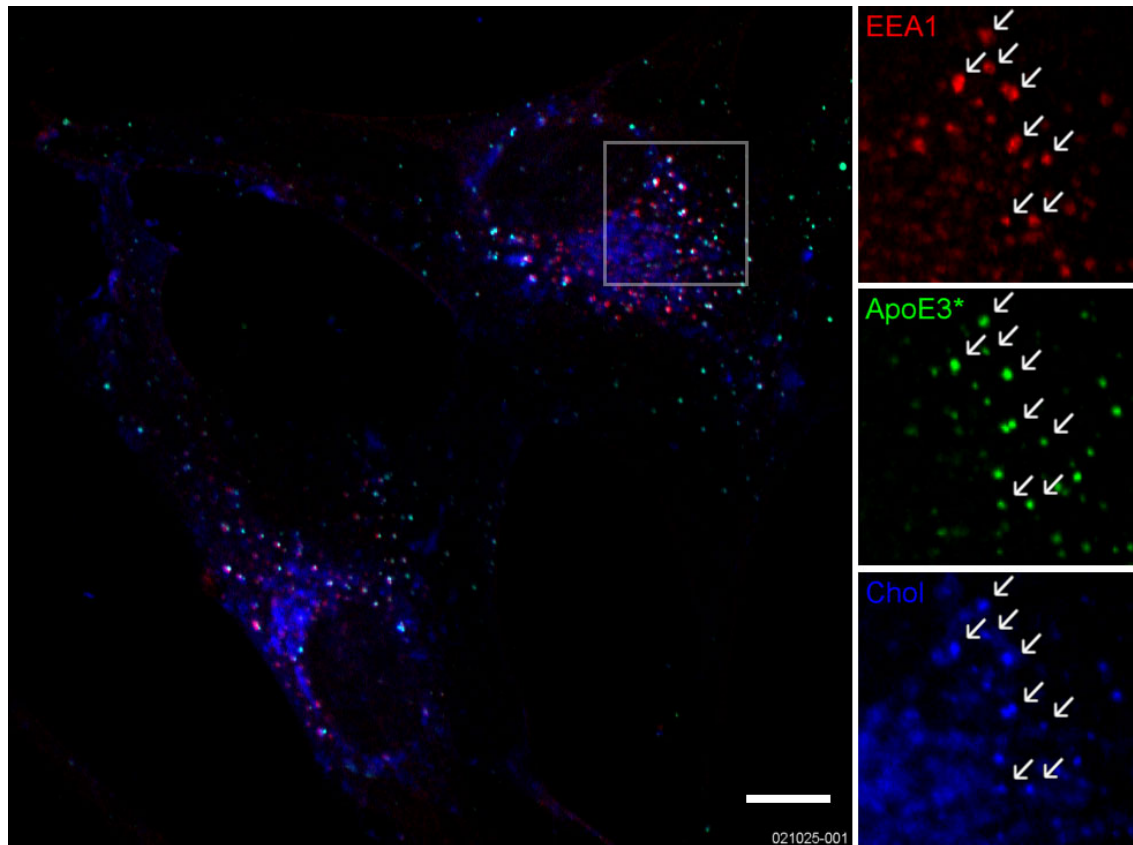
Fixierte Präparate; Dicke der optischen Schnitte: 3  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 10  $\mu\text{m}$

Mit dem nachfolgend beschriebenen Experiment wurde die intrazelluläre Desintegration der aufgenommenen CR/ApoE-Partikel visualisiert. Abbildung 36 zeigt eine HEK293-Zelle, die für eine Stunde mit CR/ApoE\* inkubiert wurde, deren Lipidanteil zuvor mit dem fluoreszierenden Phospholipid-Analogen DiI markiert wurde. Dargestellt sind zwei konfokale Schnitte, einmal auf Höhe des Zellzentrums mit als Schatten erkennbaren Zellkernen und einmal im Bereich der Plasmamembran. Es ist deutlich zu erkennen, daß sich ApoE- und Lipidanteil größtenteils voneinander getrennt haben. Der Lipidanteil verbleibt in einem tiefer gelegenen Bereich der Zelle, während der größte Teil des ApoE in vesikulärer Form im Bereich der Plasmamembran wiederzufinden ist, was ein Indiz dafür ist, daß ApoE im Gegensatz zum Lipidanteil von der Zelle weder länger gespeichert noch degradiert wird, sondern bereits kurz nach der Internalisierung gezielt vom Partikelkern getrennt wird und für eine Retroendozytose zur Verfügung steht.



**Abbildung 36: Trennung von Lipid- und ApoE-Anteil aus CR/ApoE3\* nach Aufnahme in HEK293-Zellen**  
 Nach einer Stunde Inkubation mit CR/ApoE3-Cy5/DiI trennt sich ein großer Teil des ApoE3 (grün) vom Lipidkern (rot) des Partikels und wird im Bereich der Plasmamembran der HEK293-Zelle detektiert. Die Symbole oben links geben die ungefähre Position des gezeigten konfokalen Schnittes relativ zum Zellkörper an. Beide Aufnahmen entstanden nahezu gleichzeitig in einem Zeitraum von wenigen Sekunden.  
 Live-imaging; Dicke der optischen Schnitte: 1.5  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 10  $\mu\text{m}$

Zur genaueren Charakterisierung der Aufnahme wurden immunzytochemische Analysen kombiniert mit der Detektion von Cholesterin durchgeführt. Die Lokalisation von Cholesterin diente zusammen mit den weiter unten beschriebenen Experimenten der Klärung der Frage, ob das Recycling von ApoE mit dem reversen Cholesterintransport in Verbindung steht. Eine Gegenfärbung der frühen Endosomen mit einem Antikörper gegen EEA1 zeigte, daß sich ApoE nach der Aufnahme in diesem Kompartiment befindet (s. Abbildung 37). Eine gleichzeitige Färbung des zellulären Gesamtcholesterins mit Filipin ergab eine ausgeprägte zusätzliche Kolo-kalisation mit dem Anteil des zellulären Cholesterins, das in vesikulären Strukturen vorliegt.



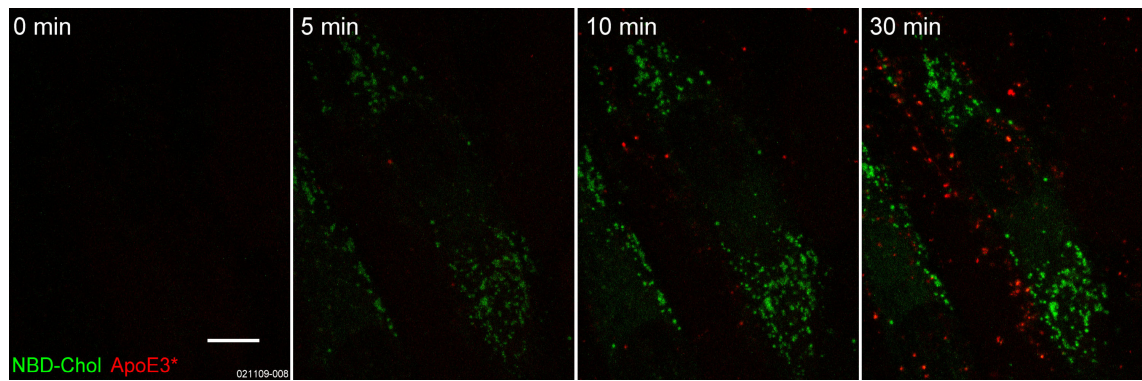
**Abbildung 37: Kolokalisation von ApoE, EEA1 und Cholesterin nach der Aufnahme von CR/ApoE**

Eine Stunde nach der Inkubation von Fibroblasten mit CR/ApoE3-Cy2 befindet sich ApoE\* (grün) in frühen Endosomen (EEA1, rot). Diese kolokalisieren (Pfeile) mit vesikulären Filipin-Signalen (blau), die die gleichzeitige Anwesenheit von Cholesterin anzeigen.

Fixiertes Präparat; Dicke des optischen Schnittes: 0,7  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 10  $\mu\text{m}$

Da unklar war, ob es sich bei diesem Cholesterin um exogenes Cholesterin handelte, das aus den aufgenommenen Partikeln stammt und mit ApoE assoziiert bleibt, oder ob eine Durchmischung mit dem intrazellulären Cholesterin-Pool stattfand, wurden CR/ApoE3\* mit fluoreszierendem NBD-Cholesterin assoziiert und mit Zellen inkubiert. Es zeigte sich eine deutliche Trennung von ApoE\* und NBD-Cholesterin in der Form, daß der größte Teil des NBD-Cholesterins extrem schnell tief im Zellinneren erschien, während ApoE\* langsamer akkumulierte und in vesikulären Strukturen zunächst peripher verblieb (s. Abbildung 38).



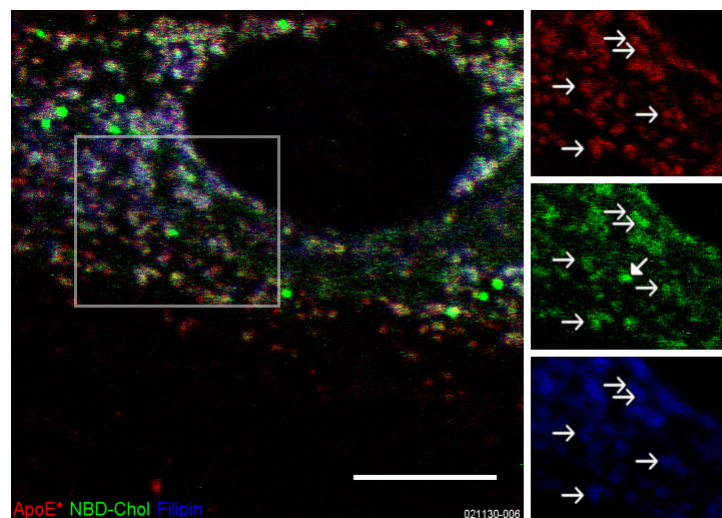


**Abbildung 38: Aufnahme von NBD-Cholesterol aus CR/ApoE3\***

Während der Inkubation mit CR/ApoE3-Cy3/NBD-Cholesterol kommt es zu einer schnellen Aufnahme und Verteilung von NBD-Cholesterol (grün) in Fibroblasten (Zellkörper verlaufen von oben links nach unten rechts). Die Aufnahme von ApoE<sup>3\*</sup> (rot) erfolgt im Vergleich zu NBD-Cholesterol verzögert und erfolgt primär in periplasmatische Bereiche.

Live-imaging; Projektion dreier Schnitte, je 1.5 µm dick; Skalierungsbalken: 10 µm

Um die Aussagekraft der NBD-Signale zu kontrollieren, wurde das in Abbildung 38 gezeigte Experiment wiederholt und die Zelle zusätzlich mit Filipin inkubiert. Wie in Abbildung 39 zu sehen ist, sind die Signale von NBD-Cholesterol mit der Filipin-Färbung identisch, mit Ausnahme einzelner, kompakter, vesikulärer NBD-Signale, die keine Filipin-Färbung zeigen. Da letztere im Gegensatz zu den übrigen Cholesterol-Signalen auch keine Kolokalisation mit ApoE zeigen, wurden sie vor dem Hintergrund des in Abbildung 37 gezeigten Experiments bei der Interpretation nicht berücksichtigt<sup>25</sup>.



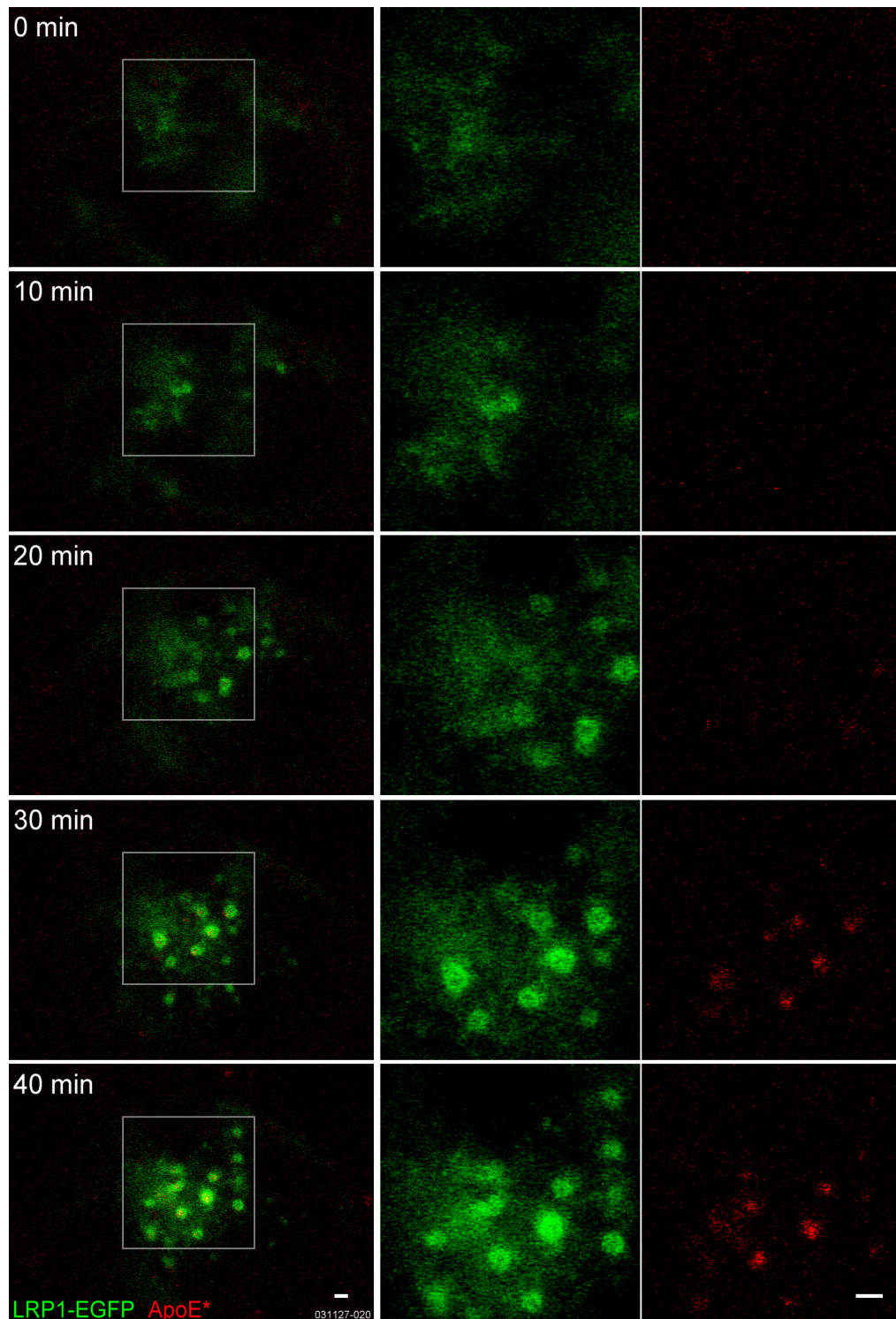
**Abbildung 39: Kolokalisation von NBD-Cholesterol und Filipin-Färbung**

Eine Stunde nach Inkubation von Fibroblasten mit CR/ApoE3-Cy3/NBD-Cholesterol und Filipin überlappen sich NBD- (grün) und Filipin-Signale (blau) nahezu vollständig. Offene Pfeile zeigen exemplarisch einige kolokalisierte Signale. Lediglich vereinzelte NBD-Signale sind nicht durch Filipin angefärbt (geschlossener Pfeil). Erneut zeigt sich eine hohe Kolokalisation mit ApoE<sup>3\*</sup> (rot, vgl. Abbildung 37).

Live-Imaging; Dicke des optischen Schnittes: 1.0 µm; Skalierungsbalken: 10 µm

<sup>25</sup> Vermutlich handelt es sich um Lipidtröpfchen, da NBD-Cholesterol aufgrund der räumlich ausgedehnten fluoreszierenden Seitengruppe teilweise wie ein CE transportiert wird und ein merklicher Anteil in dieses Speicherkompartiment transportiert wird (Frolov et al. 2000).

Das Verhalten von LRP1-EGFP während der Aufnahme von CR/ApoE ist in Abbildung 40 dargestellt. Die Aufnahme führt hier zur Bildung der großen LRP1-EGFP-Vesikel und darin zu einer Akkumulation von ApoE\*. Die Akkumulation wird, in zeitlicher Übereinstimmung mit Abbildung 37ff, nach ca. 30 min sichtbar.



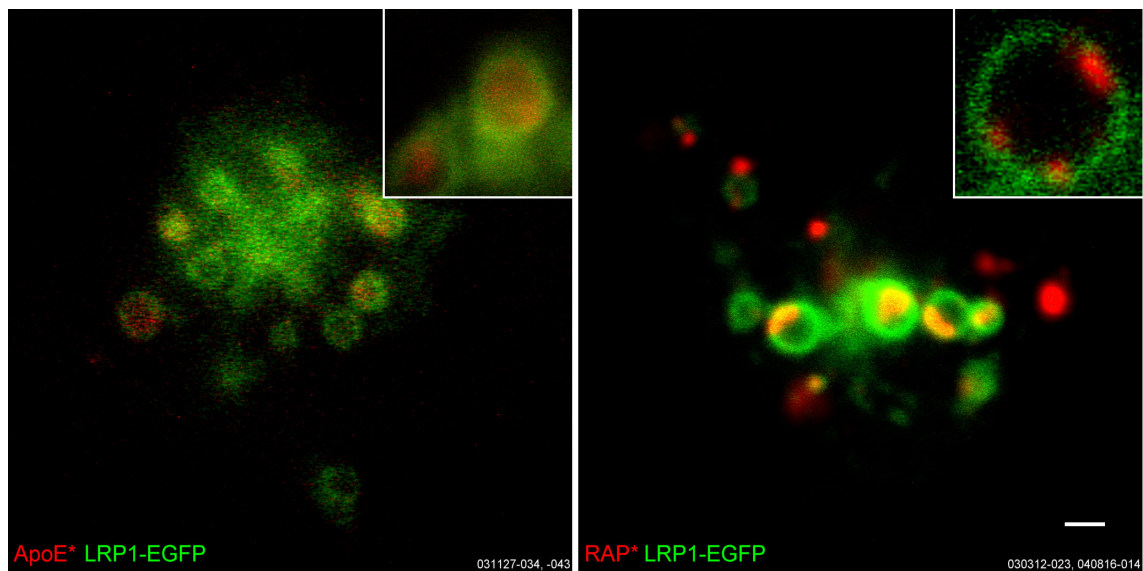
**Abbildung 40: Aufnahme von CR/ApoE in LRP1-EGFP-Vesikel**

Die Aufnahme von CR/ApoE3-Cy3 in gehungerte HEK293-Zellen führt zur Bildung von großen LRP1-EGFP-Vesikeln (grün), in denen nach ca. 20 min erste Signale von akkumulierendem ApoE\* (rot) sichtbar werden.

Live-Imaging; Dicke der optischen Schnitte: 2.5 µm; Skalierungsbalken: 1 µm



In der Vergrößerung der ApoE-haltigen Vesikel (s. Abbildung 41) fällt im Vergleich zu RAP-haltigen Vesikeln auf, daß sich ApoE größtenteils gleichmäßig im Lumen verteilt, RAP hingegen, wie bereits in Abbildung 27 (S. 66) sehr deutlich gesehen, an der luminalen Seite der Vesikelmembran verbleibt. Darüber hinaus sind ab ca. 1 h nach RAP-Aufnahme auch kompakte, vesikuläre RAP-Signale auffällig, die kein oder nur äußerst wenig LRP1-EGFP enthalten. Im Gegensatz dazu verbleiben ApoE-Signale nach der Aufnahme immer in LRP1-positiven Vesikeln. Dies könnte die mögliche Aussage von Abbildung 36 (s. S. 72) unterstützen und erweitern, indem RAP als nicht recycelter Ligand fest an LRP1 gebunden bleibt, um zur Degradation in zellulären Vesikeln transportiert zu werden, ApoE jedoch frei im Lumen von Recycling-Vesikeln vorliegt, um dort mit einem Akzeptor assoziieren zu können.



**Abbildung 41: Intravesikuläre Verteilung von ApoE und RAP**

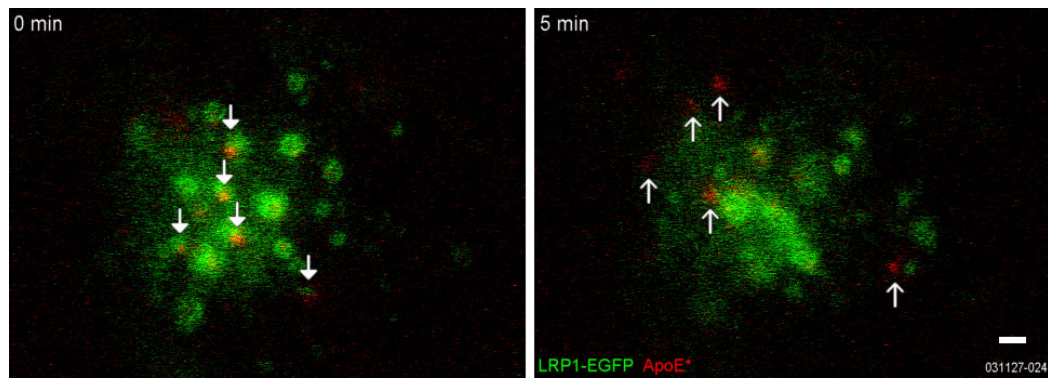
Eine Stunde nach Aufnahme von CR/ApoE3-Cy3 bzw. RAP-Cy3 ist ApoE\* (rot, links) größtenteils gleichmäßig im Lumen der LRP1-EGFP-Vesikel (grün) verteilt, während RAP (rot, rechts) an der Innenseite der Vesikelmembran verbleibt (vgl. Abbildung 27, S. 66, und zugehörigen Text). Im Falle von RAP\* treten zusätzlich zu den LRP1-EGFP-Vesikeln kompakte RAP\*-Signale auf, die kein LRP1-EGFP enthalten.

Live-Imaging; Dicke der optischen Schnitte: 2.5/1.5  $\mu\text{m}$  (ApoE) und 1.0/3.0  $\mu\text{m}$  (RAP)

Skalierungsbalken: 1  $\mu\text{m}$ , Kästen in zweifach größerem Maßstab (aus zusätzlichen Aufnahmen)

Wird nach der Aufnahme von CR/ApoE durch Austausch des Mediums und Zugabe von HDL als Akzeptor das Recycling stimuliert, so trennt sich, wie in Abbildung 42 zu sehen, das ApoE-Signal vom LRP1-EGFP-Vesikel.

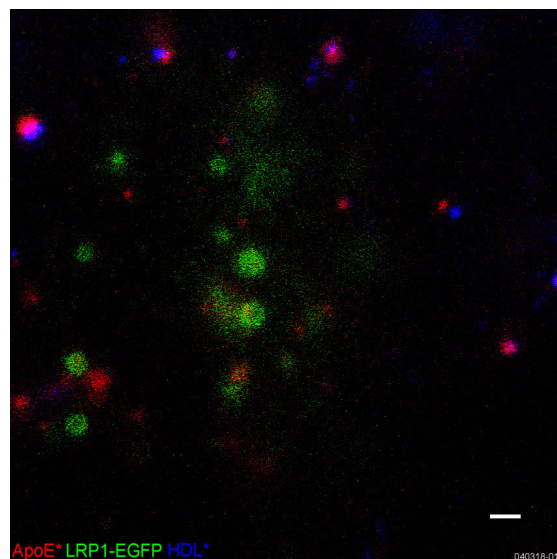




**Abbildung 42: Recycling von ApoE aus LRP1-EGFP-Vesikeln**

Die Fortsetzung des Experiments aus Abbildung 40 zeigt die Trennung von ApoE\* (rot) und LRP1-EGFP-Vesikeln (grün; geschlossene Pfeile vs. offene) nach Zugabe von HDL im Anschluß an 1 h Aufnahme von CR/ApoE3-Cy3. Live-Imaging; Dicke des optischen Schnittes: 2.5  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 1  $\mu\text{m}$

Die Charakterisierung der am Recycling beteiligten Kompartimente mußte aufgrund der Limitierung in Bezug auf die Detektion gleichzeitig verwendeter Farbstoffe durch wiederholte Experimente mit unterschiedlichen, aber teils überlappenden Markierungskombinationen durchgeführt werden. Ein entsprechendes Experiment ist in Abbildung 43 gezeigt. Es beinhaltet zusätzlich zum Experiment in Abbildung 42 fluoreszenzmarkierte HDL (HDL\*). Deutlich ist eine Kolokalisation des periplasmatischen, LRP1-EGFP-freien ApoE (vgl. Abbildung 42) mit HDL zu erkennen.

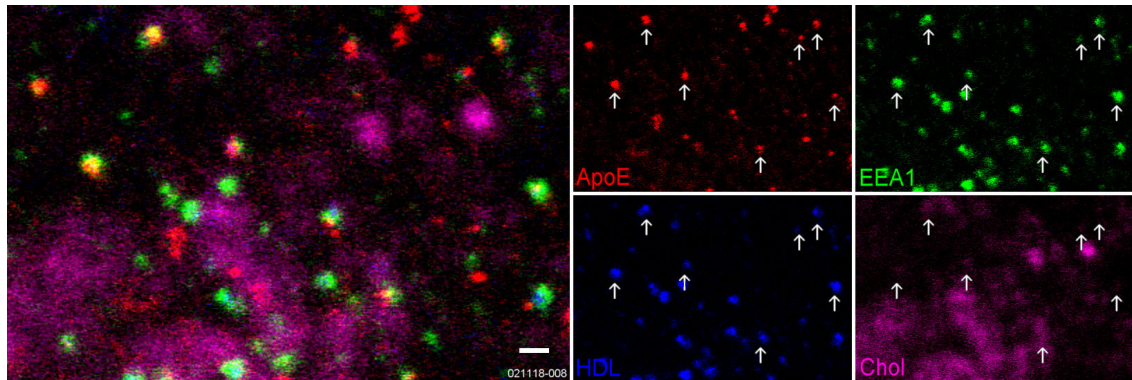


**Abbildung 43: HDL-induziertes Recycling von ApoE aus LRP1-EGFP-Vesikeln**

Nach 1 h Aufnahme von CR/ApoE3-Cy3 wurden die Zellen für 10 min mit HDL-Cy5 inkubiert. ApoE\* (rot) kolokalisiert<sup>26</sup> primär mit HDL\* (blau), aber nicht mehr mit LRP1-EGFP (grün; vgl. Abbildung 42). Live-Imaging; Dicke des optischen Schnittes: 2.5  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 1  $\mu\text{m}$

<sup>26</sup> Da pro Scanvorgang nur zwei PMTs zur Detektion je eines Fluoreszenzkanals zur Verfügung stehen, die sensibel genug sind, um in Lebendzell-Experimenten wie dem dargestellten zum Einsatz kommen zu können, war es nicht möglich, alle drei Fluoreszenzen in einem Scan aufzunehmen. Der Cy5-Kanal mußte daher in einem zusätzlichen Scan aufgenommen werden, wodurch sich eine kurze Zeitverzögerung gegenüber dem Cy3- und EGFP-Signal ergibt. Durch die Bewegung der Vesikel erscheinen daher die roten und blauen Signale fälschlicherweise leicht versetzt.

Im nächsten Schritt wurden Zellen während des mit HDL\* induzierten Recyclings nach Aufnahme von CR/ApoE3 fixiert und immunzytochemisch mit einem Antikörper gegen EEA1 gefärbt. Zusätzlich wurde das zelluläre Gesamtcholesterol mit Filipin angefärbt. Abbildung 44 zeigt, daß die ApoE/HDL-haltigen Vesikel aus Abbildung 43 zusätzlich Cholesterol enthalten und es sich aufgrund der positiven EEA1-Färbung um frühe Endosomen handelt.

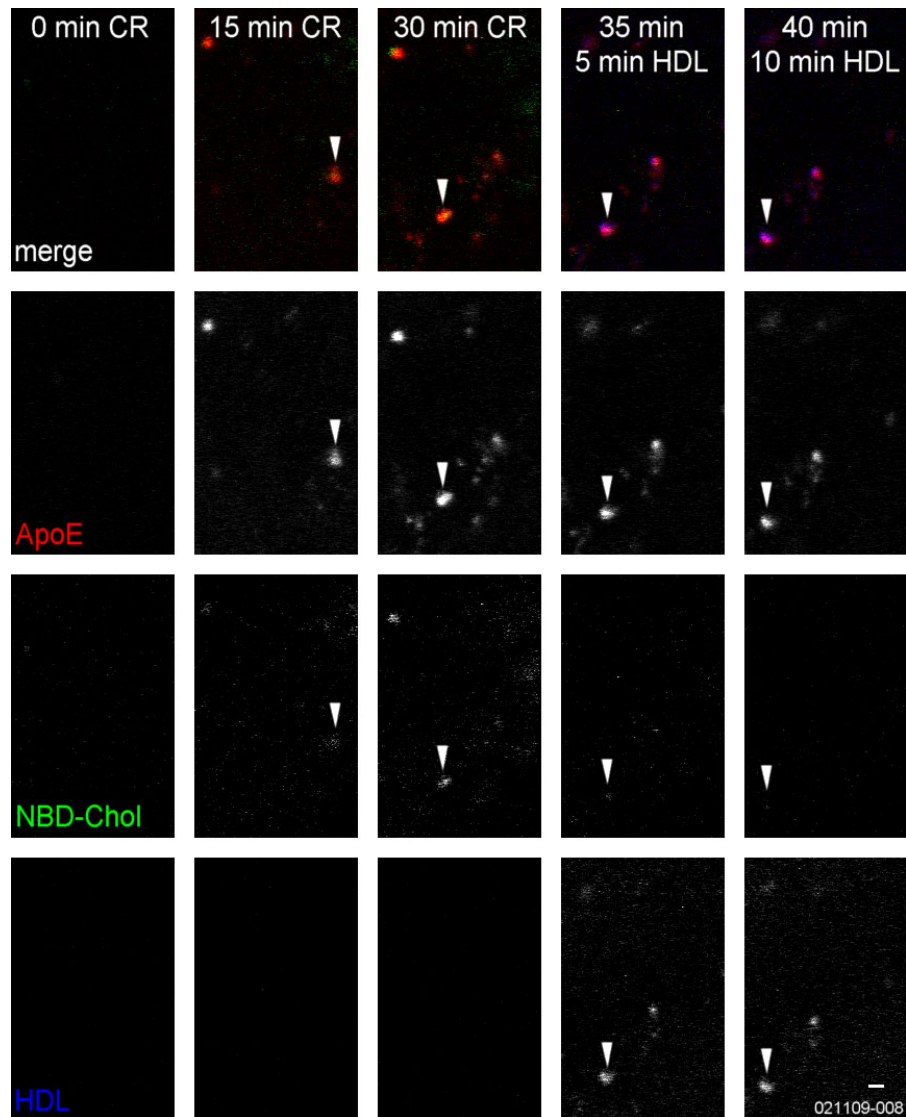


**Abbildung 44: HDL-induziertes Recycling von ApoE und Cholesterol aus EEA1-positiven Vesikeln**

Nach 1 h Aufnahme von CR/ApoE3-Cy3 wurden Fibroblasten für 15 min mit HDL-Cy5 inkubiert und anschließend gefärbt. ApoE\* (rot) kolokalisiert mit EEA1 (grün), HDL\* (blau) und Cholesterol (violett). Aufgrund der großen Mengen Filipin-anfärbbaren Gesamtcholesterols ist der mengenmäßig geringe Teil des vesikulär vorliegenden Cholesterols in dieser Filipin-Färbung nur schwach zu erkennen; vgl. daher auch Abbildung 45.

Fixiertes Präparat; Dicke des optischen Schnittes: 1  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 1  $\mu\text{m}$

Zur deutlicheren Darstellung des Cholesterols wurde ein Recycling-Experiment durchgeführt, bei dem zunächst mit CR/ApoE\*/NBD-Chol inkubiert wurde und anschließend das Recycling mit HDL\* induziert wurde (s. Abbildung 45). Es bestätigte sich deutlich, daß die bereits beschriebenen ApoE/HDL-haltigen Vesikel ebenfalls Cholesterol enthalten. Weiterhin ist zu erkennen, daß das Cholesterol aus diesen Vesikeln analog zur schnelleren Aufnahme (vgl. Abbildung 38, S. 74) auch rascher wieder abgegeben wird als ApoE.



**Abbildung 45: HDL-induziertes Recycling von ApoE und Cholesterol**

Fibroblasten wurden mit CR/ApoE3-Cy3/NBD-Cholesterol inkubiert und das Inkubationsmedium nach 30 min gegen HDL-Cy5 gewechselt. Gezeigt sind Vesikel in einem Ausschnitt aus einer Zelle in der Nähe der Plasmamembran (der Pfeil verfolgt die Bewegung eines Vesikels). Zunächst füllt sich das Vesikel mit ApoE<sup>+</sup> (rot) und NBD-Cholesterol (grün). Nach Zugabe von HDL<sup>+</sup> erfolgt schnell eine Kolokalisation mit HDL, die mit einer raschen Abgabe von NBD-Cholesterol einhergeht.

Live-Imaging; Dicke des optischen Schnittes: 1  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken: 1  $\mu\text{m}$

Es konnte in den in diesem Kapitel beschriebenen Experimenten die Aufnahme von CR/ApoE gezeigt werden. Der ApoE-Anteil findet sich in LRP1-haltigen frühen Endosomen in der Peripherie wieder, die zusätzlich Cholesterol enthalten, der Lipidkern der CR ist zu diesem Zeitpunkt bereits abgetrennt und befindet sich in einem zentral gelegenen Kompartiment. Im Gegensatz zu RAP ist die Bindung von ApoE an LRP1 in frühen Endosomen offenbar wesentlich schwächer, da ApoE im gesamten Vesikellumen detektierbar ist, RAP jedoch nur membranassoziiert. Die extrazelluläre Zugabe von HDL führt zu einem raschen Transfer von ApoE und Cholesterol aus der Zelle zur HDL. Teile dieser Ergebnisse wurden im Rahmen einer Veröffentlichung zum zellulären ApoE- und Cholesterol-Recycling publiziert (Heeren et al. 2003).

## 4 Diskussion

### 4.1 Überexpression und RNAi-vermittelte Repression von LRP1

Um eine Grundlage zur Untersuchung von LRP1 zu schaffen, wurde im Rahmen der methodischen Vorarbeiten ein heterologes Expressionssystem zur Überexpression von LRP1-EGFP sowie ein RNAi-basiertes System zur Repression der LRP1-Expression entwickelt. Ziel dieser Arbeiten war es, zellbiologische Funktionen von LRP1 in Zellkultur isoliert untersuchen zu können. In diesem Kapitel werden sowohl die Funktionalität beider Systeme diskutiert als auch die Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten insbesondere des RNAi-Systems dargestellt.

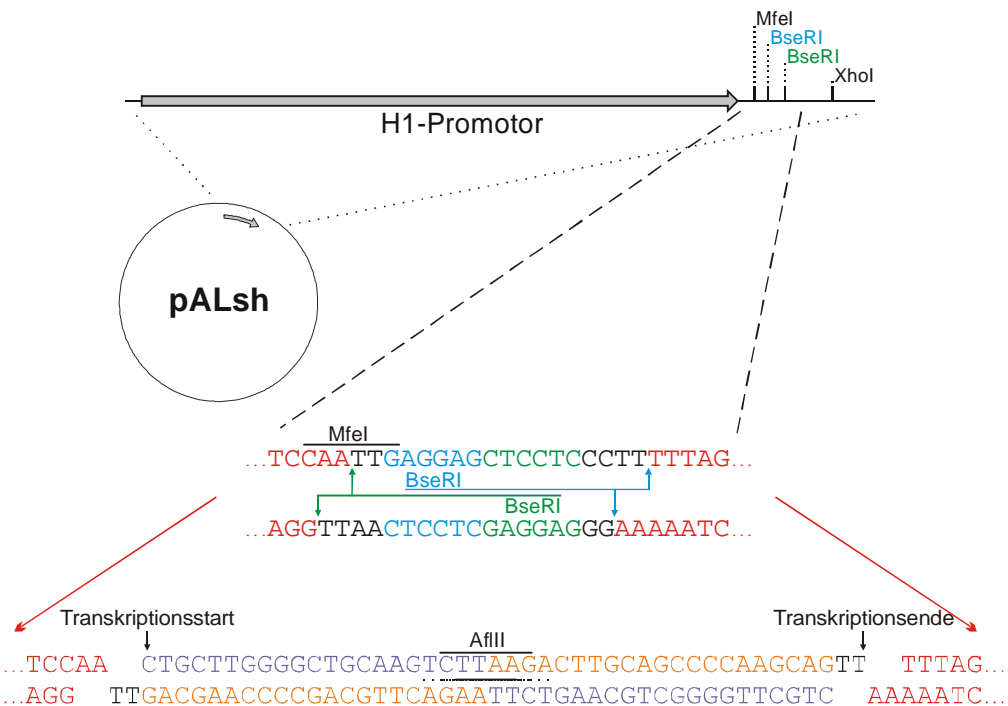
Die zu Beginn der Arbeit vorliegende, fehlerhafte LRP1-cDNA-Sequenz wurde erfolgreich korrigiert (Abbildung 6, S. 47). Das erstellte Expressionsplasmid pFB-LRP-EGFP (Abbildung 10, S. 52) kodiert für ein C-terminales Fusionsprotein von LRP1 mit EGFP, exprimiert eine spezifische mRNA (Abbildung 11, S. 53) und ein korrekt prozessiertes Protein. Zusätzlich wurde eine proteolytisch nicht prozessierte Form detektiert (Abbildung 12, S. 54). Die Beobachtung von nicht proteolytisch prozessiertem LRP1-EGFP zusätzlich zu den prozessierten Fragmenten entspricht der Situation beim endogenen LRP1 (Willnow et al. 1996a), daher kann die eingeschränkte Prozessierung von LRP1-EGFP als physiologisch angesehen werden. Mit Blick auf die Funktionalität der beiden Formen wurde in Vögeln nachgewiesen, daß auch unprozessiertes LRP1 endozytotisch aktiv ist (Ko et al. 1998), während die Analyse von Willnow et al. (1996a) für Säuger keine aussagekräftigen Ergebnisse lieferte.

Die zelluläre Expression von LRP1-EGFP führt zu einer korrekten Lokalisation (Abbildung 13, S. 54) und funktionell zu einer Mehraufnahme des Liganden RAP (Abbildung 25, S. 65). Damit steht erstmalig ein Expressionssystem für vollständiges, humanes LRP1 als fluoreszierendes Fusionsprotein zur Verfügung (Laatsch et al. 2004). Die tatsächliche Höhe der Expression von LRP1-EGFP ist schwer zu quantifizieren. Im mikroskopischen Bild entsteht im Vergleich zu immunzytochemisch gefärbten Zellen jedoch der Eindruck, daß HEK293-Zellen nach Transfektion mit pFB-LRP-EGFP eine leberähnliche LRP1-EGFP-Expression aufweisen, da diese in etwa mit der LRP1-Expression in Hepatomzellen vergleichbar ist.

Für die RNAi-vermittelte Repression der LRP1-Expression wurde ausgehend von dem auf dem H1-Promotor basierenden shRNA-Expressionsplasmid pSUPER von Brummelkamp et al. (2002) das Expressionsplasmid pALsh entwickelt (Abbildung 14, S. 55). Es zeichnet sich, wie weiter unten dargestellt, durch eine einfachere und schnellere Klonierungsstrategie für die Insertion von Zielsequenzen aus und ermöglicht die Verwendung von putativ effizienteren Zielsequenzen.

Abbildung 46 verdeutlicht die Klonierungsstrategie für die Insertion einer Zielsequenz: Benötigt wird nur ein – vergleichsweise kurzes – Oligodeoxynukleotid. Es enthält einen 3'-TT-Überhang und ist palindromisch (Details s. u.), daher kann es mit einem zweiten Molekül gleicher Sequenz ein dsDNA-Fragment bilden. Die jeweils 3'-terminal liegenden TT-Überhänge verhindern eine Oligomerisierung der Fragmente. Die Öffnung von pALsh erfolgt mit BseRI, einer Restriktionsendonuklease, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneidet. pALsh enthält zwei Erkennungssequenzen für BseRI, die gegenläufig in der Form orientiert sind, daß sie zusammen zum Herausschneiden des Fragments führen, auf dem sie kodiert sind. Dieses Fragment ist kurz genug, um auf einer üblichen Silica-Säule nicht zu binden, so daß der geöffnete Vektor ohne vorherige Gelelektrophorese direkt aus dem BseRI-Reaktionsansatz aufgereinigt werden kann. Die Sequenz von pALsh ist so gewählt, daß der mit BseRI linearisierte Vektor zwei 3'-AA-Überhänge für die Ligation des dsDNA-Fragments besitzt. Dadurch ist er nicht in der Lage, eine Selbstligation durchzuführen, was die Gefahr von falsch-positiven Ligationsklonen erheblich senkt. Nach der Ligation des dsDNA-Fragments kann mit BseRI nachinkubiert werden, um mögliche fehlerhafte Klone aus selbstligierten Vektormolekülen erneut zu linearisieren. Diese nicht erwünschten Produkte können aus Vektormolekülen entstehen, die eingangs von BseRI nicht vollständig geschnitten wurden. Dadurch enthalten sie noch Erkennungssequenzen für BseRI, die während der zweiten Inkubation mit BseRI geschnitten werden. Die entstandene, lineare DNA kann nach der anschließenden Transformation in *E. coli* nicht repliziert werden. Die erhaltenen Klone lassen sich mit AvaI analysieren, das die Insertionsstelle dicht flankiert. Alternativ kann ggf. ein Enzym verwendet werden, das das neu entstandene palindromische Zentrum des dsDNA-Fragments erkennt (AflIII in Abbildung 46). Die Ligation des dsDNA-Fragments komplettiert das in der Sequenz von pALsh angelegte Terminationssignal von fünf Thymidinresten für die RNA-Polymerase III (Übersicht von Geiduschek und Tocchini-Valentini 1988), die am H1-Promotor rekrutiert wird (Myslinski et al. 2001) und die Transkription an der ersten Base der Sequenz des dsDNA-Fragments initiiert.



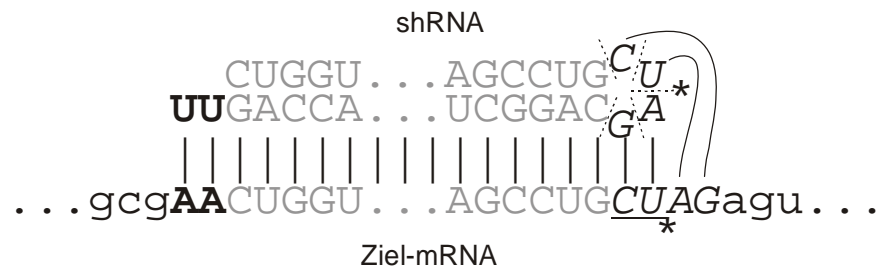


**Abbildung 46: Klonierung von Zielsequenzen in pALsh**

Das Plasmid wird mit BseRI geöffnet, dessen Erkennungssequenzen zweimal in entgegengesetzter Orientierung in pALsh vorkommen (blau und grün). Da BseRI außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, geht das Fragment mit den Erkennungssequenzen verloren und durch eine entsprechende Wahl der flankierenden Sequenzen verbleiben am geöffneten Vektor (rot) zwei 3'-AA-Überhänge. Diese Enden verhindern eine Selbstligation des Vektors und ermöglichen die Ligation mit einem palindromischen Oligodeoxynukleotid (Halbpalindrome in violett und orange) mit einem 3'-TT-Überhang. Weitere Details s. Text.

Die Auswahl der Sequenz des Oligodeoxynukleotids für die Ligation in pALsh erfolgt, indem die gewünschte, in der Ziel-mRNA auf ein AA folgende Zielsequenz von 19 bis 22 bp Länge entweder als 5'-Ende des Oligodeoxynukleotids verwendet wird und das 3'-Ende palindromisch dazu ergänzt wird, oder alternativ eine 21 bis 24 bp lange Zielsequenz frei gewählt und als 3'-Ende verwendet wird, wobei dann das 5'-Ende palindromisch ergänzt wird. In beiden Fällen wird die Sequenz abschließend um ein 3'-TT verlängert. Im Gegensatz zu Brummelkamp et al. (2002) wurde auf eine heterologe Loopsequenz für die Haarnadelstruktur der shRNA aus drei Gründen verzichtet: Erstens steht sie einer einfachen Klonierung mit nur einem Oligodeoxynukleotid entgegen, und zweitens ist nicht nachgewiesen, daß sie sich tatsächlich positiv auf die Prozessierung funktionaler siRNA auswirkt. Im Gegenteil, da bislang unbekannt ist, auf welche Weise (einzel- oder doppelsträngig) und wo (im Doppelstrang oder im Loop, symmetrisch oder nicht) die Nuklease Dicer schneidet und die Länge des einzelsträngigen Loopbereichs strukturell nicht bekannt ist, besteht die Gefahr, daß nach dem Dicer-Schnitt Nukleotide aus der Loopsequenz an der siRNA verbleiben und die Spezifität der siRNA beeinträchtigen. Drittens wurde auf diese Sequenz verzichtet, weil dadurch ein zusätzliches Kriterium zur Zielsequenzauswahl eingeführt werden konnte, das die Wahrscheinlichkeit, eine korrekte siRNA zu erhalten,

deutlich erhöhen sollte: Findet sich das Palindrom, das im Rahmen der Konstruktion entsteht, in der mRNA wieder, so ist aus Symmetriegründen die genaue Position des Dicer-Schnittes irrelevant, da die möglichen Produkte immer komplementär zur mRNA-Sequenz sind (s. Abbildung 47). Die erlaubte Variabilität der Schnittposition hängt dabei von der Länge des Palindroms ab, aber bereits ein Halbpalindrom von nur einer Base verringert in der siRNA beim Auftreten sequenzfremder Basen durch den Dicer-Schnitt deren Anzahl um eine. Dieses Kriterium ist leicht zu berücksichtigen, denn ein einbasiges Halbpalindrom (d. h. eine Sequenz von AU, UA, GC oder CG) tritt statistisch alle vier Basen auf, ein zweibasiges Halbpalindrom alle 16 Basen. Durch die mögliche Längenvariation der Zielsequenz im Bereich von vier Basen (s. o.) erhöht sich für jeden solchen Zielbereichskandidaten die Wahrscheinlichkeit, ein zweibasiges Halbpalindrom berücksichtigen zu können, auf 23 %, für ein einbasiges Halbpalindrom sogar auf 68 %<sup>27</sup>.



**Abbildung 47: Funktionalität der von pALsh-Derivaten exprimierten shRNA**

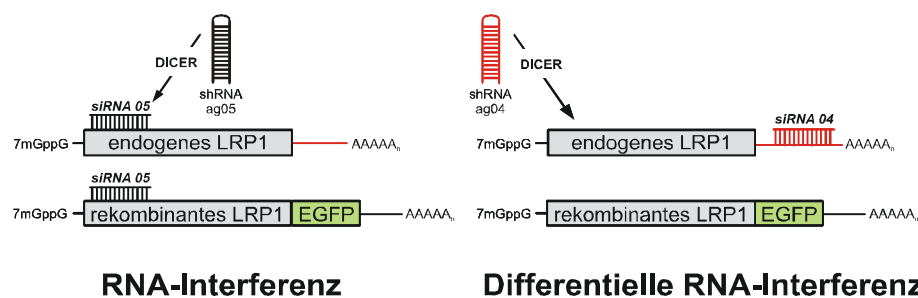
Die Abbildung zeigt anhand einer zufälligen Beispielsequenz die Eigenschaften einer mit dem pALsh-System exprimierten shRNA für den Fall, daß die aktive siRNA auf dem 3'-Ende der shRNA kodiert ist. Für den Fall der Kodierung auf dem 5'-Ende gilt das folgende entsprechend. Die berücksichtigte Zielsequenz auf der mRNA ist in Großbuchstaben dargestellt, die zugehörigen Basenpaarungen sind durch Striche angedeutet. Die fettgestellten Basen sind obligatorisch. Die Zielsequenz ist so ausgesucht, daß sich nach dem Bereich, der dem doppelsträngigen Bereich in der shRNA entspricht (grau) ein Palindrom befindet (Halbpalindrom unterstrichen, das Zentrum ist mit einem Stern markiert). Das Palindrom findet sich in der Loopsequenz der shRNA wieder, so daß unabhängig von der tatsächlichen Schnittposition von Dicer (mögliche Positionen sind mit gestrichelten Linien markiert) immer eine vollständige Komplementarität der entstehenden siRNA unabhängig von ihrer tatsächlichen Länge gewährleistet ist.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde üblicherweise favorisiert, ablesbar an den Design-Hinweisen vieler siRNA-synthetisierender Firmen, die Zielsequenzen aus dem Bereich ca. 100 Basenpaare nach dem Startcodon zu wählen. Durch die erfolgreiche Repression von LRP1 (Abbildung 15, S. 56) mit einer Zielsequenz in der 3'-UTR der endogenen mRNA konnte gezeigt werden, daß auch dieser Sequenzbereich für RNAi verwendet werden kann. Zusätzlich wurde auf diese Weise gezeigt, daß eine „Differentielle RNA-

<sup>27</sup> Berechnung: Jede Base ist genau dann ein einbasiges Halbpalindrom, wenn ihr ihre komplementäre Base folgt. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist 1:4. Die Gegenwahrscheinlichkeit, daß kein solches Palindrom vorliegt, ist demnach  $1 - 1:4 = 3:4$ . Bei vier möglichen Startbasen aufgrund der Längenvariation ist die Wahrscheinlichkeit, daß viermal kein solches Palindrom vorliegt  $(3:4)^4 = 81:256$ . Die gesuchte Gegenwahrscheinlichkeit, nämlich daß mindestens eine der vier Basen der Beginn eines solchen Palindroms ist, ist daher  $1 - 81:256 = 175:256 \approx 68 \%$ .

Für ein zweibasiges Halbpalindrom muß auf zwei beliebige Basen die jeweils komplementäre Base folgen; die Wahrscheinlichkeit dafür ist  $(1:4)^2 = 1:16$ . Die weitere Berechnung erfolgt analog zu oben.

Interferenz“ methodisch durchführbar ist (Abbildung 16, S. 57). Eine rekombinante mRNA entgeht bei dieser Methode durch die Wahl der Zielsequenz in der 3'-UTR des endogenen Transkripts der Degradation. Die – üblicherweise erfüllte – Bedingung dafür ist eine heterologe 3'-UTR, z. B. die SV40-PolyA-Sequenz in pFB-LRP-EGFP (s. Abbildung 48). Das Ergebnis bei Ko-Transfektion der Plasmide für differentielle RNAi und des zugehörigen Transgens ist ein Austausch von endogenem Protein gegen rekombinantes. Diese Technik ist insbesondere für funktionelle Analysen mit Aminosäure-ausgetauschten Proteinen interessant, wenn, wie bei *loss-of-function*-Mutanten üblich, kein dominanter Phänotyp zu erwarten ist. Dieser Ansatz der differentiellen RNA-Interferenz ist erfolgversprechender und weniger arbeitsintensiv als die Unterscheidung der Transkripte durch stille Mutation der rekombinanten Zielsequenz, zumal bei einem solchen Ansatz die Spezifität für jeden einzelnen Fall neu nachgewiesen werden muß. Die in dieser Arbeit im Bereich RNAi erhaltenen Ergebnisse wurden als „Differential RNA Interference“ zusammen mit dem pALsh-System publiziert (Laatsch et al. 2004).



**Abbildung 48: Differentielle RNA-Interferenz**

Wird die Zielsequenz nicht wie bisher üblich aus dem 5'-Bereich der kodierenden Sequenz der Ziel-RNA gewählt (links), sondern z. B. aus der 3'-UTR des endogenen Transkripts (rechts), so läßt sich selektiv die Expression des endogenen Proteins unabhängig von der kodierenden Sequenz einer ko-exprimierten, rekombinanten Version des gleichen Proteins inhibieren.

Bei der Quantifizierung der erfolgreichen Suppression von LRP1 (Abbildung 15, S. 56) auf RNA- (Abbildung 16, S. 57) und Proteinebene (Abbildung 17, S. 58) fällt auf, daß die Suppression auf Proteinebene in Übereinstimmung mit den Daten aus der Immunfluoreszenz z. T. stärker ausfällt als auf RNA-Ebene (Reduktion um 40 % bis 70 % auf Proteinebene vs. 30 % auf RNA-Ebene). Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, daß zusätzlich zum siRNA-Effekt auch ein miRNA-Effekt vorliegt, der zwar zu einer Inhibition der Translation, nicht jedoch zur Degradation der mRNA führt. Ein nicht vollständiger Abbau der von RISC geschnittenen mRNA durch zelluläre RNasen, der zu einer Detektion translational nicht aktiver mRNA in der qPCR führen könnte, kann ausgeschlossen werden, da die qPCR mit verschiedenen Primerpaaren über die mRNA verteilt mit identischen Ergebnissen wiederholt wurde (Daten nicht gezeigt). Eines der dabei verwendeten Primerpaare flankierte sogar die jeweilige siRNA-



Zielsequenz. Die vorgeschlagene Interpretation der Beteiligung eines miRNA-Effekts scheint jedoch plausibel, denn die Konsequenz wäre, daß es keine reine siRNA und keine reine miRNA gibt, sondern kurze, komplementäre RNAs immer beide Aspekte in sich vereinen. Die Entscheidung in Richtung miRNA-Effekt scheint durch die Sekundärstruktur der Basenpaarung getroffen zu werden in dem Sinne, daß eine nicht vollständige Basenpaarung, d. h. sterische Unregelmäßigkeit, eine Degradation verhindert (Hutvágner und Zamore 2002). Es wäre durchaus vorstellbar, daß bestimmte Sekundärstrukturen der dsRNA-Region die Nukleaseaktivität von RISC graduell inhibieren, so daß je nach individueller Sequenz jede reale kleine RNA in ihren Eigenschaften irgendwo zwischen den Extremen „siRNA“ und „miRNA“ steht. Ein weiteres Argument für diese Hypothese ist, daß in einem solchen Szenario nur ein Proteinkomplex, nämlich RISC, für beide Funktionen hinreichend wäre.

Die beschriebene Repression auf RNA- und Proteinebene führte funktional zu einem Ausbleiben der Aufnahme von RAP (Abbildung 15, S. 56), einem klassischen Liganden von LRP1 (Strickland et al. 1990). Trotz der erfolgreichen Konstruktion des beschriebenen Systems zur differentiellen RNA-Interferenz gegen LRP1 wurde es in dieser Arbeit nur in wenigen Experimenten eingesetzt, da sich Hepatomzellen, das Zellsystem mit signifikanter Expression von endogenem LRP1, für die Transfektion von Plasmid-DNA schlecht zugänglich erwiesen. Da aber gerade in *loss-of-function*-Experimenten, wie RNAi-Ansätze sie darstellen, eine sehr hohe Transfektionsrate erforderlich ist, um signifikante Effekte messen zu können, ist für die Zukunft geplant, diese Konstrukte in ein Adenovirus zu übertragen, um in einer Studie, analog zu der ebenfalls auf pALsh basierenden Untersuchung von Ragozin et al. (2005), die Expression von hepatischem LRP1 *in vitro* und *in vivo* zu inhibieren.

## 4.2 Zellbiologie von LRP1

Die intrazelluläre Lokalisation und Morphologie des LRP1-Kompartiments wurde mit hochauflösender, konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht. LRP1 ist in unstimulierten Zellen in perinukleären Vesikeln lokalisiert (Abbildung 18 und Abbildung 34, S. 59 und S. 70). Dies ist ein deutlicher Unterschied zum LDL-Rezeptor, der zu deutlichen Teilen in der PM lokalisiert ist. In lebenden Zellen wurden regelmäßig LRP1-EGFP-Vesikel mit einem Durchmesser von bis zu einem Mikrometer beobachtet (Abbildung 20, S. 60). Dies ist überraschend, da bisher LRP1-Vesikel aus der Literatur nur als kleine, punktförmige, nicht weiter aufgelöste Signale in fixierten Zellen bekannt sind (z. B. Llorente-Cortés et al. 2000, Newton et al. 2005). Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung der deutlich größeren Vesikel wäre die Eigenschaft von GFP, Dimere zu bilden. Die dimerisierten Intrazellulärdomänen von LRP1-EGFP könnten dann entweder die Sortierung des Proteins behindern oder sogar

ein spezifisches Signal vortäuschen, z. B. im Sinne zweier Tyrosinkinase-Rezeptoren, die nach Ligandenbindung dimerisieren und den aktivierten Rezeptor bilden oder im Sinne eines noch nicht verstandenen Ko-Rezeptor-Signalmechanismus von LRP1 (Newton et al. 2005). Dagegen spricht jedoch die grundsätzlich schwache GFP-Interaktion, die in aller Regel nicht zu Artefakten führt (Zhang et al. 2002). Um dies für die konkrete Fragestellung an LRP1 abzusichern, wurden aus pEGFP-N1 durch gezielte Mutagenese Mutanten nach Zacharias et al. (2002) hergestellt, in denen die Dimerisierungsoberfläche unterbrochen ist, und diese mit LRP1 analog zu LRP1-EGFP fusioniert. Da das daraus erhaltene Protein keinen mikroskopisch erkennbaren Unterschied in seiner Lokalisation aufwies (Daten nicht gezeigt), wurde eine Dimerisierung des EGFP-Anteils von LRP1-EGFP als Grund für die Beobachtung der beschriebenen LRP1-Vesikel ausgeschlossen. Ein weiterer Grund für ein Artefakt könnte die räumliche Ausdehnung des EGFP-Anteils sein, der möglicherweise ebenfalls die Bindung von Adaptor-Proteinen behindern könnte, die für die korrekte Sortierung des Rezeptors erforderlich sind. Trotz zahlreicher Versuche gelang es leider weder ein internes noch ein N-terminales Fusionsprotein zu erstellen. Solche Konstrukte hätten jedoch letztlich die Problematik nur verlagert, da aufgrund der Vielzahl von Liganden von LRP1 davon ausgegangen werden muß, daß die Konformation sowohl zwischen den beiden Untereinheiten als auch in den Ligandenbindungsdomänen von LRP1 Auswirkungen auf die Sortierung des Rezeptors hat. Unabhängig von der Position des EGFP-Anteils muß mit solchen Effekten immer gerechnet werden. Daher wurden fixierte, transfizierte und nicht-transfizierte Zellen ausgiebig miteinander verglichen, mit dem Ergebnis, daß die in lebenden Zellen in großen Mengen beobachteten, großen Vesikel von LRP1-EGFP in fixierten Präparaten nicht bzw. nur so selten nachzuweisen waren wie entsprechende Vesikel aus endogenem LRP1 (Abbildung 21 und Abbildung 22, S. 61). Da bekannt ist, daß große Vesikel während des Fixier- und Färbeprozesses kollabieren können (Bowers und Maser 1988), trifft dies mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf die LRP1-EGFP-Vesikel zu (T. Kirchhausen, Boston, MA, persönliche Kommunikation). Gleiches gilt dann auch für die Vesikel aus endogenem LRP1, so daß im Umkehrschluß auch diese Vesikel in lebenden Zellen eine differenziertere Morphologie aufweisen als im fixierten Präparat. Ein letzter Beweis kann jedoch nicht erbracht werden, da einerseits bislang noch keine Daten zur Darstellung von LRP1 in lebenden Zellen veröffentlicht sind und andererseits mit den zur Verfügung stehenden Methoden endogenes LRP1 in lebenden Zellen nicht direkt beobachtet werden kann.

Aus den Untersuchungen läßt sich demnach ableiten, daß es sich bei den großen LRP1-EGFP-Vesikeln um eine natürlich Vorkommensform von LRP1 handelt und nicht um artifizielle Aggregate. Dies wird weiter erhärtet durch die Beobachtung von Bewegung und insbesondere der Fusionsaktivität dieser Vesikel (Abbildung 23 und Abbildung 24, S. 63 und 64), die auf eine Einbindung in subzelluläre Vorgänge

hindeutet. Die Fusionsaktivität schließt trotz ähnlicher Morphologie bereits aus, daß es sich bei diesen Vesikeln um *lipid droplets* handelt (C. Thiele, Dresden, persönliche Kommunikation); zudem war der Inhalt der Vesikel nicht mit NileRed anfärbbar (Daten nicht gezeigt), was die Anwesenheit größerer Mengen an Neutralfetten ausschließt.

Funktionell führt die Überexpression von LRP1-EGFP zu einer deutlichen Erhöhung der Aufnahme des LRP1-Liganden RAP (Abbildung 25, S. 65). Dies entspricht den Erwartungen (Willnow et al. 1994b), da RAP ein Chaperon für LRP1 ist (Willnow et al. 1995). Die Aufnahme erfolgt in die bereits diskutierten LRP1-Vesikel (Abbildung 26, S. 65 und Abbildung 27, S. 66). Eine derart hochaufgelöste Darstellung der Aufnahmevesikel ist bisher noch nicht bekannt gewesen (T. Willnow, Berlin, persönliche Kommunikation).

RAP bindet außer an LRP1 noch an einen weiteren Rezeptor der LDL-Rezeptorfamilie, nämlich an LRP2/Megalin/gp330 (Kounnas et al. 1992), der im Menschen jedoch nur in bestimmten Zelltypen der Niere, Plazenta, Nebenhoden, Lunge, Schild- und Nebenschilddrüse, dem Ziliarkörper des Auges sowie dem Brustepithel exprimiert wird (Lundgren et al. 1997). In Leberzellen zeigt die Aufnahme von RAP somit spezifisch die Anwesenheit von LRP1 an. Da HEK293-Zellen jedoch renalen Ursprungs sind, wäre es möglich, daß eine RAP-Aufnahme in diesen Zellen auch über LRP2/Megalin/gp330 stattfindet. Nach RNAi-vermittelter Inhibition der LRP1-Expression in HEK293-Zellen wurde jedoch keine RAP-Aufnahme mehr detektiert (Abbildung 15, S. 56), so daß auch in diesen Zellen RAP als spezifischer Indikator für LRP1 verwendet werden kann.

Auffällig ist, daß die Bindung zwischen RAP und LRP1 im Gegensatz zur Bindung von ApoE an LRP1 auch im LRP1-Vesikel offenbar noch Bestand hat, da RAP mikroskopisch sehr deutlich an die innere Vesikelmembran assoziiert beobachtet wird, während ApoE gleichmäßig im Lumen des Vesikels verteilt ist (Abbildung 27 und Abbildung 41, S. 66 und S. 76). Ein weiterer Unterschied zwischen der Aufnahme von RAP bzw. CR/ApoE ist, daß nach längerer Aufnahme auch RAP-enthaltende Vesikel beobachtet werden, die kein LRP1 enthalten, während nach der Aufnahme von CR/ApoE alle ApoE-enthaltenden Vesikel auch LRP1-positiv sind (Abbildung 40 und Abbildung 41, S. 75f). In Bezug auf RAP passen die erhaltenen Ergebnisse zu den Literaturdaten über die RAP-Aufnahme durch das bereits diskutierte, eng verwandte LRP2/Megalin/gp330. Czekay et al. (1997) beschreiben für LRP2/RAP-Komplexe eine gemeinsame Aufnahme in frühe Endosomen und eine Dissoziation von LRP2 und RAP in späten Endosomen. LRP2 recycelt anschließend zur Zelloberfläche, während RAP im Lysosom degradiert wird. Nimmt man eine Analogie zwischen LRP1 und LRP2 an, so handelt es sich demnach bei den Vesikeln, in denen RAP an die Vesikelmembran assoziiert ist, um frühe Endosomen, bei den wenigen Vesikeln, in denen RAP frei im Lumen vorliegt, um späte Endosomen und bei den LRP1-freien RAP-Vesikeln um

Lysosomen. In Bezug auf ApoE und die beteiligten Kompartimente werden die beschriebenen Unterschiede zur RAP-Aufnahme in Kapitel 4.3 diskutiert.

Zusammengefaßt wurde ein Expressionssystem erstellt, mit dem vollständiges, humanes LRP1 als Fusionsprotein mit EGFP funktional exprimiert werden kann. Damit lassen sich sowohl zellbiologische Funktionen von LRP1 durch Fluoreszenz-Lebendzellmikroskopie direkt untersuchen als auch funktionelle Studien in Überexpressionssystemen durchführen. Die Anwendungsmöglichkeiten beschränken sich dabei nicht auf den hepatischen Lipoproteinstoffwechsel, sondern schließen z. B. Fragen zur APP-Prozessierung in Neuronen oder Signalprozesse in SMC mit ein.

### **4.3 LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel**

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der Funktion von LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel, d. h. insbesondere bei der Aufnahme von CR/ApoE. Die für die Untersuchungen verwendeten CR/ApoE\* (Abbildung 31, S. 69) sind biologisch aktiv und zeigen eine Aufnahme sowohl in Hepatomzellen als auch in HEK293-Zellen (Abbildung 34, S. 71). Für alle ApoE-Isoformen war der ApoE-Gehalt vergleichbar (Abbildung 32, S. 69), so daß experimentell beobachtete Unterschiede bei der Aufnahme nicht auf eine unterschiedlich starke Beladung der CR mit der jeweiligen ApoE-Isoform zurückzuführen sind. Der Einfluß des vom Spender stammenden ApoE-Anteils (Isoformen 2 und 3) auf den Partikeln ist gering und kann aufgrund der Anreicherung mit rekombinantem ApoE vernachlässigt werden (J. Heeren, Hamburg, unpublizierte Daten), da bereits die typischerweise noch ApoE-armen CM isoliert wurden und darüber hinaus der ApoE2-Anteil nicht mit dem LDLR interagiert. Die Inhibition der LRP1-Expression mittels RNAi führte nicht zu einer merklich verringerten Aufnahme von CR/ApoE (Abbildung 35, S. 71). Dies zeigt in Übereinstimmung mit Willnow et al. (1994b) und Rohlmann et al. (1998), daß die Aufnahme von CR nicht ausschließlich über das in HEK293-Zellen ohnehin nur in sehr geringer Menge vorhandene (Abbildung 34, S. 71) LRP1 stattfindet, sondern auch in diesem Fall vermutlich der LDLR kompensatorisch die Funktion des fehlenden LRP1 übernimmt. Nach Rohlmann et al. (1998) ist die Halbwertszeit des LDL-Rezeptors bei Abwesenheit von LRP1 erhöht, wodurch mehr LDL-Rezeptoren für die Aufnahme der CR zur Verfügung stehen.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die These formuliert, daß Insulin als typisches postprandiales Hormon die Translokation von LRP1 in die PM stimulieren könnte, wodurch die Aufnahmerate für CR erhöht würde. Es konnte gezeigt werden, daß in Leberzellen eine LRP1-Translokation durch Stimulation mit Insulin tatsächlich möglich ist (Abbildung 28, S. 67) und es dadurch zu einer erhöhten Bindung (Abbildung 29, S. 68) und Aufnahme (Abbildung 30, S. 68) des LRP1-spezifischen Liganden RAP kommt. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung hepatischer FAO-Zellen aus der

Ratte (*Rattus norvegicus*) gewonnen, die eine insulininduzierte Signalkaskade insulinabhängig aktivieren (J. Heeren, Hamburg, unpublizierte Daten). Sie bestätigen für die Leber Befunde, die bisher entsprechend nur an Fettgewebe von Nagern gewonnen wurden (Corvera et al. 1989, Descamps et al. 1993). Da keine insulinsensitive, humane Leberzelllinie bekannt ist, steht der letzte Nachweis für das humane System noch aus. Kürzlich wurde in murinen Adipozyten gezeigt, daß Insulin über die reine Translokation von LRP1 hinaus dieses dort auch in spezielle Membranbereiche dirigiert (Zhang et al. 2004). Diese als Caveolae bezeichneten Invaginationen der PM beherbergen eine Vielzahl von Signalrezeptoren inklusive des Insulin-Rezeptors (Übersicht von Cohen et al. 2003) und sind darüber hinaus das Ziel eines signifikanten Anteils des insulinstimuliert translozierten Glukose-Transporters GLUT4 (Scherer et al. 1994). Die Parallelität des insulinstimulierten Verhaltens von GLUT4 und LRP1 ist bei diesen Befunden nicht zu übersehen und legt für LRP1 im Lipidstoffwechsel eine analoge Rolle nahe wie sie GLUT4 im Glukosestoffwechsel zukommt.

Entscheidend für die Relevanz dieser Hypothese *in vivo* ist das zeitliche Überlappen des postprandialen Insulin-Plasmapeaks mit dem Auftreten von CM/CR im Plasma. Die primär durch Glukose stimulierte Insulinausschüttung erfolgt unmittelbar nach der Nahrungsaufnahme, die Aufnahme der Nahrungslipide im Dünndarm und deren Transport in das Blutsystem (vgl. Kapitel 1.1.2) benötigt jedoch merklich länger. Der Verlauf der Insulinkonzentration im Plasma wird in Lehrbüchern üblicherweise nur für den Fall angegeben, daß die vorherige Glukosebelastung in Form einer konzentrierten Glukoselösung durchgeführt wurde. Das Ergebnis ist ein relativ kurzer Insulinpeak mit einem schnell auftretenden Maximum, das zum Zeitpunkt des Auftretens der Nahrungsfette im Blut bereits größtenteils wieder abgeklungen ist. Tatsächlich stellt sich die Situation nach einer normal großen, festen Mahlzeit, bestehend aus Fetten, Kohlenhydraten und Proteinen, aufgrund der längeren Verweilzeit im Verdauungssystem jedoch gänzlich anders dar (Karpe 2005; persönliche Kommunikationen mit F. Karpe, Oxford): Die direkte Messung der entsprechenden Werte von Probanden ergibt ein Maximum der Insulinkonzentration innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Mahlzeit; der Basallevel ist erst nach vier Stunden wieder erreicht. TG erreichen ihre maximale Konzentration ein bis drei Stunden postprandial, Chylomikronen nach einer Stunde, und die aufgenommenen Fettsäuren erscheinen bereits nach 90 min in der VLDL-Fraktion, d. h. sie sind in diesem Zeitpunkt bereits zum ersten Mal in der Leber verstoffwechselt worden. Diese Daten sind eine eindeutige Grundlage für die Hypothese, daß Insulin außerhalb des Glukosestoffwechsels auch den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel beeinflusst.

Mit Blick auf diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß die Stimulation mit Insulin durch die Translokation von LRP1 zu der erwarteten erhöhten

Aufnahme von CR/ApoE führt (Abbildung 33, S. 70). Im Vergleich der ApoE-Isoformen führt die Stimulation mit Insulin insbesondere bei ApoE2 zu einer starken Erhöhung der CR-Aufnahme. Dies zeigt zum einen, daß LRP1 nach Stimulation durch Insulin für die fehlende Bindung von ApoE2 zum LDLR kompensieren kann. Zum anderen erklärt es, warum die Funktion von LRP1 in Aufnahme-Experimenten mit injizierten CR im Vergleich zum LDLR in der Literatur bisher unterschätzt wurde (Choi und Cooper 1993, Herz et al. 1995, de Faria et al. 1996), da in dieser unphysiologischen Situation keine Insulinreaktion und folglich auch keine LRP1-Translokation stattfindet. Da sich die unstimulierten Zellen im Experiment entsprechend der Affinität der ApoE-Isoformen gegenüber dem LDLR verhalten (Abbildung 33 oben, S. 70 und Bohnet et al. 1996), verschiebt sich in Übereinstimmung mit den diskutierten Ergebnissen zur LRP1-Translokation nach Stimulation mit Insulin das LRP1/LDLR-Verhältnis in der PM offenbar tatsächlich zugunsten von LRP1. Damit ist eine zusätzliche Translokation etwa des LDLR unwahrscheinlich, zumal in immunzytochemischen Analysen deutliche intrazelluläre Speichervesikel im wesentlichen für LRP1 gefunden wurden (Abbildung 18, S. 59). Im Gegensatz zu ApoE2 war für ApoE4 kein Unterschied in der Aufnahme verglichen mit der 'Normalform' ApoE3 erkennbar. Dies ist verständlich, da ApoE4 eine ähnliche Bindungsaffinität zum LDLR besitzt wie ApoE3. Dieses Ergebnis der Isoform-unabhängigen Aufnahme von ApoE durch LRP1 nach Stimulation mit Insulin wurde kürzlich von Ruiz et al. (2005) durch Messung der Bindungsaffinität der ApoE-Isoformen gegenüber LRP1 bestätigt, die demnach als identisch angesehen werden können.

Verbunden mit der hier gezeigten insulinabhängigen Translokation von LRP1 in der Leber liefert die vorliegende Arbeit eine direkte Erklärung dafür, warum Patienten mit einem ApoE2/2 Phänotyp nicht unter der zu erwartenden Hyperlipoproteinämie leiden: Das hepatische LRP1 ist postprandial in der Lage, durch die insulinstimulierte Translokation und damit verbundene Aktivitätssteigerung den fehlenden Anteil der CR/ApoE-Aufnahme auszugleichen, der normalerweise über den LDLR erfolgt. Entsprechend erklärt sich auch die zugehörige klinische Beobachtung, daß diese Patienten nach der Manifestation eines Diabetes mellitus Typ II letztlich doch die zu erwartende Hyperlipoproteinämie entwickeln (Eto et al. 1989): Die diabetische Insulinresistenz verhindert die Translokation von LRP1, so daß es nicht mehr zu einer relevant gesteigerten Aufnahme kommen kann und die entsprechenden Partikel im Plasma akkumulieren. Dieser letzte Schritt muß als Fortsetzung dieser Arbeit noch an insulinresistenten Zellmodellen und/oder mit klinischen Daten bestätigt werden, um diese Erkenntnisse möglicherweise in eine therapeutische Strategie zur pharmakologischen oder diätischen Aktivierung von LRP1 umzusetzen. Einen Ansatz zu einer diätischen Kontrolle über aktivierende Fettsäuren könnten Daten zur positiven Regulation der LRP1-Expression über den Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  (Gauthier et al.

2003) bedeuten, der alternativ auch pharmakologisch stimulierbar ist, z. B. über Agonisten wie Rosiglitazon. Dies ist möglicherweise eine Erklärung für eine Reihe von Studien, die auf eine Abhängigkeit der CR-Aufnahme von deren Fettsäurezusammensetzung hinweisen (Übersicht von Williams 1998).

Basierend auf dem gleichen Mechanismus und verbunden mit den gleichen therapeutischen Optionen ist möglicherweise auch die verlängerte postprandiale Lipidantwort in insulinresistenten Diabetes-Patienten zu sehen. Hier, wie auch im oben diskutierten Fall in Verbindung mit einem ApoE2-Phänotyp, wird die Situation der Insulinresistenz möglicherweise noch verschärft durch die zumindest für den humanen Muskel nachgewiesene Reduktion der LRP1-Expression in diabetischen Patienten (Boucher et al. 2002a)<sup>28</sup>, die möglicherweise auch in der Leber auftritt. Grundsätzlich sind jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit noch weit mehr Mechanismen an der Pathophysiologie des diabetischen Lipoproteinstoffwechsels beteiligt. Ein Beispiel dafür ist die Reduktion der insulinabhängigen LpL-Expression und -Sekretion (Spooner et al. 1979) in insulinresistenten Patienten (Jones et al. 1966), da LpL ebenfalls die Aufnahme von CR über LRP1 stimuliert (Beisiegel et al. 1991).

Über die geschilderte pathophysiologische Relevanz der insulinabhängigen LRP1-Translokation hinaus haben die erhaltenen Daten Einfluß auf das Verständnis des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels im Gesunden. Sie bestätigen die eingangs formulierte Hypothese, daß LRP1, analog zum Glukosetransporter GLUT4 in Fett- und Muskelgewebe, durch das postprandial ausgeschüttete Insulin in die Plasmamembran von Leberzellen gebracht wird, um, wie GLUT4 in Bezug auf Glukose, eine massiv erhöhte Aufnahmerate für CR zu ermöglichen. Nur eine derart gesteigerte Aufnahme, die offensichtlich vorhanden ist, aber noch nicht erklärt werden konnte, wäre in der Lage, die hoch atherogenen CR, die postprandial in großer Menge vorhanden sind, innerhalb weniger Minuten schnell und effizient aus dem Blutkreislauf zu entfernen.

Nach der Aufnahme von CR/ApoE findet eine Re-Sekretion des ApoE-Anteils statt (Heeren et al. 1999, Rensen et al. 2000). Für die in dieser Arbeit z. T. verwendeten HEK293-Zellen konnte die von Hepatomzellen (Heeren et al. 1999) bekannte Trennung der aufgenommenen CR in ApoE-haltige, peripher verbleibende 'Surface Remnants' und den Lipidteil ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 36, S. 72). Durch den Einsatz konfokaler Lebendzellmikroskopie konnte dieses Phänomen nun ohne eine vorherige Fixierung und Immunfärbung direkt in der lebenden Zelle beobachtet werden. Die immunzytochemische Untersuchung wurde in von Heeren et al. (1999) ebenfalls verwendeten Fibroblasten durchgeführt, da sie aufgrund ihrer flächigen

---

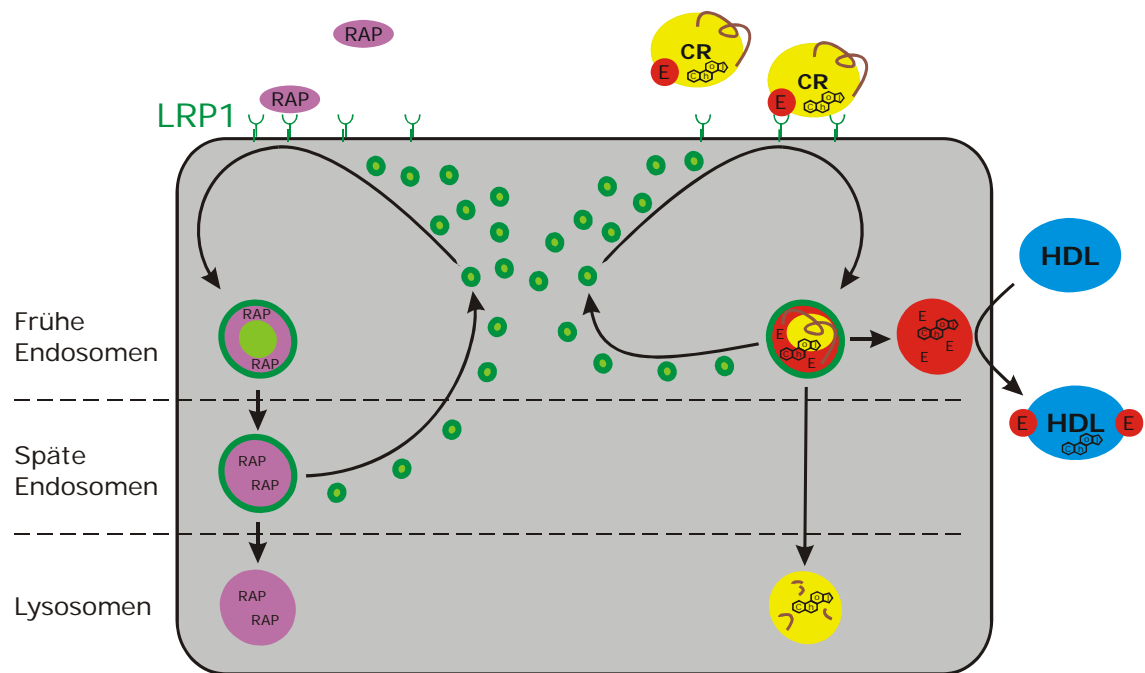
<sup>28</sup> Bei der von den Autoren diskutierten Erhöhung der LRP1-Expression in Adipozyten nach wenigen Minuten Insulinstimulation in der Studie von Descamps et al. (1993) handelt es sich tatsächlich um die dort gezeigte Translokation von LRP1 in Ratten-Adipozyten. Untersuchungen zur Expressionshöhe wurden von Descamps et al. nicht durchgeführt.

Ausdehnung mikroskopisch gut darstellbar sind. Aufgrund der Kollokalisierung mit EEA1 (Mu et al. 1995) handelt es sich bei den ApoE-positiven Vesikeln um frühe Endosomen (Abbildung 37, S. 73). Die gleiche Abbildung zeigt, daß diese frühen Endosomen zusätzlich Cholesterol enthalten. Die Experimente mit einem fluoreszierenden Cholesterol-Derivat, das den Aufenthaltsort des über CR zugegebenen Cholesterols markiert (Abbildung 39, S. 74), deuten darauf hin, daß es sich mindestens bei einem Teil dieses Cholesterols um das exogene Cholesterol aus den CR handelt, obwohl das neu aufgenommene Cholesterol rasch in den intrazellulären Pool integriert wird (Abbildung 38, S. 74 und Abbildung 45, S. 79). Mit zeitaufgelöster, konfokaler Lebendzellmikroskopie wurde gezeigt, daß die Akkumulation von ApoE in LRP1-Vesikeln stattfindet (Abbildung 40, S. 75), bei denen es sich demnach um dieselben frühen Endosomen handeln muß wie oben beschrieben. Einen weiteren Hinweis darauf gibt, wie bereits in Kapitel 4.2 beschrieben, ein Analogieschluß zu dem strukturell sehr ähnlichen Rezeptor LRP2/Megalin/gp330. Nach Czekay et al. (1997) dissoziieren LRP2/RAP-Komplexe erst in späten Endosomen, während sie in frühen Endosomen noch assoziiert vorliegen. In Abbildung 41 (S. 76) ist zu sehen, daß ApoE bereits zu einem Zeitpunkt von LRP1 dissoziiert vorliegt, zu dem eine Assoziation mit RAP noch besteht. Folglich handelt es sich daher bei diesen Vesikeln erstens in der Tat um frühe Endosomen und zweitens findet das Recycling von LRP1 (und ApoE) bereits in frühen Endosomen statt, während LRP1 vermutlich wie LRP2 nach RAP-Aufnahme aus späten Endosomen recycelt (s. Abbildung 49). Diese Interpretation wird durch eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit von van Kerkhof et al. (2005) bestätigt, die zeigt, daß die Sortierung von LRP1 abhängig ist von Sorting Nexin 17 (Snx17), das in frühen Endosomen gefunden wird (Stockinger et al. 2002). Die beobachtete Fusionsaktivität der LRP1-Vesikel (Abbildung 23 und Abbildung 24, S. 63f) und die Tatsache, daß LRP1 ein Rezeptor für ApoE ist (Beisiegel et al. 1989), legen die Vermutung nahe, daß analog zur RAP-Aufnahme (Abbildung 26 und Abbildung 27, S. 65) auch die Aufnahme von CR/ApoE in großen Teilen über LRP1 vermittelt ist und die primär endozytierten Vesikel schrittweise miteinander fusionieren, bis sie, bzw. das ApoE<sup>\*</sup>-Signal, mikroskopisch sichtbar werden. Der Ausgang der Diskussion, ob insbesondere der LDLR (Rensen et al. 2000) oder LRP1 (Fazio et al. 1999, Heeren et al. 2001 und 2003) am Recycling von ApoE beteiligt ist, ist jedoch weiterhin offen und aufgrund der Beteiligung mehrerer Wege möglicherweise nicht eindeutig zu klären (Farkas et al. 2004).

Fluoreszenzmikroskopische Experimente der vorliegenden Arbeit bestätigen die Vermutung von Heeren et al. (2001), daß das Recycling von ApoE tatsächlich durch HDL induziert wird: Nach Zugabe von HDL wird ApoE getrennt von LRP1 detektiert (Abbildung 42, S. 77) und assoziiert im Bereich der Plasmamembran mit HDL (Abbildung 43, S. 77). Bei diesen Vesikeln, in denen HDL und ApoE nebeneinander vorliegen, handelt es sich weiterhin um frühe Endosomen, die zusätzlich zu ApoE, HDL



und EEA1 auch Cholesterol enthalten (Abbildung 44, S. 78). Da EEA1 weiterhin anwesend ist, kann angenommen werden, daß sich der Komplex aus ApoE, Cholesterol, EEA1 und ggf. weiteren Komponenten während des Recyclings als Ganzes vom LRP1-Kompartiment trennt, bzw. LRP1 aus diesen Vesikeln abgezogen wird, und es sich dabei nicht um einen Transfer speziell von ApoE und Cholesterol in ein neues Kompartiment handelt. Mechanistisch erscheint dies sinnvoll, da einerseits die Abschnürung von LRP1-haltigen Membranbereichen weniger aufwendig ist als der gleichzeitige, gezielte Transfer von ApoE und Cholesterol und andererseits ApoE zum Zeitpunkt des Recyclings von LRP1 dissoziiert vorliegen muß. Diese Überlegungen stehen im Einklang mit dem weiter oben durchgeführten Vergleich von LRP1 mit LRP2, der durch die hochauflösenden Untersuchungen von LRP1-Vesikeln mit ApoE im Vergleich zu RAP unterstützt wird (Abbildung 41, S. 76). Passend zu der im Vergleich zu ApoE länger andauernden Bindung von LRP1 und RAP wird für RAP kein Recycling, sondern lysosomaler Abbau beobachtet. Die vorstehend beschriebenen Schlußfolgerungen aus den Experimenten zum zellbiologischen Ablauf der Aufnahme von RAP bzw. CR/ApoE und dem Recycling von ApoE und Cholesterol sind in Abbildung 49 zusammengefaßt.



**Abbildung 49: Intrazellulärer Verlauf der LRP1-vermittelten Aufnahme von RAP und CR/ApoE**

Sowohl RAP (rosa, linke Bildhälfte) als auch CR/ApoE (rechte Bildhälfte) werden an der PM durch LRP1 (grün) endozytiert und akkumulieren in frühen Endosomen. Während RAP zu diesem Zeitpunkt noch an LRP1 gebunden ist, ist die Bindung von LRP1 und ApoE bereits gelöst, und der CR-Partikel desintegriert in ApoE (rot), Lipidanteil (gelb) und ApoB48 (braun). LRP1 recycelt in diesem Fall bereits aus frühen Endosomen zur Plasmamembran. Der Lipidanteil der CR, ApoB48 sowie ein Teil des Cholesterols werden lysosomal transportiert und degradiert bzw. intrazellulär gespeichert. Das in den frühen Endosomen zurückgebliebene ApoE und der verbliebene Teil des Cholesterols kommen mit kurzzeitig internalisierter, ApoE-arter HDL (blau) in Kontakt und verlassen HDL-assoziiert die Zelle. Im Gegensatz dazu löst sich die Bindung von RAP und LRP1 erst in späten Endosomen, so daß LRP1 erst aus diesem Kompartiment an die Plasmamembran zurückkehren kann. RAP selbst wird anschließend lysosomal degradiert.

Mit konfokaler Lebendzellmikroskopie konnte das Recycling von ApoE in Relation zu Cholesterol und HDL-Protein auch zeitlich verfolgt werden (Abbildung 45, S. 79). Insgesamt konnte gezeigt werden, daß das Recycling von ApoE mit dem HDL-induzierten Recycling von Cholesterol verbunden ist und es dabei zu einer zeitweiligen Internalisierung der HDL kommt. Diese Ergebnisse flossen in ein Manuskript ein, daß vor Abschluß dieser Arbeit publiziert wurde (Heeren et al. 2003).

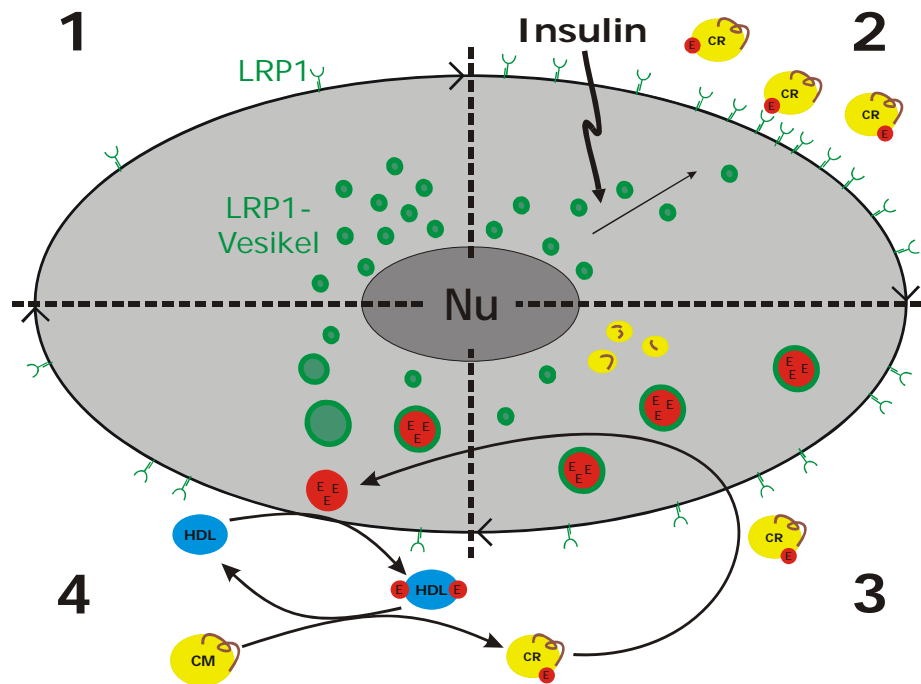
Der Teilaspekt der HDL-Induzierbarkeit des Recyclings wurde unabhängig von Farkas et al. (2003) bestätigt. Diese Studie wurde in murinen Hepatozyten und den für die Pathogenese der Atherosklerose wichtigen Makrophagen durchgeführt, so daß die Autoren von einem nicht-zellspezifischen Mechanismus ausgehen. Dies wird bestätigt durch die Ergebnisse aus dem humanen Zellsystem der vorliegenden Dissertation, die z. T. in Fibroblasten und Nierenzellen generiert wurden. Im Gegenzug legitimieren die Ergebnisse von Farkas et al. (2003) zusätzlich die aus technischen Gründen teilweise nötige Verwendung nicht-hepatischer Modellsysteme in der vorliegenden Arbeit.

Postprandial erfolgt die Aufnahme der CR jedoch nahezu vollständig in die Leber (Mahley und Ji 1999), so daß in dieser Situation praktisch ausschließlich hepatisches ApoE-Recycling stattfinden dürfte. Die Daten der vorliegenden Arbeit zur Re-Assoziation von recyceltem ApoE mit HDL und der Nachweis der HDL-Induzierbarkeit des Recyclings von ApoE (Heeren et al. 2003) legen die physiologische Interpretation nahe, daß das LRP1-vermittelte und HDL-induzierte Recycling von ApoE als der fehlende Teil des Kreislaufs zu sehen ist, dessen erster Teil der schon früh beschriebene intravaskuläre ApoE-Transfer von HDL zu CR ist (Imaizumi et al. 1978, van't Hooft und Havel 1981). Dies würde bedeuten, daß in der postprandialen Phase ein nach dem Transfer von ApoE auf CR möglicherweise entleerter HDL/ApoE-Pool durch das innerhalb weniger Minuten stattfindende Recycling von ApoE (s. Abbildung 42, S. 77 und Abbildung 45, S. 79) umgehend wieder gefüllt wird, um neues ApoE für die Aufnahme weiterer CR über LRP1 zur Verfügung zu stellen. Dazu passen die weiter oben diskutierten Ergebnisse, daß eine Dissoziation und Sortierung von ApoE und LRP1 bereits in frühen Endosomen stattfindet, d. h. zum frühestmöglichen Zeitpunkt, unmittelbar nach der Endozytose. Wie oben beschrieben, kann LRP1 die frühen Endosomen offenbar direkt in Richtung Plasmamembran verlassen und steht so umgehend für einen neuen Aufnahmezyklus zur Verfügung. Entsprechendes gilt für ApoE, das bereits in frühen Endosomen für die Re-Assoziation mit HDL zur Verfügung steht, um sofort wieder in den ApoE-Plasmapool integriert zu werden. Diese Zusammenhänge könnten die Voraussetzung für die mechanistisch noch immer unverstandene hohe Geschwindigkeit der Aufnahme der äußerst atherogenen CR aus dem Plasma sein. Hier nicht dargestellte Daten zeigen ein reduziertes Recycling von ApoE4 (Heeren et al. 2004). Die trotz effizienter ApoE4-Aufnahme (Abbildung 33, S. 70) *in vivo* verzögerte CR-Aufnahme (Bergeron und Havel 1996) erklärt sich so mit dem fehlenden ApoE-Nachschub.

#### **4.4 Modell: LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß das postprandiale Verhalten von hepatischem LRP1 als ApoE- und damit CR-Rezeptor wesentlich komplexer ist als bisher beschrieben. Zusammengefaßt läßt sich aus den oben diskutierten Befunden das in Abbildung 50 dargestellte Modell ableiten: Das präprandial hauptsächlich in perinukleären Vesikeln vorliegende LRP1 wird durch die postprandiale Insulinantwort in die Plasmamembran verlagert. Dadurch ist in der Leberzelle die Voraussetzung geschaffen, die je nach Fettgehalt der Nahrung gegebenenfalls sehr große Zahl an CR schnell und effizient aufzunehmen. Darüber hinaus stimuliert Insulin die Sekretion von LpL aus Zellen der Gefäßwand in Fett- und Muskelgewebe. Dies führt einerseits durch die enzymatische Aktivität der LpL zu einer schnelleren Umsetzung von CM zu CR und andererseits durch die Ligandenfunktion von LpL auf den CR zu deren verstärkter Aufnahme über LRP1.

Die effiziente Aufnahme der CR über LRP1 setzt jedoch zusätzlich die Anwesenheit von ApoE als Ligand auf den CR voraus. Dieses ApoE stammt aus dem intravaskulären, HDL-assoziierten ApoE-Pool, dessen begrenzter Vorrat bei einem erhöhten Fettgehalt der absorbierten Nahrungsbestandteile schnell erschöpft ist. Die Aufnahme der CR, die weiterhin aus dem intravaskulären Metabolismus der CM hervorgehen, wäre aufgrund des fehlenden ApoE nicht mehr möglich, da eine Neusynthese von ApoE in dem kurzen Zeitraum von einigen Minuten, in denen die Aufnahme erfolgt, ebensowenig beobachtet wird wie eine signifikante Ausschüttung aus etwaigen intrazellulären Lagern. Der zusätzliche ApoE-Bedarf wird statt dessen durch das Recycling von ApoE aus LRP1-Vesikeln gedeckt. Das recycelte ApoE wird von der Zelle an HDL abgegeben, von wo aus es für einen erneuten Aufnahmezyklus zur Verfügung steht. Dieser postprandiale ApoE-Zyklus wiederholt sich, bis keine neuen CR mehr entstehen und die postprandiale Phase beendet ist.



**Abbildung 50: LRP1 im postprandialen Lipoprotein-Stoffwechsel der Leber**

Präprandial befindet sich der größte Teil des hepatischen LRP1 (grün) in perinukleären Vesikeln (1). Stimuliert durch Insulin wird dieses LRP1 zusätzlich in die Plasmamembran gebracht, wo es die Aufnahme der ersten CR vermittelt (2). Deren ApoE-Anteil (rot) wird im Gegensatz zu ApoB48 und dem Lipidkern nicht degradiert, sondern in großen LRP1-Vesikeln gespeichert (3). Von dort wird es an ApoE-arme HDL abgegeben (4), so daß es für einen neuen Aufnahmezyklus (3-4) bestehend aus Transfer auf CR, LRP1-vermittelter Aufnahme und Recycling zur Verfügung steht, bis die postprandiale Phase nach der Verstoffwechslung aller CM beendet ist.

LRP1 kommt somit eine Schlüsselposition im hepatischen, postprandialen Lipoprotein-Stoffwechsel zu: Auf der einen Seite fungiert LRP1 als rasch verfügbarer, bedarfsgerecht regulierbarer Endozytose-Rezeptor für CR. Damit stellt LRP1 auf zellulärer Seite die benötigte Aufnahmerate für eine schnelle Entfernung der CR aus der Zirkulation sicher. Auf der anderen Seite ist LRP1 über das Recycling von ApoE daran beteiligt, intravaskulär die Voraussetzungen für diesen Aufnahme-prozeß zu schaffen, indem es Nachschub für den postprandial stark belasteten, HDL-assoziierten ApoE-Pool liefert.

Diese zentrale Rolle von LRP1 im postprandialen Lipoprotein-Stoffwechsel sowie die weiter oben diskutierten, pathophysiologischen Implikationen, z. B. im Kontext der Volkskrankheit Diabetes mellitus, sind mit Blick auf das medizinische Verständnis dieser Vorgänge die entscheidenden Argumente, die eine noch wesentlich eingehendere Untersuchung dieses in vielerlei Hinsicht außergewöhnlichen Moleküls dringend erforderlich erscheinen lassen. Die Kenntnis der beteiligten Signalwege und molekularen Mechanismen der Sortierung der Bestandteile der CR verspricht nicht nur fruchtbare Erkenntnisse in der zellbiologischen und metabolisch-endokrinen Grundlagenforschung, sondern eröffnet hoffentlich auch neue, erfolgversprechende Wege zur Vermeidung und Behandlung der Krankheiten, mit denen sich die Medizin in den kommenden Jahrzehnten aufgrund unserer dramatisch gewandelten Lebensgewohnheiten konfrontiert sehen wird.

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß LRP1 in hepatischen Zellen durch das postprandiale Hormon Insulin aus intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran verlagert wird. Dies führt zu einer erhöhten Aufnahme von CR/ApoE, insbesondere bei Anwesenheit der Isoform ApoE2.

Es wurde ein auf RNAi basierendes System zur spezifischen Repression von endogenem LRP1 entwickelt und ein fluoreszierendes, 630-kD-Fusionsprotein aus vollständigem, humanen LRP1 und EGFP konstruiert und exprimiert. Damit konnte gezeigt werden, daß die aufgenommenen CR/ApoE-Partikel in frühen Endosomen desintegrieren. LRP1 recycelt anschließend zur Plasmamembran, ApoB48 und die Kernlipide werden lysosomal transportiert und degradiert bzw. intrazellulär gespeichert. Darüber hinaus wurde gefunden, daß der ApoE-Anteil in frühen Endosomen verbleibt und dort mit kurzfristig aufgenommenener, ApoE-armer HDL assoziiert. Die HDL/ApoE-Partikel werden anschließend in das umgebende Medium re-sezerniert. Zusätzlich zeigte sich, daß der Efflux von Cholesterol mit dem Recycling von ApoE assoziiert ist und ebenfalls aus frühen Endosomen heraus in Richtung HDL stattfindet.

Die physiologische Bedeutung dieser Vorgänge liegt vermutlich in der maximalen Beschleunigung der Aufnahme der hoch atherogenen CR, die in der postprandialen Phase abhängig vom Lipidgehalt der Mahlzeit in großen Mengen auftreten. Die erhöhte Oberflächenrepräsentation von LRP1 nach Insulinstimulation ermöglicht eine erhöhte Aufnahmerate für CR/ApoE. Da jedoch der Plasmapool an ApoE, der HDL-gebunden vorliegt, nur eine begrenzte Kapazität aufweist, ist nach einer starken postprandialen Lipidbelastung ein schnelles Recycling des ApoE-Anteils der aufgenommenen CR/ApoE nötig. Dieses geschieht daher bereits aus frühen Endosomen heraus direkt zur HDL, wodurch das ApoE unmittelbar in einen neuen Aufnahmezyklus eintreten kann, indem es intravaskulär von der HDL wieder auf neu entstandene CR übertragen werden kann.

Pathophysiologisch könnte diesen Ergebnissen ebenfalls eine große Bedeutung zukommen. So wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß LRP1 durch die Stimulation mit Insulin für die fehlende Bindung der Isoform ApoE2 an den LDLR kompensieren und eine normale Aufnahmerate gewährleisten kann. Dies ist möglicherweise die Erklärung für das Ausbleiben einer Hyperlipoproteinämie in Patienten mit einem ApoE2/2-Phänotyp. Dieses Ergebnis kann weiterhin erklären, warum diese Patienten nach Ausbruch eines Diabetes mellitus Typ II plötzlich doch eine Hyperlipoproteinämie entwickeln, da unter Insulinresistenz der kompensatorische Effekt von LRP1 nicht greifen kann. Daher ist eine fehlende Aktivierung von LRP1 vermutlich auch einer der vielfältigen Gründe, die bei Altersdiabetes zur Entwicklung eines gestörten Lipoproteinstoffwechsels, insbesondere der verlängerten, postprandialen Lipidantwort, beitragen.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der LDL.....	8
Abbildung 2: Übersicht über den Lipoproteinstoffwechsel.....	10
Abbildung 3: Postprandialer Lipoproteinstoffwechsel.....	13
Abbildung 4: Struktur und Liganden von LRP1.....	15
Abbildung 5: Wichtige Mitglieder der LDLR-Familie.....	16
Abbildung 6: SmaI- und SpeI-Kontrollverdau der pALae02-Ligationsklone (TAE, 2.0 % bzw. 1.0%).....	47
Abbildung 7: Plasmidgel und SmaI-Kontrollverdau der pFB-LRPwt-Ligationsklone (TAE, 1.0%).....	49
Abbildung 8: Western-Blot gegen LRP1 in Sf9-Zellen.....	50
Abbildung 9: Kontrollgel pFB-cmv2LRP gegen pFB-cmvLRP (TAE, 1.2%).....	51
Abbildung 10: Kontrollgel der pFB-LRP-EGFP-Ligationsklone (TAE, 0.8%).....	52
Abbildung 11: Quantitative RT-PCR zum Nachweis der LRP1-EGFP-mRNA.....	53
Abbildung 12: <i>In-gel</i> Fluoreszenz von LRP1-EGFP.....	54
Abbildung 13: Intrazelluläre Darstellung von LRP1-EGFP.....	54
Abbildung 14: Kontrollgel der pALag04-Ligationsklone (TAE, 2.0%).....	55
Abbildung 15: Funktioneller Test der shRNA-Vektoren.....	56
Abbildung 16: Quantifizierung der RNAi-vermittelten mRNA-Degradation.....	57
Abbildung 17: Quantifizierung der RNAi-vermittelten Protein-Suppression.....	58
Abbildung 18: Intrazelluläre Lokalisation von endogenem LRP1 in HuH7 im Vergleich zum LDLR.....	59
Abbildung 19: Lokalisation von LRP1-EGFP.....	59
Abbildung 20: Dreidimensionale Darstellung von LRP1-EGFP-Vesikeln.....	60
Abbildung 21: LRP1-EGFP-Vesikel im fixierten Zellpräparat.....	61
Abbildung 22: Vesikel mit endogenem LRP1 im fixierten Zellpräparat.....	62
Abbildung 23: Bewegung und Fusion von LRP1-EGFP-Vesikeln.....	63
Abbildung 24: Fusion zweier LRP1-EGFP-Vesikel.....	64
Abbildung 25: RAP-Mehraufnahme durch Expression von LRP1-EGFP.....	65
Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der RAP-Aufnahme.....	65
Abbildung 27: Fusion von RAP-haltigen LRP1-EGFP-Vesikeln.....	66
Abbildung 28: Insulininduzierte Translokation von LRP1.....	67
Abbildung 29: RAP-Bindung an insulinstimulierte FAO-Zellen.....	68
Abbildung 30: RAP-Aufnahme in insulinstimulierte FAO-Zellen.....	68
Abbildung 31: Re-isolierte CR/ApoE*.....	69
Abbildung 32: Ligandengel der CR assoziiert mit ApoE* -Isoformen.....	69
Abbildung 33: CR/ApoE-Aufnahme in Insulin-stimulierte FAO-Zellen.....	70
Abbildung 34: Aufnahme von CR/ApoE3* in HuH7- und HEK293-Zellen.....	71
Abbildung 35: Aufnahme von CR/ApoE3* nach Inhibition der LRP1-Expression in HEK293-Zellen.....	71
Abbildung 36: Trennung von Lipid- und ApoE-Anteil aus CR/ApoE3* nach Aufnahme in HEK293-Zellen.....	72
Abbildung 37: Kolokalisation von ApoE, EEA1 und Cholesterin nach der Aufnahme von CR/ApoE.....	73
Abbildung 38: Aufnahme von NBD-Cholesterin aus CR/ApoE3*.....	74
Abbildung 39: Kolokalisation von NBD-Cholesterin und Filipin-Färbung.....	74
Abbildung 40: Aufnahme von CR/ApoE in LRP1-EGFP-Vesikel.....	75
Abbildung 41: Intravesikuläre Verteilung von ApoE und RAP.....	76
Abbildung 42: Recycling von ApoE aus LRP1-EGFP-Vesikeln.....	77
Abbildung 43: HDL-induziertes Recycling von ApoE aus LRP1-EGFP-Vesikeln.....	77
Abbildung 44: HDL-induziertes Recycling von ApoE und Cholesterin aus EEA1-positiven Vesikeln.....	78
Abbildung 45: HDL-induziertes Recycling von ApoE und Cholesterin.....	79
Abbildung 46: Klonierung von Zielsequenzen in pALsh.....	82
Abbildung 47: Funktionalität der von pALsh-Derivaten exprimierten shRNA.....	83
Abbildung 48: Differentielle RNA-Interferenz.....	84
Abbildung 49: Intrazellulärer Verlauf der LRP1-vermittelten Aufnahme von RAP und CR/ApoE.....	93
Abbildung 50: LRP1 im postprandialen Lipoproteinstoffwechsel der Leber.....	96

## Literaturverzeichnis

### Original- und Übersichtsarbeiten

- Anant S, Davidson NO, **Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing**, *Curr Opin Lipidol* 2001, *12*, 159-65
- von Arnim CVA, Kinoshita A, Peltan, ID, Tangredi MM, Herl L, Lee BM, Spoelgen R, Hshieh TT, Ranganathan S, Battey FD, Liu CX, Bacskai BJ, Sever S, Irizarry MC, Strickland DK, Hyman BT, **The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) Is a Novel  $\beta$ -Secretase (BACE1) Substrate**, *J Biol Chem* 2005, *280*, 17777-85
- Avramoglu RK, Nimpf J, McLeod RS, Ko KWS, Wang Y, FitzGerald D, Yao Z, **Functional Expression of the Chicken Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein in a Mutant Chinese Hamster Ovary Cell Line Restores Toxicity of *Pseudomonas* Exotoxin A and Degradation of  $\alpha_2$ -Macroglobulin**, *J Biol Chem* 1998, *273*, 6057-65
- Bacskai BJ, Xia MQ, Strickland DK, Rebeck GW, Hyman BT, **The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via *N*-methyl-D-aspartate receptors**, *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, *97*, 11551-6
- Baldino F Jr, Chesselet MF, Lewis ME, **High-Resolution *in Situ* Hybridization Histochemistry**, *Meth Enzymol* 1989, *168*, 761-77
- Bantounas I, Phylactou LA, Uney JB, **RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems**, *J Mol Endocrinol* 2004, *33*, 545-57
- Beffert U, Stolt PC, Herz J, **Functions of lipoprotein receptors in neurons**, *J Lipid Res* 2004, *45*, 403-9
- Beisiegel U, Schneider WJ, Brown MS, Goldstein JL, **Immunoblot Analysis of Low Density Lipoprotein Receptors in Fibroblasts from Subjects with Familial Hypercholesterolemia**, *J Biol Chem* 1982, *257*, 13150-6
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK, **The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein**, *Nature* 1989, *341*, 162-4
- Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G, **Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein**, *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, *88*, 8342-46
- Benhayon D, Magdaleno S, Curran T, **Binding of purified Reelin to ApoER2 and VLDLR mediates tyrosine phosphorylation of Disabled-1**, *Brain Res Mol Brain Res* 2003, *112*, 33-45
- Bergeron N, Havel RJ, **Prolonged postprandial responses of lipids and apolipoproteins in triglyceride-rich lipoproteins of individuals expressing an apolipoprotein epsilon 4 allele**, *J Clin Invest* 1996, *97*, 65-72
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ, **Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference**, *Nature* 2001, *409*, 363-6
- Bohnet K, Pillot T, Visvikis S, Sabolovic N, Siest G, **Apolipoprotein (apo) E genotype and apoE concentration determine binding of normal very low density lipoproteins to HepG2 cell surface receptors**, *J Lipid Res* 1996, *37*, 1316-24
- Boucher P, Ducluzeau PH, Davelu P, Andreelli F, Vallier P, Riou JP, Laville M, Vidal H, **Expression and regulation by insulin of low-density lipoprotein receptor-related protein mRNA in human skeletal muscle**, *Biochim Biophys Acta* 2002a, *1588*, 226-31
- Boucher P, Liu P, Gotthardt M, Hiesberger T, Anderson RGW, Herz J, **Platelet-derived Growth Factor Mediates Tyrosine Phosphorylation of the Cytoplasmic Domain of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) in Caveolae**, *J Biol Chem* 2002b, *277*, 15507-13

- Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J, **LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis**, *Science* 2003, *300*, 329-32
- Bowers B, Maser M, **Artifacts in fixation for transmission electron microscopy** in: Crang RFE, Klomparens KL (Hg.), **Artifacts in Biological Electron Microscopy**, New York: Plenum, 1988, 13-42
- Breslauer KJ, Frank R, Blöcker H, Marky LA, **Predicting DNA duplex stability from the base sequence**, *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, *83*, 3746-50
- Brown MS, Goldstein JL, **A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis**, *Science* 1986, *232*, 34-47
- Brown MS, Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, **The low-density-lipoprotein receptor-related protein: double agent or decoy?**, *Curr Opin Lipidol* 1991, *2*, 65-72
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R, **A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells**, *Science* 2002, *296*, 550-3
- Brunkan AL, Goate AM, **Presenilin function and gamma-secretase activity**, *J Neurochem* 2005, *93*, 769-92
- Bu G, Geuze HJ, Strous GJ, Schwartz AL, **39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein**, *EMBO J* 1995, *14*, 2269-80
- Choi SY, Cooper AD, **A Comparison of the Roles of the Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor and the LDL Receptor-related Protein/ $\alpha_2$ -Macroglobulin Receptor in Chylomicron Remnant Removal in the Mouse *in vivo***, *J Biol Chem* 1993, *268*, 15804-11
- Cohen AW, Combs TP, Scherer PE, Lisanti MP, **Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes**, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003, *285*, E1151-60
- Cooper JA, Howell BW, **Lipoprotein Receptors: Signaling Functions in the Brain?**, *Cell* 1999, *97*, 671-4
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA, **Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families**, *Science* 1993, *261*, 921-3
- Corvera S, Graver DF, Smith RM, **Insulin Increases the Cell Surface Concentration of  $\alpha_2$ -Macroglobulin Receptors in 3T3-L1 Adipocytes**, *J Biol Chem* 1989, *264*, 10133-8
- Czekay RP, Orlando RA, Woodward L, Lundstrom M, Farquhar MG, **Endocytic trafficking of megalin/RAP complexes: dissociation of the complexes in late endosomes**, *Mol Biol Cell* 1997, *8*, 517-32
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF, **Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis**, *Arteriosclerosis* 1988, *8*, 1-21
- Degryse B, Neels JG, Czekay RP, Aertgeerts K, Kamikubo Y, Loskutoff DJ, **The low density lipoprotein receptor-related protein is a motogenic receptor for plasminogen activator inhibitor-1**, *J Biol Chem* 2004, *279*, 22595-604
- Descamps O, Bilheimer D, Herz J, **Insulin Stimulates Receptor-mediated Uptake of ApoE-enriched Lipoproteins and Activated  $\alpha_2$ -Macroglobulin in Adipocytes**, *J Biol Chem* 1993, *268*, 974-81
- Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA, **Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression**, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, *4*, 457-67
- Eccles SA, Box GM, Court WJ, Bone EA, Thomas W, Brown PD, **Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94)**, *Canc Res* 1996, *56*, 2815-22



- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T, **RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs**, *Genes Dev* 2001, *15*, 188-200
- Emonard H, Bellon G, de Diesbach P, Mettlen M, Hornebeck W, Courtoy PJ, **Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) activity by the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP). A new function for an "old friend"**, *Biochim* 2005, *87*, 369-76
- Eto M, Watanabe K, Sato T, Makino I, **Apolipoprotein-E2 and hyperlipoproteinemia in noninsulin-dependent diabetes mellitus**, *J Clin Endocrinol Metab* 1989, *69*, 1207-12
- de Faria E, Fong LG, Komaromy M, Cooper AD, **Relative roles of the LDL receptor, the LDL receptor-like protein, and hepatic lipase in chylomicron remnant removal by the liver**, *J Lipid Res* 1996, *37*, 197-209
- Farkas MH, Swift LL, Hasty AH, Linton MF, Fazio S, **The recycling of apolipoprotein E in primary cultures of mouse hepatocytes. Evidence for a physiologic connection to high density lipoprotein metabolism**, *J Biol Chem* 2003, *278*, 9412-7
- Farkas MH, Weisgraber KH, Shepherd VL, Linton MF, Fazio S, Swift LL, **The recycling of apolipoprotein E and its amino-terminal 22 kDa fragment: evidence for multiple redundant pathways**, *J Lipid Res* 2004, *45*, 1546-54
- Fazio S, Linton MF, Hasty AH, Swift LL, **Recycling of apolipoprotein E in mouse liver**, *J Biol Chem* 1999, *274*, 8247-53
- Fazio S, Linton MF, Swift LL, **The cell biology and physiologic relevance of ApoE recycling**, *Trends Cardiovasc Med* 2000, *10*, 23-30
- Fortini ME, **Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling**, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, *3*, 673-84
- Freier SM, Kierzek R, Jaeger JA, Sugimoto N, Caruthers MH, Neilson T, Turner DH, **Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability**, *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, *83*, 9373-7
- Frolov A, Petrescu A, Atshaves BP, So PT, Gratton E, Serrero G, Schroeder F, **High density lipoprotein-mediated cholesterol uptake and targeting to lipid droplets in intact L-cell fibroblasts. A single- and multiphoton fluorescence approach**, *J Biol Chem* 2000, *275*, 12769-80
- Gandy S, **The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease**, *J Clin Invest* 2005, *115*, 1121-9
- Gauthier A, Vassiliou G, Benoist F, McPherson R, **Adipocyte low density lipoprotein receptor-related protein gene expression and function is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma**, *J Biol Chem* 2003, *278*, 11945-53
- Geiduschek EP, Tocchini-Valentini GP, **Transcription by RNA polymerase III**, *Annu Rev Biochem* 1988, *57*, 873-914
- Goretzki L, Mueller BM, **Receptor-mediated endocytosis of urokinase-type plasminogen activator is regulated by cAMP-dependent protein kinase**, *J Cell Sci* 1997, *110*, 1395-402
- Goretzki L, Mueller BM, **Low-density-lipoprotein-receptor-related protein (LRP) interacts with a GTP-binding protein**, *Biochem J* 1998, *336*, 381-6
- Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, Shelton J, Richardson JA, Stockinger W, Nimpf J, Herz J, **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**, *J Biol Chem* 2000, *275*, 25616-24
- Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Stark D, Wilson D, Brewer HB Jr, **Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans**, *J Clin Invest* 1986, *78*, 815-21

- Hagpassand M, Bourassa PA, Francone OL, Aiello RJ, **Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels**, *J Clin Invest* 2001, *108*, 1315-20
- Havel RJ, Kane JP, **Introduction: Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins** in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Hg.), **The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease**, 8. Aufl., New York: McGraw-Hill, 2001, 2705-16
- Heeren J, Weber W, Beisiegel U, **Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation**, *J Cell Sci* 1999, *112*, 349-59
- Heeren J, Beisiegel U, **Intracellular metabolism of triglyceride-rich lipoproteins**, *Curr Opin Lipidol* 2001, *12*, 255-60
- Heeren J, Grewal T, Jackle S, Beisiegel U, **Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo**, *J Biol Chem* 2001, *276*, 42333-8
- Heeren J, Niemeier A, Merkel M, Beisiegel U, **Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo**, *J Mol Med* 2002, *80*, 576-84
- Heeren J, Grewal T, Laatsch A, Rottke D, Rinninger F, Enrich C, Beisiegel U, **Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization**, *J Biol Chem* 2003, *278*, 14370-8
- Heeren J, Grewal T, Laatsch A, Becker N, Rinninger F, Rye KA, Beisiegel U, **Impaired recycling of apolipoprotein E4 is associated with intracellular cholesterol accumulation**, *J Biol Chem* 2004, *279*, 55483-92
- Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK, **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**, *EMBO J* 1988, *7*, 4119-27
- Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, Brown MS, **Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment**, *EMBO J* 1990, *9*, 1769-76
- Herz J, Clouthier DE, Hammer RE, **LDL Receptor-Related Protein Internalizes and Degrades uPA-PAI-1 Complexes and Is Essential for Embryo Implantation**, *Cell* 1992, *71*, 411-21 und **Erratum**, *Cell* 1993, *73*, 428
- Herz J, Qiu SQ, Oesterle A, DeSilva HV, Shafi S, Havel RJ, **Initial hepatic removal of chylomicron remnants is unaffected but endocytosis is delayed in mice lacking the low density lipoprotein receptor**, *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, *92*, 4611-5
- Herz J, Strickland DK, **LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor**, *J Clin Invest* 2001, *108*, 779-84
- Herz J, Hui DY, **Lipoprotein receptors in the vascular wall**, *Curr Opin Lipidol* 2004, *15*, 175-81
- Hodits RA, Nimpf J, Pfistermueller DM, Hiesberger T, Schneider WJ, Vaughan TJ, Johnson KS, Haumer M, Kuechler E, Winter G, Blaas D, **An Antibody Fragment from a Phage Display Library Competes for Ligand Binding to the Low Density Lipoprotein Receptor Family and Inhibits Rhinovirus Infection**, *J Biol Chem* 1995, *270*, 24078-85
- Hofer F, Gruenberger M, Kowalski H, Machat H, Huettinger M, Kuechler E, Blaas D, **Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus**, *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, *91*, 1839-42
- van't Hooft F, Havel RJ, **Metabolism of chromatographically separated rat serum lipoproteins specifically labeled with 125I-apolipoprotein E**, *J Biol Chem* 1981, *256*, 3963-8
- Hussain MM, Maxfield FR, Mas-Oliva J, Tabas I, Ji ZS, Innerarity TL, Mahley RW, **Clearance of Chylomicron Remnants by the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein/ $\alpha_2$ -Macroglobulin Receptor**, *J Biol Chem* 1991, *266*, 13936-40

- Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A, **The Mammalian Low-Density Lipoprotein Receptor Family**, *Annu Rev Nutr* 1999, *19*, 141-72
- Hutvagner G, Zamore PD, **A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex**, *Science* 2002, *297*, 2056-60
- Imaizumi K, Fainaru M, Havel RJ, **Composition of proteins of mesenteric lymph chylomicrons in the rat and alterations produced upon exposure of chylomicrons to blood serum and serum proteins**, *J Lipid Res* 1978, *19*, 712-22
- Ishigami M, Swertfeger DK, Granholm NA, Hui DY, **Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase**, *J Biol Chem* 1998, *273*, 20156-61
- Jäckle S, Huber C, Moestrup S, Gliemann J, Beisiegel U, **In vivo removal of  $\beta$ -VLDL, chylomicron remnants, and  $\alpha_2$ -macroglobulin in the rat**, *J Lipid Res* 1993, *34*, 309-15
- Ji ZS, Fazio S, Mahley RW, **Variable heparan sulfate proteoglycan binding of apolipoprotein E variants may modulate the expression of type III hyperlipoproteinemia**, *J Biol Chem* 1994, *269*, 13421-8
- Jones DP, Plotkin GR, Arky RA, **Lipoprotein lipase activity in patients with diabetes mellitus, with and without hyperlipemia**, *Diabetes* 1966, *15*, 565-70
- Kancha RK, Stearns ME, Hussain MM, **Decreased expression of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in invasive cell clones derived from human prostate and breast tumor cells**, *Oncol Res* 1994, *6*, 365-72
- Karpe F, **Chylomicron and VLDL Triglyceride Metabolism after Sequential Meals: a Study Using Stable Isotope and Immunoaffinity Techniques in Humans**, *European Lipoprotein Club, 28<sup>th</sup> Annual Meeting* 2005
- van Kerkhof P, Lee J, McCormick L, Tetrault E, Lu W, Schoenfish M, Oorschot V, Strous GJ, Klumperman J, Bu G, **Sorting nexin 17 facilitates LRP recycling in the early endosome**, *EMBO J* 2005, *24*, 2851-61
- Kinoshita A, Shah T, Tangredi MM, Strickland DK, Hyman BT, **The Intracellular Domain of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Modulates Transactivation Mediated by Amyloid Precursor Protein and Fe65**, *J Biol Chem* 2003, *278*, 41182-8
- Kirchhausen T, **Clathrin**, *Annu Rev Biochem* 2000, *69*, 699-727
- Knouff C, Hinsdale ME, Mezdour H, Altenburg MK, Watanabe M, Quarfordt SH, Sullivan PM, Maeda N, **Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice**, *J Clin Invest* 1999, *103*, 1579-86
- Ko KWS, McLeod RS, Avramoglu RK, Nimpf J, FitzGerald DJ, Vukmirica J, Yao Z, **Mutation at the Processing Site of Chicken Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Impairs Efficient Endoplasmic Reticulum Exit, but Poteolytic Cleavage Is Not Essential for Its Endocytic Functions**, *J Biol Chem* 1998, *273*, 27779-85
- Kounnas MZ, Argraves WS, Strickland DK, **The 39-kDa receptor-associated protein interacts with two members of the low density lipoprotein receptor family, alpha 2-macroglobulin receptor and glycoprotein 330**, *J Biol Chem* 1992, *267*, 21162-6
- Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Esser V, Brown MS, **Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins**, *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, *86*, 5810-4
- Kristensen T, Moestrup SK, Gliemann J, Bendtsen L, Sand O, Sottrup-Jensen L, **Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor**, *FEBS Lett* 1990, *276*, 151-5

- Laatsch A, Ragozin S, Grewal T, Beisiegel U, Heeren J, **Differential RNA interference: replacement of endogenous with recombinant low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)**, *Eur J Cell Biol* 2004, *83*, 113-20
- Li Y, van Kerkhof P, Marzolo MP, Strous GJ, Bu G, **Identification of a major cyclic AMP-dependent protein kinase A phosphorylation site within the cytoplasmic tail of the low-density lipoprotein receptor-related protein: implication for receptor-mediated endocytosis**, *Mol Cell Biol* 2001, *21*, 1185-95
- Liu Y, Jones M, Hingtgen CM, Bu G, Larabee N, Tanzi RE, Moir RD, Nath A, He JJ, **Uptake of HIV-1 Tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands**, *Nat Med* 2000, *6*, 1380-6
- Lleó A, Waldron E, von Arnim CA, Herl L, Tangredi MM, Peltan ID, Strickland DK, Koo EH, Hyman BT, Pietrzik CU, Berezovska O, **Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) interacts with presenilin 1 and is a competitive substrate of the amyloid precursor protein (APP) for gamma-secretase**, *J Biol Chem* 2005, *280*, 27303-9
- Llorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L, **LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells**, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, *20*, 1572-9
- Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, Gorlatova N, Migliorini MM, Loukinov D, Ulery PG, Mikhailenko I, Lawrence DA, Strickland DK, **Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-induced Tyrosine Phosphorylation of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP)**, *J Biol Chem* 2002, *277*, 15499-506
- Lundgren S, Carling T, Hjalm G, Juhlin C, Rastad J, Pihlgren U, Rask L, Akerstrom G, Hellman P, **Tissue distribution of human gp330/megalin, a putative Ca(2+)-sensing protein**, *J Histochem Cytochem* 1997, *45*, 383-92
- Mahley RW, Ji ZS, **Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E**, *J Lipid Res* 1999, *40*, 1-16
- Mahley RW, Huang Y, Rall SC Jr, **Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes**, *J Lipid Res* 1999, *40*, 1933-49
- Manche L, Green SR, Schmedt C, Mathews MB, **Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI**, *Mol Cell Biol* 1992, *12*, 5238-48
- Mattick JS, Makunin IV, **Small regulatory RNAs in mammals**, *Hum Mol Genet* 2005, *14*, 121-32
- May P, Reddy YK, Herz J, **Proteolytic Processing of LRP Mediates Regulated Release of Its Intracellular Domain**, *J Biol Chem* 2002, *277*, 18736-43
- May P, Bock HH, Nimpf J, Herz J, **Differential glycosylation regulates processing of lipoprotein receptors by gamma-secretase**, *J Biol Chem* 2003, *278*, 37386-92
- May P, Herz J, **LDL receptor-related proteins in neurodevelopment**, *Traffic* 2003, *4*, 291-301
- May P, Rohlmann A, Bock HH, Zurhove K, Marth JD, Schomburg ED, Noebels JL, Beffert U, Sweatt JD, Weeber EJ, Herz J, **Neuronal LRP1 Functionally Associates with Postsynaptic Proteins and Is Required for Normal Motor Function in Mice**, *Mol Cell Biol* 2004, *24*, 8872-83
- Meister G, Tuschl T, **Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA**, *Nature* 2004, *431*, 343-9
- Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, Laatsch A, Heeren J, **Apolipoprotein AV Accelerates Plasma Hydrolysis of Triglyceride-rich Lipoproteins by Interaction with Proteoglycan-bound Lipoprotein Lipase**, *J Biol Chem* 2005, *280*, 21553-60

- Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EP, Toh BH, **EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif**, *J Biol Chem* 1995, *270*, 13503-11
- Mülhardt C, **Der Experimentator: Molekularbiologie**, 2. Aufl., Heidelberg: Spektrum, 2000
- Myklebost O, Arheden K, Rogne S, Geurts van Kessel A, Mandahl N, Herz J, Stanley K, Heim S, Mitelman F, **The gene for the human putative apoE receptor is on chromosome 12 in the segment q13-14**, *Genomics* 1989, *5*, 65-9
- Myslinski E, Ame JC, Krol A, Carbon P, **An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene**, *Nucleic Acids Res* 2001, *29*, 2502-9
- Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J, **Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium**, *Cancer Res* 1982, *42*, 3858-63
- Neels JG, van den Berg BMM, Lookene A, Olivecrona G, Pannekoek H, van Zonneveld AJ, **The Second and Fourth Cluster of Class A Cysteine-rich Repeats of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Share Ligand-binding Properties**, *J Biol Chem* 1999, *274*, 31305-11
- Newton CS, Loukinova E, Mikhailenko I, Ranganathan Sgao Y, Haudenschild C, Strickland DK, **Platelet-derived Growth Factor Receptor- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) Activation Promotes Its Association with the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP)**, *J Biol Chem* 2005, *280*, 27872-8
- Obermoeller-McCormick LM, Li Y, Osaka H, FitzGerald DJ, Schwartz AL, Bu G, **Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein**, *J Cell Sci* 2001, *114*, 899-908
- Ossowski L, Reich E, **Antibodies to Plasminogen Activator Inhibit Human Tumor Metastasis**, *Cell* 1983, *35*, 611-9
- Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM, **An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing**, *Science* 2001, *294*, 169-73
- Pitas RE, Innerarity TL, Weinstein JN, Mahley RW, **Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblasts from macrophages in vitro by fluorescence microscopy**, *Atherosclerosis* 1981, *1*, 177-85
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL, **Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells**, *Cell* 1992, *71*, 343-53
- Qiu S, Bergeron N, Kotite L, Krauss RM, Bensadoun A, Havel RJ, **Metabolism of lipoproteins containing apolipoprotein B in hepatic lipase-deficient mice**, *J Lipid Res* 1998, *39*, 1661-8
- Qiu Z, Strickland DK, Hyman BT, Rebeck GW,  **$\alpha_2$ -Macroglobulin Exposure Reduces Calcium Responses to *N*-Methyl-D-Aspartate via Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein in Cultured Hippocampal Neurons**, *J Biol Chem* 2002, *277*, 14458-66
- Qiu Z, Hyman BT, Rebeck GW, **Apolipoprotein E Receptors Mediate Neurite Outgrowth through Activation of p44/42 Mitogen-activated Protein Kinase in Primary Neurons**, *J Biol Chem* 2004, *279*, 34948-56
- Ragozin S, Niemeier A, Laatsch A, Loeffler B, Merkel M, Beisiegel U, Heeren J, **Knockdown of Hepatic ABCA1 by RNA Interference Decreases Plasma HDL Cholesterol Levels and Influences Postprandial Lipemia in Mice**, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, *25*, 1433-8
- Rensen PC, Jong MC, van Vark LC, van der Boom H, Hendriks WL, van Berkel TJ, Biessen EA, Havekes LM, **Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis**, *J Biol Chem* 2000, *275*, 8564-71

- Repa JJ, Mangelsdorf DJ, **Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism**, *Curr Opin Biotechnol* 1999, *10*, 557-63
- Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, Degtyarev SK, Dryden DTF, Dybvig K, Firman K, Gromova ES, Gumpert RI, Halford SE, Hattman S, Heitman J, Hornby DP, Janulaitis A, Jeltsch A, Josephsen J, Kiss A, Klaenhammer TR, Kobayashi I, Kong H, Krüger DH, Lacks S, Marinus MG, Miyahara M, Morgan RD, Murray NE, Nagaraja V, Piekarowicz A, Pingoud A, Raleigh E, Rao DN, Reich N, Repin VE, Selker EU, Shaw PC, Stein DC, Stoddard BL, Szybalski W, Trautner TA, Van Etten JL, Vitor JMB, Wilson GG, Xu SY, **A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes**, *Nucl Acid Res* 2003, *31*, 1805-12
- Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J, **Inducible Inactivation of Hepatic LRP Gene by Cre-mediated Recombination Confirms Role of LRP in Clearance of Chylomicron Remnants**, *J Clin Invest* 1998, *101*, 689-95
- Rozanov DV, Hahn-Dantona E, Strickland DK, Strongin AY, **The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein LRP Is Regulated by Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) Proteolysis in Malignant Cells**, *J Biol Chem* 2004, *279*, 4260-8
- Ruiz J, Kouivaskaia D, Migliorini M, Robinson S, Saenko EL, Gorlatova N, Li D, Lawrence D, Hyman BT, Weisgraber KH, Strickland DK, **The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor**, *J Lipid Res* 2005, *46*, 1721-31
- Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE, **Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro***, *Nucl Acids Res* 1990, *18*, 6409-12 und **Erratum**, *Nucl Acids Res* 1991, *19*, 698
- Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, Sargiacomo M, Mastick CC, Lodish HF, **Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles**, *J Cell Biol* 1994, *127*, 1233-43
- Schneider WJ, Kovanen PT, Brown MS, Goldstein JL, Utermann G, Weber W, Havel RJ, Kotite L, Kane JP, Innerarity TL, Mahley RW, **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**, *J Clin Invest* 1981, *68*, 1075-85
- Schneider WJ, Nimpf J, **LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signaling**, *Cell Mol Life Sci* 2003, *60*, 892-903
- Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N, **Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins**, *J Lipid Res* 2001, *42*, 1346-67
- Sen GC, Sarkar SN, **Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3**, *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, *16*, 1-14
- Shafi S, Brady SE, Bensadoun A, Havel RJ, **Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in rat liver**, *J Lipid Res* 1994, *35*, 709-20
- Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG, Kassem M, **Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells**, *Nat Biotechnol* 2002, *20*, 592-6
- Spooner PM, Chernick SS, Garrison MM, Scow RO, **Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. Separation and dependence of hormonal effects on hexose metabolism and synthesis of RNA and protein**, *J Biol Chem* 1979, *254*, 10021-9
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD, **How cells respond to interferons**, *Annu Rev Biochem* 1998, *67*, 227-64
- Stockinger W, Sailer B, Strasser V, Recheis B, Fasching D, Kahr L, Schneider WJ, Nimpf J, **The PX-domain protein SNX17 interacts with members of the LDL receptor family and modulates endocytosis of the LDL receptor**, *EMBO J* 2002, *21*, 4259-67

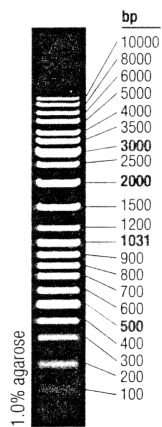
- Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS, **Sequence Identity between the  $\alpha_2$ -Macroglobulin Receptor and Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Suggests That This Molecule Is a Multifunctional Receptor**, *J Biol Chem* 1990, *265*, 17401-4
- Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Battey F, Behre E, McTigue K, Battey JF, Argraves WS, **Primary Structure of  $\alpha_2$ -Macroglobulin Receptor-associated Protein**, *J Biol Chem* 1991, *266*, 13364-9
- Swertfeger DK, Bu G, Hui DY, **Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E inhibition of smooth muscle cell migration**, *J Biol Chem* 2002, *277*, 4141-6
- Swift LL, Farkas MH, Major AS, Valyi-Nagy K, Linton MF, Fazio S, **A recycling pathway for resecretion of internalized apolipoprotein E in liver cells**, *J Biol Chem* 2001, *276*, 22965-70
- Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB, Wagner BL, Walczak R, Laffitte BA, Daige CL, Thomas D, Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Wang X, Lusis AJ, Tontonoz P, Schulman IG, **Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis**, *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, *99*, 11896-901
- Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J, **Interaction of Cytosolic Adaptor Proteins with Neuronal Apolipoprotein E Receptors and the Amyloid Precursor Protein**, *J Biol Chem* 1998, *273*, 33556-60
- Tuschl T, **Expanding small RNA interference**, *Nat Biotechnol* 2002, *20*, 446-8
- van Uden E, Carlson G, George-Hylop PS, Westaway D, Orlando R, Mallory M, Rockenstein E, Masliah E, **Aberrant Presenilin-1 Expression Downregulates LDL Receptor-Related Protein (LRP): Is LRP Central to Alzheimer's Disease Pathogenesis?**, *Mol Cell Neurosci* 1999, *14*, 129-40
- Ulery PG, Beers J, Mikhailenko I, Tanzi RI, Rebeck GW, Hyman BT, Strickland DK, **Modulation of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Processing by the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP)**, *J Biol Chem* 2000, *275*, 7410-5
- Utermann G, Hees M, Steinmetz A, **Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man**, *Nature* 1977, *269*, 604-7
- Veniant MM, Zlot CH, Walzem RL, Pierotti V, Driscoll R, Dichek D, Herz J, Young SG, **Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice**, *J Clin Invest* 1998, *102*, 1559-68
- Vergés M, Bensadoun A, Herz J, Belcher JD, Havel RJ, **Endocytosis of Hepatic Lipase and Lipoprotein Lipase into Rat Liver Hepatocytes *in Vivo* Is Mediated by the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein**, *J Biol Chem* 2004, *279*, 9030-6
- van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, Chamuleau RA, **Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration**, *J Biol Chem* 2001, *276*, 44512-20
- Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW, **Human E Apoprotein Heterogeneity**, *J Biol Chem* 1981, *256*, 9077-83
- Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW, **Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site**, *J Biol Chem* 1982, *257*, 2518-21
- Weisgraber KH, **Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112**, *J Lipid Res* 1990, *31*, 1503-11
- Wetmur JG, **DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization**, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1991, *26*, 227-59
- Wijnberg MJ, Quax PH, Nieuwenbroek NM, Verheijen JH, **The migration of human smooth muscle cells *in vitro* is mediated by plasminogen activation and can be inhibited by alpha2-macroglobulin receptor associated protein**, *Thromb Haemost* 1997, *78*, 880-6

- Williams CM, **Dietary interventions affecting chylomicron and chylomicron remnant clearance**, *Atherosclerosis* 1998, *141*, S87-92
- Williams SE, Ashcom JD, Argraves WS, Strickland DK, **A Novel Mechanism for Controlling the Activity of  $\alpha_2$ -Macroglobulin Receptor/Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein**, *J Biol Chem* 1992, *267*, 9035-40
- Willnow TE, Herz J, **Genetic deficiency in low density lipoprotein receptor-related protein confers cellular resistance to *Pseudomonas* exotoxin A**, *J Cell Sci* 1994, *107*, 719-26
- Willnow TE, Orth K, Herz J, **Molecular Dissection of Ligand Binding Sites on the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein**, *J Biol Chem* 1994a, *269*, 15827-32
- Willnow TE, Sheng Z, Ishibashi S, Herz J, **Inhibition of Hepatic Chylomicron Remnant Uptake by Gene Transfer of a Receptor Antagonist**, *Science* 1994b, *264*, 1471-4
- Willnow TE, Armstrong SA, Hammer RE, Herz J, **Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein *in vivo***, *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, *92*, 4537-41
- Willnow TE, Moehring JM, Inocencio NM, Moehring TJ, Herz J, **The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin *in vivo* and *in vitro***, *Biochem J* 1996a, *313*, 71-6
- Willnow TE, Rohlmann A, Horton J, Otani H, Braun JR, Hammer RE, Herz J, **RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors**, *EMBO J* 1996b, *15*, 2632-9
- Willnow TE, Nykjaer A, Herz J, **Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins**, *Nat Cell Biol* 1999, *1*, E157-62
- Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY, **Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells**, *Science* 2002, *296*, 913-6
- Zannis VI, Breslow JL, **Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification**, *Biochemistry* 1981, *20*, 1033-41
- Zerbinatti CV, Bu G, **LRP and Alzheimer's disease**, *Rev Neurosci* 2005, *16*, 123-5
- Zhang H, Links PH, Ngsee JK, Tran K, Cui Z, Ko KWS, Yao Z, **Localization of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 to Caveolae in 3T3-L1 Adipocytes in Response to Insulin Treatment**, *J Biol Chem* 2004, *279*, 2221-30
- Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY, **Creating new fluorescent probes for cell biology**, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, *3*, 906-18
- Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N, **Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E**, *Science* 1992, *258*, 468-71
- Zhu Y, Hui DY, **Apolipoprotein E binding to low density lipoprotein receptor-related protein-1 inhibits cell migration via activation of cAMP-dependent protein kinase A**, *J Biol Chem* 2003, *278*, 36257-63
- Zhuo M, Holtzman DM, Li Y, Osaka H, DeMaro J, Jacquin M, Bu G, **Role of Tissue Plasminogen Activator Receptor LRP in Hippocampal Long-Term Potentiation**, *J Neurosci* 2000, *20*, 542-9



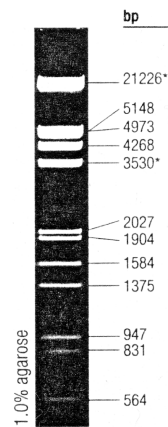
## Anhang

### Verwendete DNA-Marker (MBI Fermentas):



**GeneRuler™ DNA Ladder Mix**  
100 ng· $\mu$ L<sup>-1</sup>, #SM0333

Abbildungen von MBI Fermentas, Produktdatenblatt.



**Lambda DNA/*EcoRI*+ *HindIII* Marker, 3**  
100 ng· $\mu$ L<sup>-1</sup>, #SM0193

\*: können ein 24756-bp-Fragment bilden

### Plasmidübersicht (Position wichtiger Schnittstellen und Merkmale):

#### **pALac01**, 5644 bp:

Bsu36I: 4973

HindIII: 5006

NotI: 4089

PpuMI: 4989

subkloniertes 3'-LRP1-Fragment: 4130-5005, SV40-PolyA: 5049-5269

AmpR, Gentr

#### **pALac01**, 3903 bp:

BamHI: 263

NdeI: 1714

NsiI: schneidet nicht

SallI: 251, 1143

SmaI: 866

SpeI: schneidet nicht

subklonierter LRP1-ORF: 1715-268

AmpR

#### **pALac02**, 3904 bp:

BamHI: 263

NdeI: 1715

NsiI: schneidet nicht

SallI: 251, 1144

SmaI: 546, 867

SpeI: 919

subklonierter LRP1-ORF: 1716-268

AmpR

**pALae03**, 6121 bp:

BamHI: 2217, 6121

NdeI: 4669

NsiI: 1257

Sall: 2229, 5240

SmaI: 5517, 5838

SpeI: 2032, 5465

verlängerter, subklonierter LRP1-ORF: 4673-2217

AmpR

**pALaf03**, 6378 bp:

Bsu36I: 6361

HindIII: 750

NotI: 5477

PpuMI: 6377

subklonierter LRP1-ORF ohne Stopcodon: 5518-6378, EGFP-Leserahmen: 16-735, SV40-PolyA: 793-1013

AmpR, GentR

**pALag04**, 3215 bp:

AvaI: 2899, 3195

BseRI: schneidet nicht

H1-Promotor: 2917-3131, Hairpin-Sequenz s. S. 28

AmpR

**pALag05**, 3211 bp:

AvaI: 2899, 3191

BseRI: schneidet nicht

H1-Promotor: 2917-3131, Hairpin-Sequenz s. S. 28

AmpR

**pALsh** (pALag01), 3185 bp:

AvaI: 2899, 3165

BglII: schneidet nicht

BseRI: 3142, 3148C

Sall: schneidet nicht

H1-Promotor: 2917-3131

AmpR

**pEGFP-N1** (Clontech, 6085-1, GenBank U55762), 4733 bp:

BamHI: 660

BglII: 609

CMV-Promotor: 1-589, MCS: 591-671, EGFP-ORF: 679-1398

ALaf01: 4727-18, ALae05: 589-570, ALaf03: 673-690, ALaf04: 1406-1389

KanR

**pFB-cmv2LRP** (pALae07), 18978 bp:

BamHI: 2242, 4459, 4473, 5995, 18583

Bsu36I: 13880

HindIII: 12470, 13913

NdeI: 790, 18892

NotI: 18640

XhoI: 272

CMV-Promotor: 18661-271, LRP1-ORF: 278-13912, SV40-PolyA: 13956-14176

AmpR, GentR

**pFB-cmvLRPwt** (pALae05), 18750 bp:

BamHI: 2242, 4459, 4473, 5995, 18583

NdeI: 790

NotI: 18640

NsiI: 3499

SmaI: 1638, 1959, 4464, 6306, 10202, 10680

SpeI: 1586, 4274, 18633

XhoI: 272

verkürzter CMV-Promotor: 18642-203, LRP1-ORF: 278-13912, SV40-PolyA: 13956-14176

AmpR, GentR

**pFB-LRP** (pALac03), 19029 bp:

BamHI: 2241, 4458, 4472, 5994, 18582

NdeI: 790

NsiI: 3498

SmaI: 1638, 4463, 6305, 10201, 10679

SpeI: 4273, 18632

polh-Promotor: 18433-18491, verkürzter CMV-Promotor: 18642-18953, LRP1-5'-UTR-Bereich: 1-277,

defekter LRP1-ORF: 278-13911, SV40-PolyA: 13955-14175

AmpR, GentR

**pFB-LRP-EGFP** (pALaf04), 19712 bp:

BamHI: 2242, 4459, 4473, 5995, 19317

Bsu36I: 13880

HindIII: 12470, 14647

NotI: 19374

CMV-Promotor: 19395-271, Transkriptionsstart: 264, LRP1-EGFP-ORF: 278-14632, SV40-PolyA: 14690-14910

ALai01: 14647-14678, ALac07: 14747-14728

AmpR, GentR

**pFB-LRPwt** (pALae04), 19030 bp:

BamHI: 2242, 4459, 4473, 5995, 18583

NdeI: 790

NsiI: 3499

SmaI: 1638, 1959, 4464, 6306, 10202, 10680

SpeI: 1586, 4274, 18633

polh-Promotor: 18433-18491, verkürzter CMV-Promotor: 18642-18953, LRP1-5'-UTR-Bereich: 1-277,

LRP1-ORF: 278-13912, SV40-PolyA: 13956-14176

AmpR, GentR

**pFB-polhLRPwt** (pALae06), 18653 bp:

BamHI: 2242, 4459, 4473, 5995, 18583

NdeI: 790

NsiI: 3499

SmaI: 1638, 1959, 4464, 6306, 10202, 10680

SpeI: 1586, 4274, 18633

polh-Promotor: 18433-18491, LRP1-5'-UTR-Bereich: 1-277, LRP1-ORF: 278-13912, SV40-PolyA: 13956-14176,

Tn7L: 14192-14342, Tn7R: 17261-17101, GenR: 18301-17261

AmpR, GentR

**pSUPER** (Brummelkamp et al. 2002), 3179 bp:

BglII: 3132

Sall: 3153

H1-Promotor: 2917-3131

AmpR

**pUC19** (GenBank L09137), 2686 bp:

HindIII: 233

EcoRI: 284

lacZ: 216-447, MCS: 233-284

AmpR

## Publikationen und Auszeichnungen

Aus dieser Promotionsarbeit sind bisher folgende Publikationen hervorgegangen:

Heeren J, Grewal T, Laatsch A, Rottke D, Rinninger F, Enrich C, Beisiegel U, **Recycling of Apoprotein E Is Associated with Cholesterol Efflux and High Density Lipoprotein Internalization**, J Biol Chem 2003, *278*, 14370-8

Heeren J, Grewal T, Laatsch A, Becker N, Rinninger F, Rye KA, Beisiegel U, **Impaired Recycling of Apolipoprotein E4 Is Associated with Intracellular Cholesterol Accumulation**, J Biol Chem 2004, *279*, 55483-92

Laatsch A, Ragozin S, Grewal T, Beisiegel U, Heeren J, **Differential RNA interference: replacement of endogenous with recombinant low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)**, Eur J Cell Biol 2004, *83*, 113-20

Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, Laatsch A, Heeren J, **Apolipoprotein AV Accelerates Plasma Hydrolysis of Triglyceride-rich Lipoproteins by Interaction with Proteoglycan-bound Lipoprotein Lipase**, J Biol Chem 2005, *280*, 21553-60

Ragozin S, Niemeier A, Laatsch A, Loeffler B, Merkel M, Beisiegel U, Heeren J, **Knockdown of Hepatic ABCA1 by RNA Interference Decreases Plasma HDL Cholesterol Levels and Influences Postprandial Lipemia in Mice**, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005, *25*, 1433-8

Teile dieser Promotionsarbeit wurden mit folgenden Preisen ausgezeichnet:

**Young Investigator Award 2004** der European Atherosclerosis Society für *ApoE recycling is preceded by storage in large LRP-positive vesicles*, verliehen am 19. April 2004 in Sevilla

**Young Investigator Award 2005** der European Atherosclerosis Society für *The Influence of Insulin on the Postprandial Metabolism of Apolipoprotein E*, verliehen am 25. April 2005 in Prag

Für ihre in jeder Hinsicht großartige Unterstützung während meiner Arbeit danke ich

*Ulrike Beisiegel und Jörg Heeren*

sowie allen Mitgliedern des Arbeitskreises. Ohne sie, die nette Atmosphäre, die vielen Diskussionen und unzähligen kleinen Dinge am Rande wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Mein spezieller Dank gilt *Sergei Ragozin* für viele, viele gemeinsam im Labor verbrachte Stunden, die mich in vielerlei Hinsicht bereichert haben.

Ebenso geht mein Dank an die *Studienstiftung des deutschen Volkes* und dort insbesondere an *Jörgen Hopf* und *Angelika Wittek* sowie *Hartwig Altenmüller*. Der stets verlässliche Kontakt und ihre vertrauensvolle Unterstützung haben mir sehr geholfen.