

Zentrum für Innere Medizin  
III.Medizinische Klinik und Poliklinik  
Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

# **Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Bindungsverhalten von Remnants großer und kleiner Chylomikronen am LDL-Rezeptor der Ratte in vitro**

DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von

**Peter Kruse**  
Barmstedt

Hamburg 2006

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 5.2.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: der Vorsitzende : Prof. Dr. E.Windler

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. F.U. Beil

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. F.Rinninger

**Für meinen Großvater Fritz Baiersdorfer**

# Inhaltverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>1.1</b>	<b>Lipoproteinstoffwechsel</b>	1
1.1.1	Verdauung und Resorption von Nahrungsfetten	1
1.1.2	Aufbau und Charakterisierung großer und kleiner Chylomikronen	1
1.1.3	Umwandlung von Chylomikronen zu Remnants	3
<b>1.2</b>	<b>Rezeptorvermittelte Endozytose</b>	4
1.2.1	Bindung der Lipoproteine an Membranen	4
1.2.2	Weiterer intrazellulärer Transport und Katabolismus aufgenommener Liganden	5
<b>1.3</b>	<b>Lipoproteinrezeptoren</b>	7
1.3.1	LDL-Rezeptoren	7
1.3.2	LDL-Receptor related Protein und Receptor Associated Protein	7
1.3.3	Scavenger-Rezeptoren	8
<b>1.4</b>	<b>Prä-und postprandialer Katabolismus der Remnants</b>	9
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung</b>	10
1.5.1	Existenz potentieller Bindungsstellen in der Leber für Remnants großer Chylomikronen	10

<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	11
2.1	<b>Versuchstiere</b>	11
2.2	<b>Materialien</b>	11
2.3	<b>Chemische Analysen</b>	12
2.3.1	Proteinbestimmung nach Lowry et al	12
2.3.2	Cholesterin	12
2.3.3	Cholesterin-Ester	13
2.3.4	Phospholipide	14
2.3.5	TCA-Fällung	15
2.4	<b>Elektrophorese</b>	16
2.4.1	Gelelektrophorese	16
2.4.2	Coomassie-Färbung	18
2.4.3	Silberfärbung	18
2.4.4	Ligandenblotting	19
2.5	<b>Präparation von Lipoproteinen</b>	20
2.5.1	LDL	20
2.5.2	Chylomikronen	20

2.5.3	Remnants	20
2.5.4	Ligandenmarkierung mit $^{125}\text{J}$	21
<b>2.6</b>	<b>Membranpräparationen</b>	21
2.6.1	Plasmamembranen	21
2.6.2	Endosomen	22
<b>2.7</b>	<b>Membranbindungsassays</b>	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	25
<b>3.1</b>	<b>Vergleich der Bindungskapazität <math>^{125}\text{J}</math> markierter Lipoproteine an Leberzellmembranen der Ratte in vitro</b>	25
3.1.1	Membranbindungsassays von Remnants großer und kleiner Chylomikronen an hepatozellulären Membranen von Lebern Ethinylöstradiol-vorbehandelter und nicht vorbehandelter Ratten	25
3.1.2	Affinität von Remnants großer und kleiner Chylomikronen zu endosomalen Membranen	28
3.1.3	Bindung von Remnants großer und kleiner Chylomikronen an den LDL-Rezeptor endosomaler Membranen der Rattenleber	29

<b>3.2</b>	<b>Einsatz von <math>^3\text{H}</math> Cholesterin-markierten Remnants an endosomalen Membranen der Rattenleber</b>	<b>33</b>
3.2.1	Membranbindungsassays mit $^3\text{H}$ Cholesterin-markierten Remnants an hepatozellulären Membranen von Lebern Ethinylöstradiol vorbehandelter Ratten und nicht vorbehandelter Ratten	33
3.2.2	Einfluss der LDL-Rezeptordichte auf die Bindung $^3\text{H}$ Cholesterin markierter Remnants an endosomalen Membranen	35
3.2.3	Einfluss der LDL-Rezeptordichte auf die Bindung $^3\text{H}$ Cholesterin markierter Remnants an Plasmamembranen	37
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>40</b>
4.1	Lipoproteinstoffwechsel der Remnants	40
4.2	Aktivität $^{125}\text{J}$ markierter Remnants großer und kleiner Chylomikronen zum vermuteten LDL-Rezeptor endosomaler Membranen	41
4.3	Vergleich der Bindungskapazität $^3\text{H}$ Cholesterin markierter Remnants großer und kleiner Chylomikronen an hepatozellulären Membranen	42
4.4	Schlussfolgerung	43
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>63</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Lipoproteinstoffwechsel

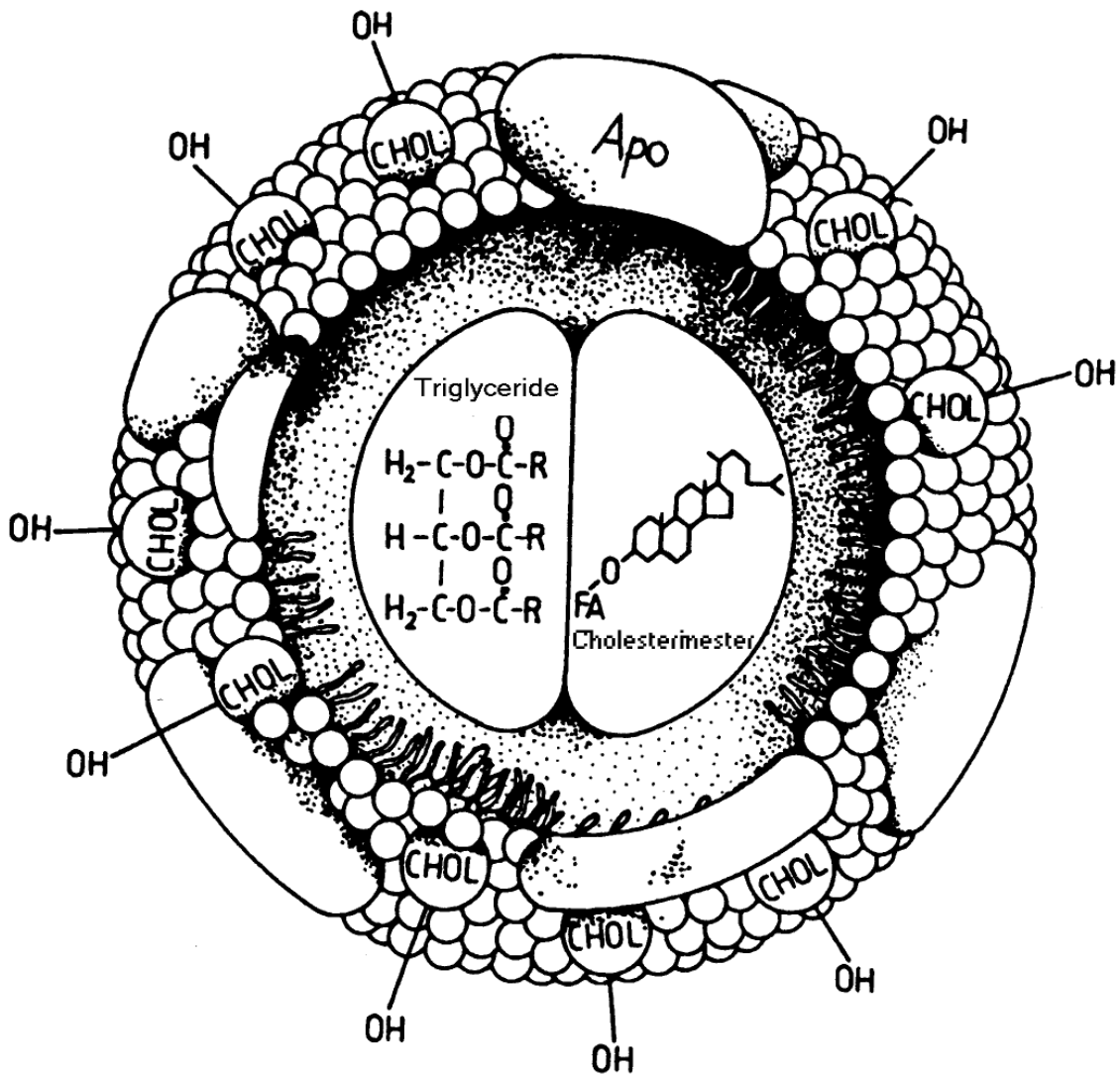
### 1.1.1 Verdauung und Resorption von Nahrungsfetten

Mit der Nahrung nimmt der Mensch sowohl pflanzliche, als auch tierische Fette zu sich. Den größten Teil nehmen, neben Phospholipiden und Cholesterin, die Triglyzeride ein. Das Pankreas sezerniert eine Triglyzeridlipase [1], die eine partielle Abspaltung der Fettsäuren bewirkt, so dass die Triglyzeride in freie Fettsäuren und Monoglyceride gespalten werden. Ebenfalls werden die in der Nahrung vorliegenden Cholesterinester in freies Cholesterin und Fettsäuren aufgetrennt. Monoglyceride werden direkt in die Darmmukosa [2] aufgenommen, langkettige Fettsäuren, Phospholipide und das nun freie Cholesterin werden unter Mithilfe der Gallensäuren resorbiert [4]. In der Mukosazelle erfolgt eine Resynthese der Triglyzeride, die zusammen mit den übrigen Lipiden zu sphärischen Partikeln, den sogenannten Chylomikronen, resynthetisiert werden [5]. Zunächst werden die resorbierten Fettsäuren und Monoglyceride im glatten endoplasmatischen Retikulum zu Triacylglyceriden wieder aufgebaut. Anschließend erfolgt im Golgi Apparat der Aufbau zu Chylomikronen, bevor dann im rauhen endoplasmatischen Retikulum der Einbau von Apolipoproteinen A-I, A-IV und B-48, erfolgt [6,12]. Diese Chylomikronen werden dann über die Lymphbahnen des Mesenteriums und den Ductus Thoracicus zum oberen Venenwinkel transportiert, wo sie in das Blutgefäßsystem gelangen [10].

### 1.1.2 Aufbau und Charakterisierung großer und kleiner Chylomikronen

Lipoproteine sind sphärische Partikel, in deren Kern sich überwiegend apolare Lipide (Triglyzeride und Cholesterinester) befinden, die Hülle besteht zum überwiegenden Teil aus Cholesterin und Phospholipiden [7]. Außerdem werden in die Hülle Proteine eingebaut, sogenannte Apolipoproteine [8], denen im Katabolismus der Lipoproteine zwei wichtige Funktionen zugeordnet werden. Einerseits erhöhen sie durch ihren polaren Charakter die Wasserlöslichkeit der Lipide, zum anderen spielen sie bei der Aufnahme durch die Leber eine wichtige Rolle [9,14-16].





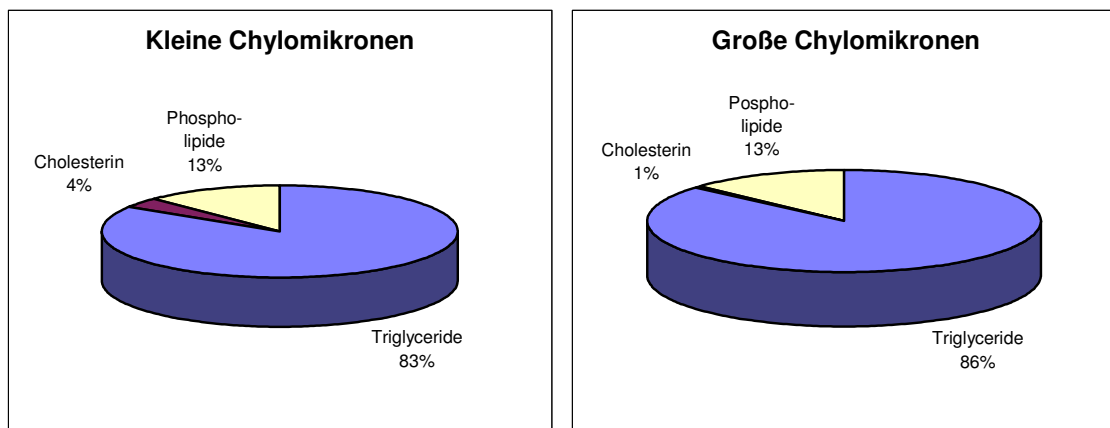
**Abbildung 1.1 Strukturmodell der Lipoproteine**

Ein hoher Gehalt an Apolipoprotein E steigert die Affinität zur Leberzelloberfläche, während Apolipoproteine der Klasse C inhibitorisch wirken. Die Anzahl der produzierten Partikel ändert sich kaum [19], vielmehr wird die Zusammensetzung und somit auch die Größe der Chylomikronen wesentlich durch die Menge der durch die Nahrung aufgenommenen Fette beeinflusst [11,13]. Bei besonders fettreicher Kost werden, im Gegensatz zum nüchternen Zustand, deutlich mehr Triglyzeride pro Partikel eingebaut. Die Menge des im Kern befindlichen Cholesterins bleibt weitgehend unverändert. Man kann also, in Abhängigkeit zur Ernährung, zwei Sorten von Chylomikronen unterscheiden. Kleine Chylomikronen, die im Nüchternzustand vom Darm synthetisiert werden und weniger Triglyzeride enthalten als große Chylomikronen, die nach einer fettreichen Mahlzeit gebildet werden und eine deutlich größere Abmessung aufweisen [17-19]. Neben dem Gehalt an Triglyzeriden, Phospholipiden und Cholesterin können die Lipoproteine auch durch die Zusammensetzung ihrer verschiedenen Apolipoproteine

charakterisiert und kategorisiert werden [20-22]. Eine vergleichende Übersicht hierüber spiegelt die Tabelle 1 wider.

Fraktion	Cholesterin	Phospholipide	Apolipoproteine	Triglyzeride	Cholesterin-Ester	Apolipoproteine
Chylomikronen	2%	7%	2%	86%	3%	A-I, A-IV, B-48
VLDL	7%	18%	8%	55%	12%	B-100, C-I-III, E
IDL	9%	19%	19%	23%	29%	B-100, C-III, E
LDL	8%	22%	22%	6%	42%	B-100
HDL2	5%	33%	40%	5%	17%	A-I, A-II, A-IV,
HDL3	4%	35%	55%	3%	13%	C-I-III, E

**Tabelle 1.1 Zusammensetzung diverser Lipoproteinfraktionen aufgrund der biochemischen Eigenschaften adaptiert nach Havel [20]**



**Abb 1.2 Zusammensetzung der Chylomikronen**

### 1.1.3 Umwandlung von Chylomikronen zu Remnants

Nach ihrer Sekretion in die Blutbahn nehmen die Chylomikronen die Apolipoproteine C und E auf. Die endothelständige Lipoproteinlipase spaltet unter Mithilfe des Apolipoproteins C-II als Cofaktor die Triglyzeride in freie Fettsäuren und Monoacylglyceride, die an Fettgewebe und Muskulatur abgegeben werden [24-27,29]. Ferner werden Phospholipide sowie die Apolipoproteine C-I, A-I, und A-IV auf HDL Moleküle übertragen [28]. Die Chylomikronen erfahren durch die stattfindende Lipolyse eine deutliche Größenreduktion auf 1/20 der Ausgangsgröße (initiale Größe: 75-120 nm). Die Affinität der hieraus entstandenen großen und kleinen Remnants zu den Lipoproteinrezeptoren ist deutlich stärker ausgeprägt als die der Chylomikronen [29,31]. Das liegt am Gehalt des Apolipoprotein E, das für die Aufnahme in die Leber erforderlich ist, während das

Apolipoprotein C inhibitorisch wirksam ist [23]. Windler et al. haben gezeigt, dass das Apolipoprotein E seine Wirkung in Anwesenheit des Apolipoprotein C nicht voll entfalten kann [111]. Speziell die Apolipoproteine C-III und C-I verhindern durch eine Verlegung der Bindungsstelle des Apolipoprotein-E eine vorzeitige Bindung der Remnants auf der Zelloberfläche [49-55].

## 1.2 Rezeptorvermittelte Endozytose

### 1.2.1 Bindung der Lipoproteine an Membranen

Während freie Fettsäuren und Monoacylglyceride hauptsächlich ins periphere Fettgewebe abgegeben werden [32,33], beschreiben die Remnants einen Weg in die Leber, in der sie nach erfolgter Endozytose in die Hepatozyten weiter verstoffwechselt werden [38]. Zum überwiegenden Teil wird die Aufnahme über den LDL Rezeptor sichergestellt [34-36, 39]. Sungshin Y Choi und A. D. Cooper haben in vivo den LDL-Rezeptor mit einem monospezifischen Antikörper geblockt, wodurch die Aufnahmerate von Remnants um ca. 50% gesenkt werden konnte [112]. Darüber hinaus kommen sowohl der VLDL-Rezeptor (Takahashi et al., 1995), das LDL-Rezeptor-related Protein (LRP) (Beisiegel et al., 1989) [61] und der Scavenger-Rezeptor (Freeman, 1994; Sambrano u. Steinberg, 1995) [40,42] als mögliche Bindungsstellen in Betracht.

Rezeptor	Vorkommen	Struktur	Funktion
LDL- Rezeptor	alle Zellen, vor allem Leber	Mitglied der LDL Rezeptor-familie	Aufnahme und Katabolismus Apolipoprotein B- und Apolipoprotein E-haltiger Lipoproteine
LRP (LDL Receptor-Related-Protein)	alle Zellen, vor allem Leber	Mitglied der LDL Rezeptor-familie	Multiligandenrezeptor mit Bindung von Chylomikronen-Remnants und Apolipoprotein-E- reichen Lipoproteinen
Scavenger Rezeptor Klasse A	alle Zellen, vor allem Makrophagen	Mitglied der CD-36 Protein-familie	Multiliganden- Rezeptor mit Katabolismus von chemisch modifizierten Plasmaproteinen z.B. oxidierten LDL
Scavenger Rezeptor Klasse B, Typ 1 (SRB-1)	alle Zellen, vor allem Makrophagen	Mitglied der CD-36 Protein-familie	Multiliganden- Rezeptor für modifiziertes LDL, VLDL, HDL und Phospholipiden
VLDL- Rezeptor	Herz, Skelettmuskel und Fettgewebe	Mitglied der LDL Rezeptor-familie mit 8 Ligandenbindungsrepeats	Multiligandenrezeptor mit Bindung von VLDL- und Chylomikronen-Remnants

**Tabelle 1.2 Rezeptoren des Lipoproteinstoffwechsels.[40,42,61]**

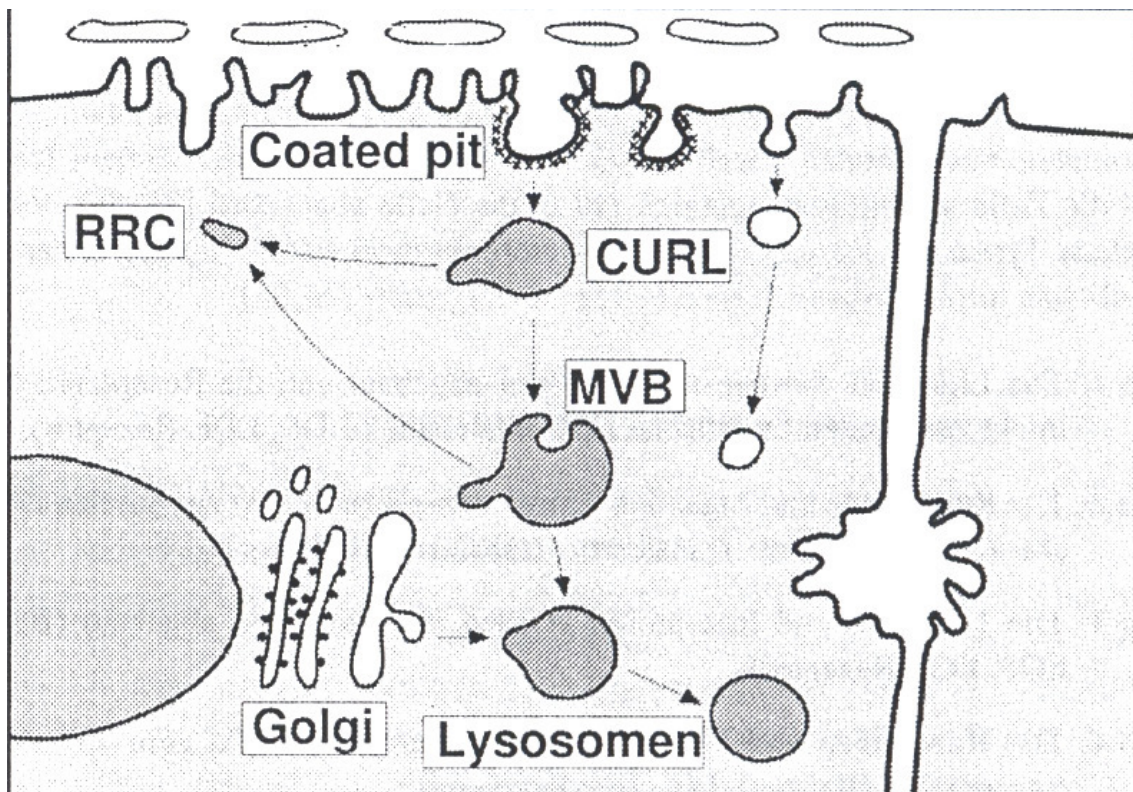
Zunächst müssen die Remnants die Fenestration der Lebersinusoiden passieren, um eine Rezeptorbindung einzugehen [44]. Diese Rezeptoren können entweder auf der gesamten Zelloberfläche gleichmäßig verteilt sein, oder angereichert in sog. „coated pits“ vorliegen [119]. Diese sind Einstülpungen der Membran, die von der Gegenseite mit Clathrin, einem Protein, welches aus einer schweren Kette (180.000 Dalton) und

einer leichten Kette (35.000 - 40.000 Dalton) besteht, besetzt sind. Die daraus entstehenden Vesikel werden als „Clathrin-coated vesicles“ bezeichnet. Diese Vesikel haben Durchmesser von 50 - 100 nm und werden von einem Gerüst aus meistens 12 Penta und 8 Hexagons aus insgesamt 36 Dreifachskelotten von Clathrin überzogen [43].

## **1.2.2 Weiterer intrazellulärer Transport und Katabolismus aufgenommenener Liganden**

Nach Dissoziation des Clathrins konfluieren die sogenannten „Coated vesicles“ zu frühen Endosomen [45]. Durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe wird im Inneren der Zelle der pH-Wert gesenkt, wodurch eine Loslösung des Liganden vom Rezeptor initiiert wird [46]. Dieses Kompartiment wird aufgrund seiner Funktion auch „Compartment of uncoupling of receptor and ligand“ (CURL) genannt. Während sich im Zentrum dieser Vesikel überwiegend die noch gebundenen Lipoproteine befinden, kann man am Rande Ausstülpungen erkennen, in denen die dort gesammelten Rezeptoren hoch angereichert sind. Nach deren Abschnürung gewinnen diese wieder Anschluss an die Oberfläche der Hepatozyten, um die Rezeptoren wieder dorthin abzugeben. Der andere, hauptsächlich mit dem aufgenommenen Liganden gefüllte Teil, kann aber ebenfalls Rezeptorstrukturen zurückbehalten, die sich im Inneren zu doppelagigen Vesikeln organisieren. Aufgrund ihrer Vielzahl von Einschlusskörperchen werden diese Organellen auch „Multiple Vesicular Bodies“ (MVB) genannt. Sie wandern in die Nähe des Golgi-Apparates, um dort mit primären Lysosomen zu verschmelzen [47]. Die Lysosomen enthalten Enzyme, die für die weitere Degradation der aufgenommenen Lipide verantwortlich sind [41]. Ihren Ursprung besitzen die Lysosomen im glatten Endoplasmatischen Retikulum. Hier werden die lysosomalen Enzyme synthetisiert und via Exozytose in Richtung Golgi-Apparat abgegeben, wo sie posttranslational modifiziert werden [48]. Anschließend erfolgt die Verschmelzung zu den sogenannten sekundären Lysosomen. In ihnen werden die Apolipoproteine in ihre Primärstruktur zerlegt, zum anderen werden die Cholesterinester von den Fettsäuren getrennt und die Esterbindung aufgespalten, so dass das Cholesterin und Fettsäuren in freier Form vorliegen [43]. Von hier ab können die Lipide nun in verschiedene Stoffwechselwege eingeschleust werden. So werden sie zur Produktion des intrazellulär hergestellten VLDL benötigt, das per Exozytose wieder an die Blutbahn abgegeben wird. Ferner bezieht auch die Bildung der Gallensäure ihr benötigtes Cholesterin hieraus. Überschüssiges Fett wird in Tröpfchenform in der Zelle gespeichert. Der Inhalt der Lysosomen wird, nachdem die Lipoproteine vollständig degradiert wurden, am biliären Pol der Zelle in

den Gallekanal sezerniert, während die restlichen Rezeptoren durch die Golgizisternen intakt zur Zelloberfläche zurückkehren.



**Abbildung 1.3 Rezeptor-vermittelte Endozytose der Lipoproteine in die Hepatozyten.** Die schematische Darstellung der Endozytose zeigt, dass nach Internalisation der „Coated Pits“ drei verschiedene Endosomenfraktionen am intrazellulären Transport der Liganden beteiligt sind. In der frühen Phase befinden sich die aufgenommenen Liganden in den oberflächennahen „Compartment of Uncoupling of Receptor and Ligands (CURL)“, dort erfolgt die Dissoziation der Rezeptoren, die sich zu den „Receptor-Recycling Compartements (RRC)“ vereinigen, bevor sie den Rückweg zur Zelloberfläche antreten. In den späten Endosomen, den sogenannten „Multiple Vesicular Bodies (MVB) erfolgt der weitere Transport der Lipoproteine in das Zellinnere, bis diese Anschluss an primäre Lysosomen gewinnen, die vom Golgi-Apparat abgeschnürt werden. Durch Fusion mit diesen entstehen dann die sekundären Lysosomen, in denen dann die weiteren Degradationsschritte erfolgen.

## 1.3 Lipoproteinrezeptoren

### 1.3.1 LDL-Rezeptoren

Der LDL-Rezeptor ist ein 115 kD großes Membranprotein, dessen N-terminales, extrazelluläres Ende aus einem sieben mal wiederholten cysteinreichen Motiv (complement type repeat) mit jeweils ca. 40 Aminosäuren besteht, das die Bindungsstelle für Apolipoprotein B-100 und Apolipoprotein E enthält [68-70]. Die Bindung beider Apolipoproteine wird durch ionische Interaktion der basischen Aminosäuren der Apolipoproteine mit sauren Aminosäuren der Rezeptoren vermittelt. Die intrazelluläre, C-terminale Region hat eine Länge von etwa 50 Aminosäuren. Dieser Abschnitt besitzt eine Sequenz der Aminosäuren, die für die Integration des Rezeptors in die coated pits und für das Recycling des Rezeptors verantwortlich ist [71,72]. Der LDL-Rezeptor bindet das LDL über das Apolipoprotein B-100. Die Ligandenbindung erfolgt am N-terminalen Ende des Rezeptorproteins. Neben Apolipoprotein B-100 weist der LDL-Rezeptor eine hohe Affinität zum Apolipoprotein E auf [73,74]. Der LDL-Rezeptor nimmt bei der Regulation der Cholesterinhomöostase im Intrazellulärraum der Zelle und im Plasma eine zentrale Stellung ein. Dies wird durch verschiedene Mutationen im LDL-Rezeptor Gen verdeutlicht, die die Ursache für die Entstehung der familiären Hypercholesterinämie darstellt, die eine Ursache der frühzeitigen Atherosklerose ist [75].

### 1.3.2 LDL-Receptor-related Protein und Receptor Associated Protein

Das „LDL Receptor-related Protein (LRP)“ ist dem LDL-Rezeptor nahe verwandt. Es ist etwa 4-mal so groß wie der LDL Rezeptor und enthält ähnliche Regionen, die für die Bindung der Liganden verantwortlich sind [76]. Das LRP wird als 600 kD Vorläufermolekül synthetisiert [37]. Auf seinem Weg zur Zelloberfläche wird es proteolytisch in zwei Untereinheiten mit 515 kD und 85 kD gespalten [77]. Beide Untereinheiten sind durch eine nicht kovalente Bindung miteinander verbunden. Während die kleine Untereinheit die transmembranöse und zytosolische Domäne bildet, liegt die große Untereinheit ausschließlich intrazellulär. Das LRP enthält in seiner N-terminalen Domäne 31 complement type repeats, die in vier Clustern angeordnet sind und 22 growth factor repeats, die durch acht Spacerregionen mit jeweils mehreren YWTD-Sequenzen getrennt sind. Das zytoplasmatische Ende ist mit seinen 100 Aminosäuren zweimal so lang wie

beim LDL-Rezeptor. Der wesentliche Unterschied zwischen dem LDL-Rezeptor und dem LRP liegt in der O<sub>2</sub>-gebundenen Zuckerdomäne des LDL-Rezeptors. Diese ist beim LRP durch 6 epidermal growth factor like repeats ersetzt, die dem growth factor repeats sehr ähnlich sind; die Cysteinreste sind jedoch anders angeordnet. Das LRP wurde in verschiedenen Geweben nachgewiesen [78]. Das LRP bindet eine ganze Reihe von Liganden und stellt somit einen multifunktionellen Rezeptor dar. Zu den wichtigsten Liganden im Lipoproteinstoffwechsel gehören: Apolipoprotein E, Lipoprotein Lipase, hepatische Lipase, VLDL und Chylomikronen Remnants [79]. Eine besondere Rolle spielt das 39 kD große „Receptor Associated Protein (RAP)“. Es inhibiert durch seine Bindung an das LRP alle anderen Liganden und scheint somit für die Regulation der Ligandenbindungen verantwortlich zu sein.

### **1.3.3 Scavenger-Rezeptoren**

Es gibt noch einen anderen, nicht sättigbaren Weg der Verstoffwechslung von Lipiden als der über die hochaffinen LDL-Rezeptoren, der jedoch klinische Relevanz für die Entstehung der Arteriosklerose hat. Dieser verläuft über sogenannte „Scavenger-Rezeptoren“ (Freeman,; Sambrano u. Steinberg) [40,42], die in hoher Dichte auf der Oberfläche der Zellen des retikuloendothelialen Systems lokalisiert sind. Scavenger-Rezeptoren nehmen LDL-Partikel auf, die oxidiert und acetyliert sind. Die ungesättigten Fettsäuren der LDL sind sehr anfällig für Oxidationen, werden im Blut jedoch durch Antioxidantien (wie z.B. die Vitamine A und E) geschützt. Werden die LDL zu lange in der Arterienwand gehalten, in die sie durch Endothelläsionen gelangen, ist dieser Schutz nicht mehr ausreichend. Infolgedessen werden ihre Fettsäuren oxidiert. Makrophagen nehmen diese hochreaktiven Lipidperoxide entsprechend ihrer Plasmakonzentration über die Scavenger-Rezeptoren auf und wandeln sich reaktiv zu sogenannten Schaumzellen um, die als Ursache für die Ausbildung atherosklerotischer Plaques angenommen werden. Während den Chylomikronen alleine keine große Bedeutung bei der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen zugeschrieben wird [82], so geht man bei deren Remnants eher davon aus, hierbei einen Einfluss zu haben [83-86].

## 1.4 Prä- und postprandialer Katabolismus der Remnants

Im Stoffwechselweg der Lipoproteine unterscheidet man zwischen dem endogenen Teil, der den Austausch hauptsächlich der VLDL, LDL und IDL zwischen der Leber und dem extrahepatischem Gewebe sicherstellt [89,90], und dem exogenen, der den Aufnahmemechanismus der in der Darmmukosa synthetisierten Chylomikronen charakterisiert [91]. Der Lipidgehalt der aufgenommenen Nahrung bestimmt hauptsächlich die Zusammensetzung der Chylomikronen und deren Remnants, weniger jedoch deren Anzahl [13,19]. Aufgrund ihrer Größe und ihres Gehaltes an Lipiden und Proteinen gibt es Unterschiede bezüglich der Affinität zu verschiedenen Rezeptoren [82].

Für Apolipoprotein-E-reiche Lipoproteine konnte in vitro die Affinität zu endosomalen Membranen durch vorherige Anreicherung des LDL-Rezeptors gesteigert werden [92]. Außer den LDL und VLDL Rezeptoren sollen für die Aufnahme von Remnants der Chylomikronen, die hauptsächlich durch Apolipoprotein E vermittelt wird, auch das „Lipoprotein Receptor related Protein (LRP)“ verantwortlich sein. Dieses konnte durch mehrere Versuche an Mäusen gezeigt werden, bei denen die Internalisierung die Remnants der Chylomikronen bei einem defekten LDL-Rezeptor durch das „Lipoprotein receptor related protein (LRP)“ gesichert werden konnte, während man durch eine zusätzliche Inaktivierung des „Lipoprotein receptor related protein (LRP)“ durch das „Receptor Associated Protein (RAP)“ eine Akkumulation im Plasma zirkulierender Remnants provozieren konnte [54, 66, 67]. Im Tiermodell an Ratten konnte gezeigt werden, daß Aufnahmegeschwindigkeit und Aufnahmerate von Remnants kleiner Chylomikronen in hepatozelluläre Endosomen mit der LDL-Rezeptordichte korreliert, während die Aufnahmerate von Remnants großer Chylomikronen durch Aktivierung der LDL-Rezeptoraktivität nicht wesentlich beeinflusst wird. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass diese schneller aus dem Plasma eliminiert werden als Remnants kleiner Chylomikronen, und später in den Endosomen wieder auftauchen. Die Affinität von Remnants großer Chylomikronen zur Leberzellmembran scheint demnach zunächst groß zu sein, wahrscheinlich müssen sie dort aber länger verweilen um eventuell zuerst weiter bearbeitet zu werden, bevor sie einen Weg in die Zelle beschreiben können [62].



## 1.5 Fragestellung

Lange Zeit wurde vermutet, dass es zwei getrennte Wege für die Internalisation der Remnants geben könnte. Einen schnelleren Aufnahmeweg, der über den LDL-Rezeptor sichergestellt wird, und dem sich zum überwiegenden Teil die kleinen Remnants bedienen, und ein langsamerer für Remnants großer Chylomikronen [93; 94]. Hierfür können das LDL-Rezeptor assoziierte Protein oder auch die hepatische Lipase verantwortlich sein [58; 95]. Es gibt aber auch die Möglichkeit, dass Remnants großer Chylomikronen ebenfalls über den LDL-Rezeptor in die Zelle aufgenommen werden.

### 1.5.1 Existenz potentieller Bindungsstellen in der Leber für Remnants großer Chylomikronen

Diese Arbeit soll die Frage beantworten, ob der LDL-Rezeptor prinzipiell eine mögliche initiale Bindungsstelle auch für Remnants großer Chylomikronen an hepatozellulären Membranen sein könnte. Dazu soll die Bindung von Remnants großer Chylomikronen mit der von Remnants kleiner Chylomikronen an Membranen von Leberzellen verglichen werden. Sollten Remnants großer Chylomikronen ebenfalls eine starke Affinität zum LDL-Rezeptor besitzen, könnte die in vivo beobachtete verzögerte Aufnahme der Remnants großer Chylomikronen in einer Hemmung der Passage der sinusdoidalen Struktur der Leber aufgrund der Partikelgröße begründet sein, so daß ihre Bindung zumindest initial über andere Rezeptoren erfolgt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Es wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 200 - 300 g verwendet (Zentrale Versuchstieranstalt Hannover). In bestimmten Experimenten wurden die Ratten mit 5 mg pro kg Körpergewicht 17-alpha-Ethinylöstradiol (1 mg/ml Propylenglykol) behandelt. An drei aufeinander folgenden Tagen wurde täglich einmal eine subkutane Injektion der Östradiollösung verabreicht. Nicht vorbehandelten Ratten wurden 20 Stunden vor Beginn eines Versuches die Nahrung entzogen. Die Ratten erhielten normales Futter. Bei der Gewinnung von großen bzw. kleinen Chylomikronen wurden die Tiere einer fettreichen bzw. fettarmen Diät unterzogen. Sämtliche Tierversuche wurden durch die zuständige Ethikkommission gebilligt und entsprachen den deutschen Tierschutzregelungen für Versuchstiere.

### 2.2 Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

$^3\text{H}$  Cholesterin, Natrium $^{125}\text{J}$ odid

**(Fa. Amersham, Buchler)**

Molekulargewichtstandards MW: 40.000-200.000, Glucose-6-Phosphat, AMP, 4-Nitrophenylphosphat, NADP, Natriumdodecylsulfat (SDS)

**Fa. Boehringer, Mannheim**

Calciumchlorid, Essigsäure 100 % z. A., Ethanol, Gentamycin-Sulfat, Glycerin, Kaliumbromid, Kupfersulfat, Methanol, Natriumacetat, Natriumarid, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natrium-Kaliumtartrat, Natriummetaarsenit, Natriumsulfat, Natronlauge 1 N und 0,1 N, ortho-Phosphorsäure 99 %, Salzsäure 1 N und 25 %, Schwefelsäure 0,5 N, Trichloressigsäure, Heptan, Isopropylalkohol, Trichloressigsäure (TCA), Ascorbinsäure, Amoniumniolybdat, Trishydroxymethylaminomethan (TRIS), Folin, Ciocalaus-Phenol:

**Fa. Merck, Darmstadt;**

Acrylamid, N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Dextran, 2-Mercaptoethanol, Ethylendiamino N, N, N', N'-Tetraessigsäure (EDTA), Ammoniumperoxodisulfat:

**Fa. Serva, Heidelberg;**

Bovines Serumalbumin (BSA), Bromphenolblau, Isopropanol, N, N'-Methylenbisacrylamid, Silbernitrat, 17-alpha-Ethinylöstradiol, Sucrose, Arsenil/Citrat, p-Nitrophenol Standardlösung, Triethanolamin, Cacodylsäure, Zitronensäure:

**Fa. Sigma, München;**

Sepharose CL 6B:

**Fa. Pharmacia, Uppsala**

## **2.3 Chemische Analysen**

### **2.3.1 Proteinbestimmung nach Lowry et al**

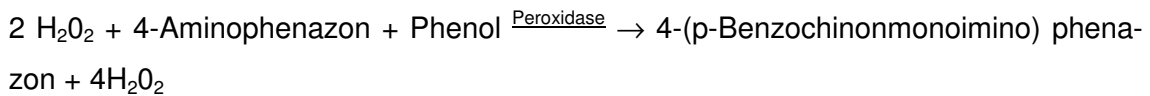
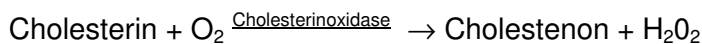
Proteine wurden nach der Methode von Lowry und Peterson quantifiziert [107]. Die verwendeten Standards enthielten 10 bis 100 µg Bovines Serum Albumin (BSA). Zu 100 µl Probe bzw. 200 µl Standard wurden 1 ml bzw. 2 ml Gebrauchsreagenz gegeben, die sich aus 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung, 0,01% CuSO<sub>4</sub>-Lösung sowie 0,02% K-Na-Tartrat Lösung zusammensetzte. Nach gutem Mischen erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden 100 µl bzw. 200 µl Folin-Reagenz (Phenolreagenz 1:1 mit Wasser verdünnt) unter Schütteln dazugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Extinktion wurde bei 750 nm im Eppendorf-Photometer gemessen. Die Proteinkonzentrationen ergaben sich durch Auswertung der entsprechenden Standardkurve mit Hilfe von linearer Regression.

### **2.3.2 Cholesterin**

Die Bestimmung von Cholesterin in verschiedenen subzellulären Fraktionen erfolgte nach der Methode von F. Stähler et al [122].

**Testprinzip:** Enzymatische Spaltung von Cholesterin und nachfolgende Bestimmung des entstandenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mittels Farbreaktion bzw. photometrische Messung des Farbkomplexes.

## Reaktionsgleichungen



## Verwendete Lösungen

- |                 |  |
|-----------------|--|
| 1. Pufferlösung | Kaliumphosphat 0,4 mol/l, pH 7,7<br>Phenol 20 mmol/l<br>Methanol 1,85 mol/l  |
| 2. Pufferlösung | Kaliumphosphat 0,4 mol/l, pH 7,7<br>4-Aminophenazon 2 mmol/l<br>Methanol 1,85 mol/l<br>Hydroxypolymethoxydodecan 0,4 % |
| 3. Enzymlösung  | Cholesterinoxidase → 12 U/ml   |

Die Herstellung der Reagenzlösung erfolgt durch Mischen von je 20 ml Lösung 1 + 2, sowie 0,2 ml Lösung 3.

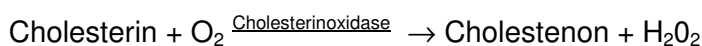
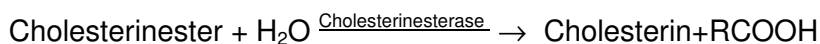
## Durchführung:

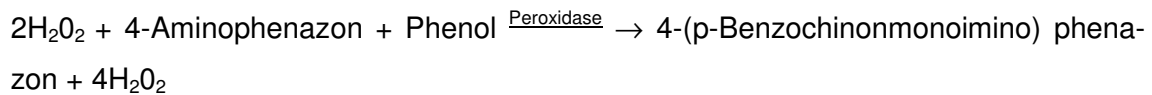
Zu 200 µl Probe bzw. Standard wurden 2 ml Reagenzlösung gegeben und nach gutem Mischen für 20 Minuten bei 20-25°C inkubiert. Die Extinktion wurde in einem Eppendorf-Photometer bei 500 nm bestimmt. Die Konzentration des Cholesterins wurde wie folgt berechnet:  $c \text{ [mg/dl]} = 585 \times \text{Extinktion}_{\text{Probe}}$

## 2.3.3 Cholesterin-Ester

Nach der Methode von J. Siedel et al. [123]. wurden die Cholesterinester der Lipoproteine bestimmt. Das Testprinzip basiert auf der enzymatischen Spaltung der Cholesterinester und der nachfolgenden Bestimmung des entstandenen Cholesterins.

## Reaktionsgleichung





### Verwendete Lösungen:

Reagenzlösung	Tris:	100 mmol/l (pH 7,7)
	Magnesiumaspartat:	50 mmol/l
	4-Aminophenazon:	1 mmol/l
	Natriumchololat:	10 mmol/l
	Phenol:	6 mmol/l
	3,4-Dichlorphenol:	4 mmol/l
	Fettalkoholpolyglycoläther:	0,3 %
	Cholesterin-Esterase:	0,4 U/ml
	Cholesterin-Oxidase :	0,25 U/ml
	Peroxidase:	0,2 U/ml

### Durchführung:

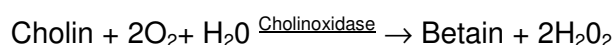
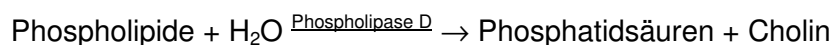
Zu 200 µl Probe bzw. Standard wurden 2 ml Reagenzlösung gegeben und nach gutem Mischen für 10 Minuten bei 20-25°C inkubiert. Die Extinktion wurde in einem Eppendorf-Photometer bei 500 nm bestimmt. Die Konzentration der Cholesterinester wurde wie folgt berechnet:  $c \text{ [mg/dl]} = 575 \times \text{Extinktion}_{\text{Probe}}$

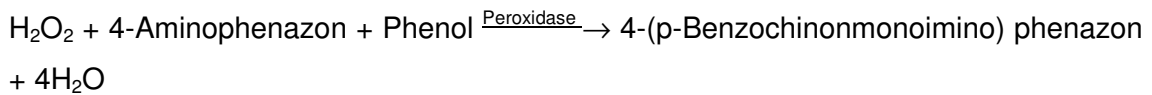
## 2.3.4 Phospholipide

Die Phospholipide der Lipoproteine wurden mit der Methode von M. Takayama et al. [124] bestimmt.

**Testprinzip:** Enzymatische Spaltung der Phospholipide und nachfolgende Bestimmung des entstandenen Cholins mittels Farbreaktion bzw. photometrischer Messung des Farbkomplexes.

### Reaktionsgleichungen:





### Verwendete Lösungen

1. Puffer	Tris:	0,05 mol/l (pH 8,0)
	Phenol:	0,02 mol/l
2. Enzymreagenz	Phospholipase D:	1000U/l
	Cholinoxidase:	1400 U/l
	Peroxidase:	800 U/l
	4-Aminophenazon:	8mmol/l
3. Standard	Cholinchlorid:	54,1 mg/dl

Die Herstellung der Reagenzlösung erfolgte durch Mischen von Lösung 1 + 2

### Durchführung

Zu 200 µl Probe bzw. Standard wurden 3 ml Reagenzlösung gegeben und nach gutem Mischen für 20 Minuten bei 20-25 °C inkubiert. Die Extinktion wurde in einem Eppendorf-Photometer bei 500 nm bestimmt. Die Konzentration des Cholesterins wurde wie folgt berechnet:  $c[\text{mg/dl}] = 300 \times \text{Extinktion}_{\text{Probe}} / \text{Extinktion}_{\text{Standard}}$

### 2.3.5 TCA-Fällung

Zur Bestimmung des Anteils proteingebundenen Natrium <sup>125</sup>Jodid an der Gesamtaktivität nach radioaktiver Markierung von Proteinen wurde die Trichloressigsäure (TCA)-Fällung benutzt. Zu 10 µl der jodierten Probe wurden 50 µl BSA-Lösung (40 %) gegeben und mit 0,9 % NaCl auf 1 ml aufgefüllt. Diesem Gemisch wurden 500 µl eiskalter TCA-Lösung hinzugefügt und nach gründlichem Mischen wurde es für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 3.000 Upm bei 4°C in einer Heräus-Laborzentrifuge zentrifugiert. Der 1. Überstand wurde abgenommen und das Sediment in 500 µl Trichloressigsäure (20 %) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten bei 3.000 Upm) wurde der 2. Überstand abgenommen und die Aktivität in den Überständen und im Sediment im gamma Counter gemessen. Die Aktivität der proteingebundenen Markierung ergab sich aus der Differenz zwischen 1. Überstand sowie Sediment und dem 2. Überstand.

## 2.4. Elektrophorese

### 2.4.1 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung membranständiger Proteine wurden diese mittels SDS-Page Gelelektrophorese aufgetrennt und ggf. anschließend auf Nitrozellulose geblottet.

Folgende Stammlösungen werden benötigt:

<b>Acrylamid –Stammlösung:</b>	150g Acrylamid (30%) 4g Bis-Acrylamid (0,8%) mit H <sub>2</sub> O bidest. ad 500ml
<b>Tris HCL ph 8,8 (4X)</b>	90,825 g TRIS (1,5 M) H <sub>2</sub> O bidest. ad 500 ml
<b>Tris HCL ph 6,8 (4X)</b>	H <sub>2</sub> O bidest. ad 100 ml
<b>SDS:</b>	10g SDS (10%) H <sub>2</sub> O bidest. ad 100 ml
<b>Probenpuffer (2x):</b>	20 ml TRIS-HCL (pH 6,8) 20ml SDS10% 20 ml Glycerin 30 ml H <sub>2</sub> O bidest. 10 ml $\beta$ -Mercaptoethanol (10 %) 31,2 mg Benzamidin (2 mM) 0,5 ml EDTA 1 mM (0,2 M Stock)
<b>Laufpuffer (10x)</b>	120 g TRIS 576 g Glycin 40 g SDS 4000 ml H <sub>2</sub> O bidest.
<b>Bromphenolblau 0,1%:</b>	10 $\mu$ l auf 100 $\mu$ l

## Probenvorbereitung

Die Proben wurden nach geeigneter Verdünnung im Verhältnis 1:1 mit 2x Probenpuffer und Bromphenolblau versetzt. Die Standards wurden bei 95°C 5 min. reduziert.

## Vorbereitung der Gele

Für ein 7,5 % bis 12,5 % SDS-Polyacrylamidgradientengel in 0,5 mm Stärke wurden folgende Stammlösungen mit einem Gradientenmischer zwischen 2 Glasplatten gegossen.

**Vordere Kammer:**

- 12,5 ml Acrylamid/Bis-Stammlösung
- 7,5 ml 1,5 M TRIS-HCL (pH 8,8)
- 9,3 ml H<sub>2</sub>O bidest.
- 0,6 ml SDS 10 %
- 0,2 ml AP 10 %
- 10 µl TEMED

**hintere Kammer**

- 7,5 ml Acrylamid/Bis-Stammlösung
- 7,5 ml 1,5 M TRIS-HCL (pH 8,8)
- 14,3 ml H<sub>2</sub>O bidest.
- 0,6 ml SDS 10 %
- 0,2 ml AP 10 %
- 10µl TEMED

## Sammelgel:

Für das Sammelgel wurde ein 3,5 % SDS-Polyacrylamidgel verwendet:

Sammelgel:

- 2,4 ml Acrylamid/Bis-Stammlösung
- 5 ml 1,5 M TRIS-HCL (pH 6,8)
- 12,4 ml H<sub>2</sub>O bidest.
- 0,2 ml SDS 10 %
- 0,3 ml AP 10 %
- 10µl TEMED

## Trennung

Pro Bahn wurden 140 µl aufgetragen, die Trennung erfolgte mit 80 Milliampère pro 14 Bahnen für ca. 2,5 Stunden.

Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie- oder Silberfärbung.



## 2.4.2 Coomassie-Färbung

### Verwendete Lösungen

Färbelösung                      50 ml Isopropylalkohol (25 %)  
   20 ml Coomassie-Blau (0,25 %)  
   20 ml Eisessig (10 %)  
   H<sub>2</sub>O bidest. ad 200 ml

Entfärbelösung                    50 ml Isopropylalkohol (10 %)  
   50 ml Eisessig (10 %)

### Durchführung:

Das SDS-Gel wurde über Nacht unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur gefärbt, danach für 4 Stunden entfärbt und fotografiert.

## 2.4.3 Silberfärbung

Verwendete Lösungen:

**Fixierlösung 1:**            250 ml Ethanol  
   50 ml Eisessig  
   H<sub>2</sub>O bidest. ad 500 ml

**Fixierlösung 2:**            250 ml Methanol  
   ad 500 ml H<sub>2</sub>O bidest.

**Färbelösung**                0,8 g Silbernitrat  
   21 ml 0,36% NaOH  
   1,1 ml 18,8 M (32 %) Ammoniak  
   ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.

**Entwickler**                 2,5 ml 1 % Zitronensäure  
   250 ml 38 % Formaldehyd  
   ad 500 ml H<sub>2</sub>O bidest.

**Durchführung:**

Das SDS-Gel wurde zunächst in Fixierlösung 1 für 2 Stunden und dann in Fixierlösung 2 für 1 Stunde fixiert. Nach einem 10-minütigen Waschvorgang in H<sub>2</sub>O bidest erfolgte die Färbung für 10 Minuten unter leichtem Schütteln. Das SDS-Gel wurde anschließend für 5 Minuten in H<sub>2</sub>O bidest gewaschen und für 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur in den Entwickler gegeben. Der Färbvorgang wurde durch Zugabe von H<sub>2</sub>O bidest gestoppt und das Gel sofort nach der Färbung fotografiert.

**2.4.4 Ligandenblotting**

Ligandenblotting mit <sup>125</sup>J markierten Remnants

**Reagenzien:**

Blockingpuffer: 10% BSA/ml (ph:7,5) + 2,0 ml Hepes

Waschpuffer: 500 ml PBS + BSA (0,2%)

**Vorgang:**

1. Blocken der unspezifischen Bindungen durch Inkubation der Nitrozellulosestreifen für 90 min. bei 37°C im Blockingpuffer.
2. Inkubation der Streifen mit dem Ligand (2µg Protein/ml Blockingpuffer) für 30 min. bei 37°C im Brutschrank auf dem Schüttler.
3. Erster Waschgang im Waschpuffer: Einmal schnell, zweimal je 20 min. auf dem Schüttler und ein weiteres Mal schnell bei Raumtemperatur.
4. Zweiter Waschgang im Waschpuffer anschließend schnell in Aqua bidest waschen.
5. Belichtung auf eine Röntgenfolie bei -80°C für ca. 3 Tage

## 2.5 Präparation von Lipoproteinen

### 2.5.1 LDL

Mit Hilfe sequentieller Ultrazentrifugation wurde LDL aus dem Plasma normolipidämischer Probanden gewonnen. Das Probandenblut wurde nach Zugabe des Proteaseinhibitors Benzamidin bei Raumtemperatur zur Gerinnung gebracht und das Serum in einer Laborzentrifuge abzentrifugiert. Dem Serum (1000 ml) wurden nun jeweils 5 ml 4% Na-EDTA Lösung, 5 ml 2% Gentamycin-Sulfat und 5 ml Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) Lösung hinzugegeben. Das Plasma wurde auf eine Dichte von 1,025 g/ml mit Kaliumbromid eingestellt und mit 40.000 Upm bei 4°C für 24 Stunden in einem SW 40 Ti-Rotor zentrifugiert. Der Unterstand wurde nun auf die Dichte von 1,050 g/ml mit Kaliumbromid eingestellt und dann der gleichen Ultrazentrifugation (doppelte Durchführung) unterworfen. LDL wurde aus dem Überstand dieses Zentrifugationsschrittes mit einer Dichte von 1,050 g/ml gewonnen.

### 2.5.2 Chylomikronen

Die Gewinnung hochreiner Chylomikronen der Ratte gelang durch Fistulation des mesenterialen Lymphkanals. Zur Gewinnung kleiner Chylomikronen wurde die Ratte mit einer Glucoselösung (20%) ernährt, für die Gewinnung großer Chylomikronen wurden der Nährlösung "Lipovenös" der Firma „Fresenius“ beigemischt (4% Endkonzentration). Die so gewonnene Lymphe wurde in 2 Schritten mit 40.000 Upm bei 4°C für 24 Stunden in einem SW 40 Ti-Rotor zentrifugiert. Zur Präparation radioaktiv  $^3\text{H}$  Cholesterin markierter Chylomikronen wurde bereits der Nährlösung  $^3\text{H}$  Cholesterin zugefügt.

### 2.5.3 Remnants

Zur Gewinnung von Postheparinplasma wurde den Ratten 10 Minuten vor Blutentnahme eine Heparinlösung injiziert, um die wandständige Lipase in Lösung zu bringen. Anschließend wurden die Chylomikronen mit dem gewonnenen Blutplasma für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Aufkonzentrierung der Remnants erfolgte durch eine 2 malige Ultrazentrifugation zuerst für 24 Stunden in einem SW 40 Ti-Rotor, dann für weitere 24 Stunden in einem 50 Ti-Rotor.

## 2.5.4 Ligandenmarkierung mit $^{125}\text{J}$

**Material:** 2 PD 10 Säulen

**Lösungen:**

Elutionspuffer	(Tris Puffer)
Glycinpuffer	(ph 10)
Jodmonochlorid	(0,02 ml)
Natriumjodid	( $^{125}\text{J}$ )
Ligand	

**Durchführung:**

1. Spülung der PD 10 Säulen mit Elutionspuffer
2. Versetzung des Liganden mit Glycinpuffer im Verhältnis 1:5
3. Zugabe von 0,25 mCi  $^{125}\text{J}$ , sowie 140  $\mu\text{l}$  Jodmonochlorid
4. Nach 5 Minuten Inkubation Passierung über beide PD 10 Säulen

## 2.6 Membranpräparationen

### 2.6.1 Plasmamembranen

Plasmamembranen wurden nach der Methode von Wasner et al. [125] aus Rattenlebern isoliert. Die Lebern der mit Äther narkotisierten Ratten wurden mit ca. 100 ml eiskalter 0,15 M NaCl-Lösung perfundiert, entnommen, zerkleinert sowie mit einem „Dounce-Homogenisator“ in 8,1ml Sucrose (0,25 M), 5 mM Tris-HCL und 1 mg MgCl (pH 7,4) homogenisiert. Es wurden jeweils 32 g Leber eingesetzt, wobei die Konzentration 1g Leber pro 5 ml Endvolumen betrug. Alle Schritte der Präparation wurden auf Eis durchgeführt.

Das Leberhomogenat wurde durch feuchte Kompressen gefiltert und 5 Minuten mit 1.300 Upm in einer "Varifuge K Heräus"-Laborzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in der STM-Lösung homogenisiert und erneut 5 Minuten mit 1.300 Upm bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände der ersten beiden Zentrifugationsschritte wurden

gepoolt und 10 Minuten mit 3.100 Upm bei 4°C zentrifugiert. Die Sedimente dieses Zentrifugationsschrittes wurden anschließend in insgesamt 32 ml STM-Lösung resuspendiert und mit dem Dounce Homogenisator rehomogenisiert. Die Dichte wurde durch Zugabe von 2 M STM-Lösung (2 M Sucrose, 5 mM Tris-HCl und 1 mg MgCl bei einem pH von 7,4) auf 1,18 g/ml und das Volumen mit 1,42 M STM-Lösung auf 324 ml erhöht. Nun wurden jeweils 35 ml des Aliquots mit 3 ml 0,25 M Sucrose-Lösung überschichtet und 60 Minuten mit 25.000 Upm in einem SW 27 Rotor (Beckmann) bei 4°C zentrifugiert. Am Übergang der beiden Dichten fand sich eine Bande, die entnommen, homogenisiert und mit 0,25 M Sucrose auf eine Dichte von 1,05 g/ml verdünnt wurde. Die Plasmamembranen wurden dann 10 Minuten mit 3.100 Upm in der Heräus-Laborzentrifuge bei 4°C sedimentiert.

Die mit 0,5 ml NaCl resuspendierten Pellets wurden mit 4 ml 10 mM Suramin verdünnt und zweimal in eine "French pressure Cell Press" (SLM Aminco, Urban, USA) [109] bei 16.000 psi gegeben. Die rupturierten Plasmamembranen wurden nun bei 40.000 Upm in einem 50.3 Ti-Rotor für 60 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Plasmamembranen wurden resuspendiert, erneut derselben Zentrifugation unterzogen und nochmals resuspendiert.

## 2.6.2 Endosomen

Endosomen wurden aus Lebern von jeweils 4 mit Äther narkotisierten Ratten nach Injektion von 3 mg (Protein) LDL in die Vena femoralis isoliert. Die Ratten wurden drei Tage vor dem Experiment mit Östradiol (1 mg/200 g Körpergewicht) behandelt. Bei nicht vorbehandelten Ratten wurde anstelle des humanen LDL Beta-VLDL verwendet, welches aus Serum von Kaninchen gewonnen wurde, die zuvor 6 Wochen lang einer cholesterinreichen Diät unterzogen wurden. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde die Vena porta 30 Minuten nach Injektion kanüliert, die Vena cava inferior eröffnet und die Lebern mit ca. 200 ml eiskalter 0,15 M NaCl-Lösung perfundiert.

Alle Schritte der folgenden Präparation wurden auf Eis durchgeführt. Die Lebern wurden zerkleinert und anschließend mit dem „Dounce Homogenisator“ in 0,25 M Sucrose-Lösung (1:3 Gewicht/Volumen) vorsichtig homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 Minuten bei 2.000 Upm und der Überstand anschließend 15 Minuten bei 5.200 Upm in einem SW 40 Ti-Rotor zentrifugiert. Der 2. Überstand wurde in einen 50.2 Ti-Rotor (Beckmann) transferiert und 20 Minuten bei 11.000 Upm zentrifugiert. Dem 3. Überstand wurde eine isotone Percoll Lösung hinzugefügt (30 ml Percoll Lösung zu 64 ml Überstand). Dieser „Percoll-Gradient“ wurde 45 Minuten bei 24.000 Upm in einem 50.3 Ti-Rotor (Beckmann) zentrifugiert. Das obere Drittel des „Percoll-Gradienten“ wurde

entnommen und mit 0,15 M Sucrose-Lösung verdünnt; diese Suspension wurde über ein 2,5 M Sucrose-Kissen geschichtet und mit 12.000 Upm 45 Minuten in einem SW 41 Ti-Rotor zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt war eine weiße Bande an der Grenze zwischen Sucrose-Kissen und Überstand zu sehen, die vollständig entnommen wurde. Die Dichte dieser Bande wurde mit 2,5 M Sucrose-Lösung auf 1,14 g/ml erhöht. Es wurde ein diskontinuierlicher Sucrose-Gradient präpariert, der jeweils 2 ml Sucrose-Lösung der Dichte 1,033 g/ml, 1,074 g/ml, 1,110 g/ml und 1,130 g/ml enthielt. Anschließend wurde die Probe unter die Sucrose-Lösung auf den Boden des Röhrchens geschichtet und der Dichtegradient 90 Minuten bei 40.000 Upm in einem SW 40 Ti-Rotor zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation erschienen 3 weiße Banden an den Grenzen der jeweiligen Gradienten: Die MVB-Bande zwischen 1,033 und 1,074 g/ml, die CURL-Bande zwischen 1,074 und 1,110 g/ml und die RRC-Bande zwischen 1,101 und 1,130 g/ml. Die Banden wurden entnommen, mit destilliertem Wasser auf isotone Konzentration eingestellt und bei 20.000 Upm in einem 50.3 Ti-Rotor während 30 Minuten sedimentiert. Um endosomale Membranen von ihrem Inhalt zu trennen wurden die resuspendierten Sedimente mit 4 ml 1mM Suramin (Endkonzentration) verdünnt und zweimal in eine "French pressure Cell Press" Zelle bei 16.000 psi gegeben. Die rupturierten Endosomen wurden erneut bei 40.000 Upm in einem 50.3 Ti-Rotor für 60 Minuten zentrifugiert. Die sedimentierten Membranen wurden resuspendiert und erneut derselben Zentrifugation unterworfen.

## 2.7 Membranbindungsassay

<b>Ansatz für benötigte Pufferlösungen:</b>	4,676 g NaCl (20mM) 24,2 g TRIS 0,28 g CaCl <sub>2</sub> ad 4000 ml H <sub>2</sub> O (ph 7,5)
<b>Ansatz für BSA Lösung:</b>	16 g BSA pro 100 ml Pufferlösung (ph 7,5)
<b>Ansatz pro Assay (200µl):</b>	25 µl BSA Lösung (16%)  50 µl gepufferte Membranlösung (8 µg Membranprotein pro Assay bis 1000 µg Membranprotein pro Assay)

75 µl Pufferlösung (bei der Ermittlung der Gesamtbindung) oder

75 µl LDL

50 µl radioaktiver Ligand

200 µl des Assay-Volumens wurden in einem Eppendorf-Röhrchen bei 60 Minuten bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert. In einem 42.2-Ti-Rotor wurden die Zentrifugationsröhrchen mit 150 µl New born calf serum gefüllt. Anschließend wurden 50 µl des Inkubationsgemisches über das New born calf serum geschichtet, 50 µl des Inkubationsgemisches in ein getrenntes Glasröhrchen zur genauen Messung der Ligandenkonzentration pipettiert.

Es erfolgte der erste Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 36.000 Umdrehungen pro Minute und 4°C. Nach der Zentrifugation und Absaugen des Überstandes mit einer Vakuumpumpe wurde das Sediment mit jeweils 200 µl New born calf serum überschichtet und erneut bei 36.000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde nun die Radioaktivität des Sediments gemessen.

Die Berechnung der membrangebundenen Menge Ligand (in ng Ligand pro µg Membranprotein) ergab sich aus dem Quotienten der proteingebundenen Aktivität pro Röhrchen zur jeweils spezifischen Aktivität des Liganden.

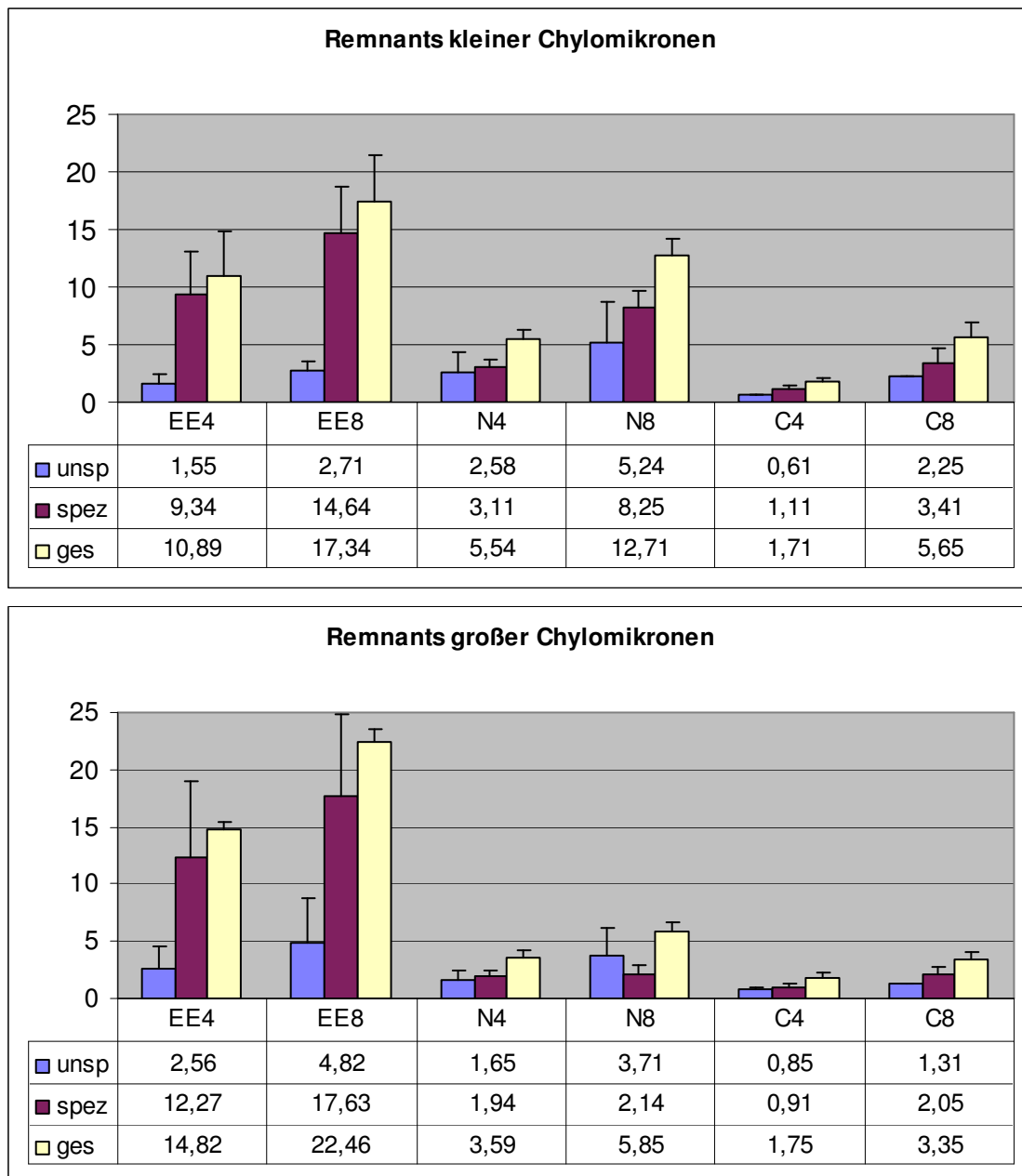
## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Vergleich der Bindungskapazität $^{125}\text{J}$ markierter Lipoproteine an Leberzellmembranen der Ratte in vitro**

#### **3.1.1 Membranbindungsassays von Remnants großer und kleiner Chylomikronen an hepatozellulären Membranen von Lebern Ethinylöstradiol-vorbehandelter und nicht vorbehandelter Ratten**

Um die Affinität von Remnants großer und kleiner Chylomikronen zu verschiedenen Oberflächenstrukturen der Rattenleber zu ermitteln, wurden Bindungsassays mit radioaktiven Liganden an verschiedenen Membranen der Rattenleber verglichen. Remnants großer und kleiner Chylomikronen wurden wie unter 2.5.2 präpariert und anschließend mit  $^{125}\text{J}$  radioaktiv markiert. In einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  wurden Membranbindungsassays, wie unter 2.7 beschrieben, bei 4 °C mit einer Konzentration von 4 bzw. 8  $\mu\text{g}$  Ligand pro ml durchgeführt. Verwendet wurden endosomale Membranen von Ratten, die 3 Tage vorher mit Ethinylöstradiol vorbehandelt wurden (EE-Endomembranen), endosomale Membranen nicht vorbehandelter Ratten (Normal-Endomembranen) sowie Membranen der gesamten Rattenleber (Crude-Membranen). Die Messergebnisse sind in Abbildung 3.1 dargestellt.





**Abb. 3.1 Bindungskapazität von  $^{125}\text{J}$  markierten Remnants großer und kleiner Chylomikronen an endosomalen Membranen der Rattenleber.** Pro Assay wurden  $40\ \mu\text{g}$  Membranprotein eingesetzt. Gemessen wurde die gesamte Bindung (gelbe Säulen), sowie die, durch LDL-Überschuss nicht supprimierbare, unspezifische Bindung (blaue Säulen). Hieraus wurde die spezifische, durch LDL supprimierbare Bindung (rote Säulen) errechnet. Die dazugehörige Standardabweichung ist als Fehlerindikator abgebildet. Dargestellt sind die Ergebnisse von 12 Bindungsversuchen mit einer Konzentration von jeweils 4 bzw. 8  $\mu\text{g}$  Protein Ligand pro mg Membranprotein an unbehandelten endosomalen Membranen (N4 und N8), an endosomalen Membranen von Ethinylöstradiol vorbehandelten Ratten (EE4 und EE8), sowie an unbehandelten Membranen der gesamten Leber (C4 und C8). Auf der Ordinate sind die jeweiligen

*membrangebundenen Proteinkonzentrationen der Liganden in ng Ligand pro mg Membranprotein aufgetragen.*

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass an nicht vorbehandelten endosomalen Membranen die Bindungskapazität für Remnants kleiner Chylomikronen (SCR) stärker ausgeprägt ist, als für Remnants großer Chylomikronen (LCR). Beim Einsatz von 4 µg Protein Ligand pro ml Assayvolumen beträgt die spezifische, durch LDL supprimierbare Bindung für Remnants kleiner Chylomikronen  $3,11 \pm 0,67$  ng Ligand pro µg Membranprotein, die bei Einsatz der doppelten Menge Ligand (8 µg/ml) auf  $8,25 \pm 1,25$  ng ansteigt. Für Remnants großer Chylomikronen beträgt die spezifische, durch LDL supprimierbare Bindung  $1,94 \pm 0,46$  ng, und bleibt auch bei Einsatz von 8 µg Ligand pro ml mit  $2,14 \pm 0,75$  ng Ligand pro µg Membranprotein nahezu unverändert.

An unbehandelten Membranen der gesamten Leber zeigt sich für Remnants großer und kleiner Chylomikronen ein ähnliches Bindungsverhalten, der Unterschied ist aber nicht so stark ausgeprägt wie bei den Versuchen an endosomalen Membranen nicht vorbehandelter Ratten (SCR:  $1,11 \pm 0,34$  ng Ligand pro µg Membranprotein, LCR:  $0,91 \pm 0,03$  ng Ligand pro µg Membranprotein beim Einsatz von 4 µg/ml; SCR:  $3,41 \pm 1,27$  ng Ligand pro µg Membranprotein, LCR:  $2,05 \pm 0,75$  ng Ligand pro µg Membranprotein beim Einsatz von 8 µg/ml). Dagegen ist die Affinität für Remnants großer Chylomikronen zu endosomalen Membranen von Ethinylöstradiol-vorbehandelten Ratten stärker ausgeprägt als für Remnants kleiner Chylomikronen. Beim Einsatz von 4 µg Ligand pro ml Assayvolumen war die spezifische, durch LDL supprimierbare Bindung für Remnants großer Chylomikronen mit  $12,27 \pm 6,77$  ng Ligand pro µg Membranprotein geringgradig größer als für Remnants kleiner Chylomikronen, die  $9,34 \pm 3,77$  ng Ligand pro µg Membranprotein beträgt. Bei Verwendung von 8 µg Ligand betrug die spezifische, durch LDL supprimierbare Bindung für Remnants großer Chylomikronen  $17,63 \pm 7,20$  ng Ligand pro µg Membranprotein, für Remnants kleiner Chylomikronen  $14,64 \pm 4,15$  ng Ligand pro µg Membranprotein.

Zur Darstellung der Bindungskapazität beider Lipoproteine an endosomalen Membranen wurden Assays in aufsteigenden Konzentrationen durchgeführt.

### 3.1.2 Affinität von Remnants großer und kleiner Chylomikronen zu endosomalen Membranen

Eingesetzt wurde jeweils 40 µg Membranprotein in einem Volumen von 200 µl. Pro ml Assayvolumen wurden 2, 4, 6, 8, 10 und 12 µg Protein Ligand verwendet. Aus der direkt gemessenen, membrangebundenen Aktivität, wurde die gesamte Bindung errechnet. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 2 mg LDL (Protein) pro Assay bestimmt. Die Differenz dieser beiden Werte stellt die spezifische, durch LDL supprimierbare, Bindung dar. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

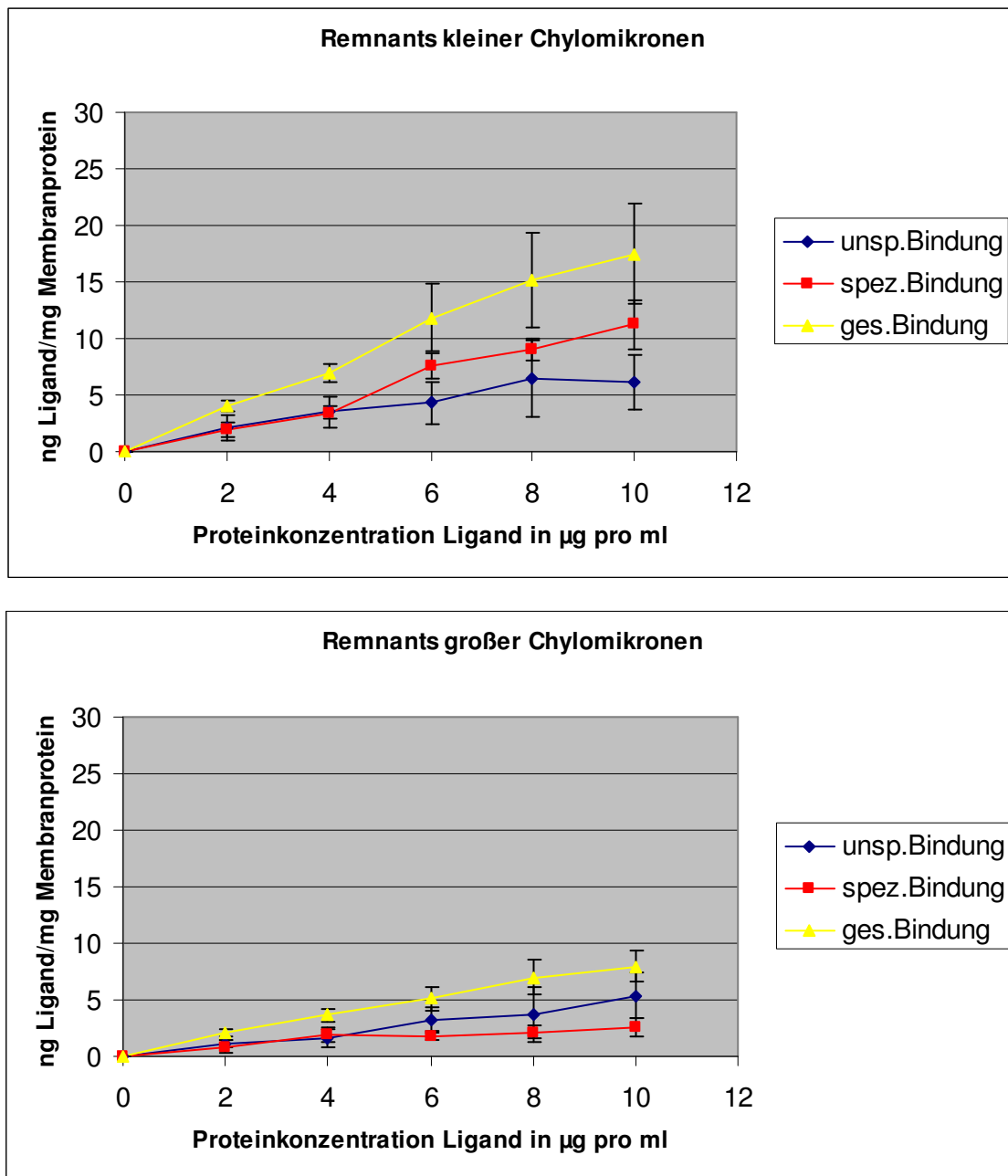


Abb. 3.2 Sättigungskinetik der Bindung von <sup>125</sup>J markierten Remnants großer und kleiner Chylomikronen an endosomalen Membranen von Lebern nicht vor-

**behandelter Ratten.** *Ausgewertet wurden 8 Versuche  $\pm$  SD. Die gesamte membrangebundene Menge des jeweiligen Liganden wurde in ng Ligand pro mg Membranprotein abgebildet (gelbe Linie). Die unspezifische Bindung (blaue Linie) wurde in Gegenwart von überschüssigen LDL gemessen. Hieraus konnte dann die spezifische Bindung errechnet werden (rote Linie).*

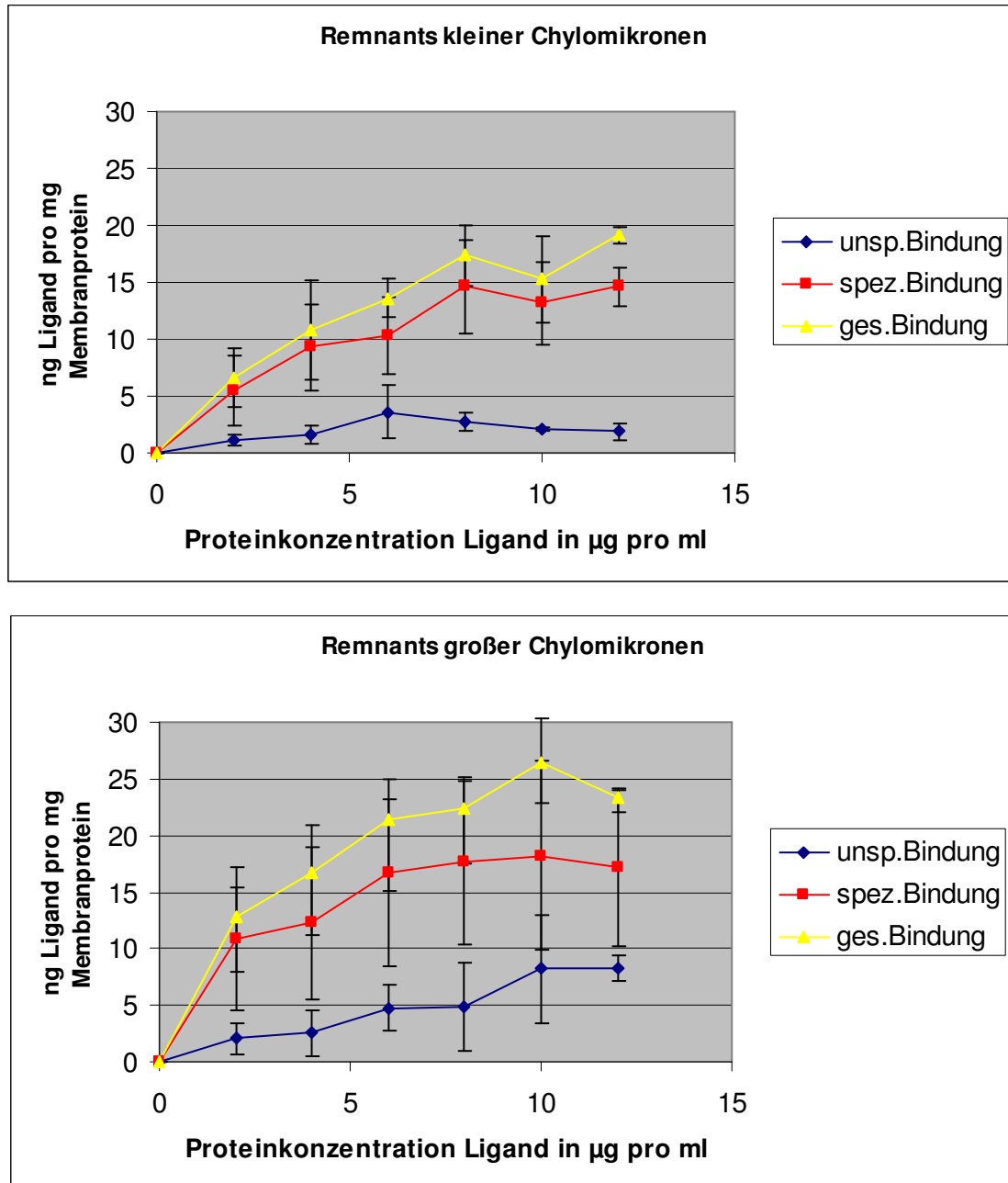
Für Remnants kleiner Chylomikronen zeigt sich ein nahezu linearer Anstieg der gesamten membrangebundenen Aktivität ( $4,00 \pm 0,54$  ng Ligand pro  $\mu\text{g}$  Membranprotein bei Einsatz von  $2 \mu\text{g/ml}$ , Anstieg bis auf  $17,50 \text{ ng} \pm 4,43$  ng Ligand pro  $\mu\text{g}$  Membranprotein bei Einsatz von  $12 \mu\text{g/ml}$ ). Mit zunehmender Ligandenkonzentration steigt auch die unspezifische, nicht durch LDL supprimierbare Bindung an ( $2,10 \pm 1,06$  ng Ligand pro  $\mu\text{g}$  Membranprotein bei Einsatz von  $2 \mu\text{g/ml}$ , Anstieg bis auf  $6,16 \text{ ng} \pm 2,39$  ng Ligand pro  $\mu\text{g}$  Membranprotein bei Einsatz von  $12 \mu\text{g/ml}$ ). Für Remnants großer Chylomikronen zeigt sich ebenfalls ein linearer Anstieg der gesamten membrangebundenen Bindung, die aber, im Vergleich zu der von Remnants kleiner Chylomikronen, geringer ausfällt ( $2,04 \pm 0,29$  ng Ligand pro  $\mu\text{g}$  Membranprotein bei Einsatz von  $2 \mu\text{g/ml}$ , Anstieg bis auf  $7,98 \text{ ng} \pm 1,34$  ng Ligand pro  $\mu\text{g}$  Membranprotein bei Einsatz von  $12 \mu\text{g/ml}$ ). Hier ist ebenfalls ein Anstieg der unspezifischen, nicht durch LDL supprimierbaren Bindung mit Zunahme des eingesetzten Liganden zu erkennen ( $1,16 \pm 0,36$  ng Ligand pro  $\mu\text{g}$  Membranprotein bei Einsatz von  $2 \mu\text{g/ml}$ , Anstieg bis auf  $5,36 \text{ ng} \pm 1,97$  ng Ligand pro  $\mu\text{g}$  Membranprotein bei Einsatz von  $12 \mu\text{g/ml}$ ).

Um die Affinität zum vermuteten LDL-Rezeptor deutlicher hervorzuheben, wurden Membranbindungassays in aufsteigender Konzentration an endosomalen Membranen von Ethinylöstradiol-vorbehandelten Ratten durchgeführt

### **3.1.3 Bindung von Remnants großer und kleiner Chylomikronen an den LDL-Rezeptor endosomaler Membranen der Rattenleber**

Zur Vergrößerung der LDL-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche wurde den Ratten drei Tage vor Präparation der Lebern täglich  $1 \text{ mg}$  Ethinylöstradiol pro  $200 \text{ g}$  Körpergewicht subkutan verabreicht. Anstelle des beta-VLDL wurde zu Beginn der Endosomenpräparation den Ratten  $3 \text{ mg}$  (Protein) LDL in die V. femoralis injiziert, die weitere Präparation der Membranen erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Ausgewertet wurden die Mittelwerte aus insgesamt 8 Assays, die mit  $40 \mu\text{g}$  Membranprotein in einem Volumen von  $200 \mu\text{l}$  durchgeführt wurden. Pro ml Assayvolumen wurden  $2, 4, 6, 8, 10$  und

12 µg Protein Ligand eingesetzt. Gemessen wurde die gesamte membrangebundene Bindung, die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 2 mg (Protein) LDL bestimmt. Aus der Differenz dieser beiden Werte konnte die spezifische, durch LDL supprimierbare Bindung errechnet werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

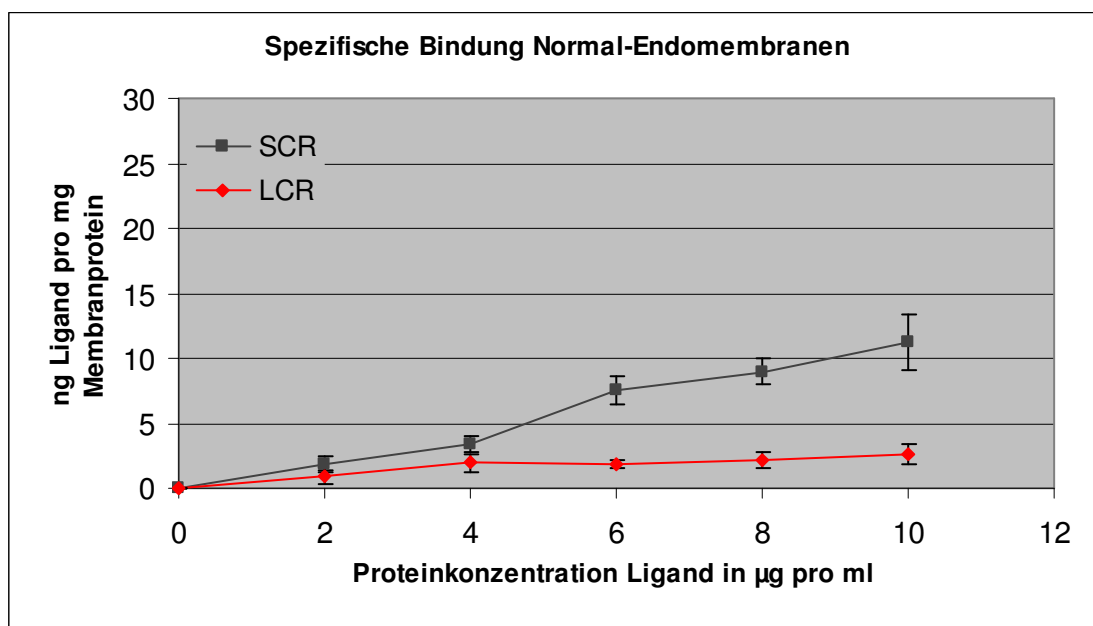


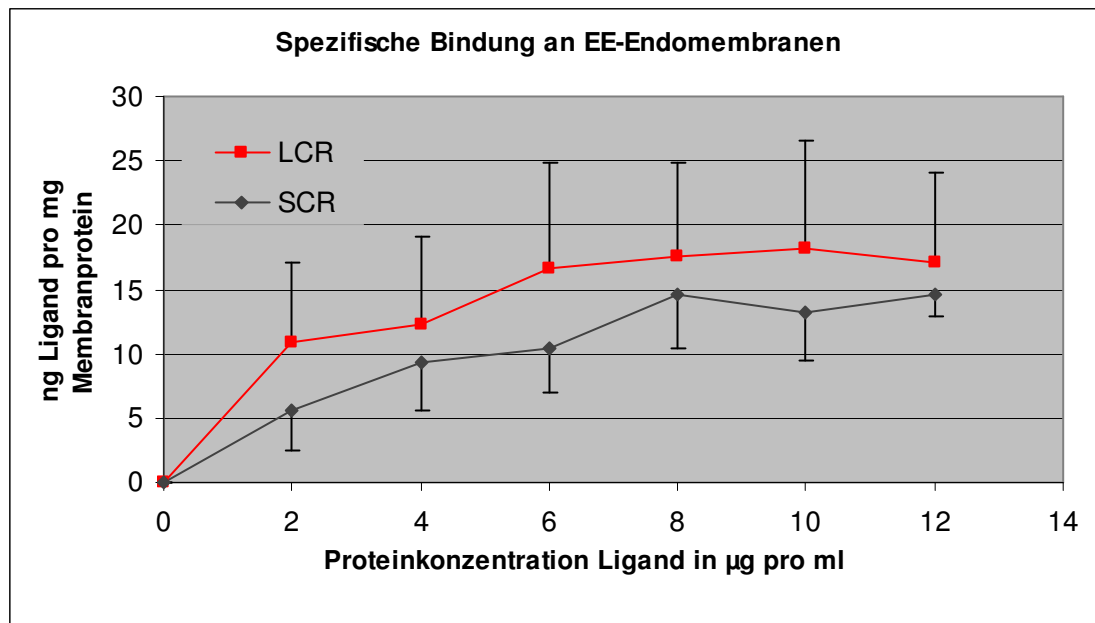
**Abb. 3.3 Sättigungskinetik der Bindung von <sup>125</sup>J markierten Remnants großer und kleiner Chylomikronen an endosomalen Membranen von Lebern Ethinylöstradiol-vorbehandelter Ratten.** Die gesamte membrangebundene Menge des jeweiligen Liganden wurde in ng Ligand pro mg Membranprotein gemessen (gelbe Linie). Die unspezifische Bindung (blaue Linie) wurde in Gegenwart von überschüssigen LDL gemessen. Hieraus konnte dann die spezifische, durch LDL supprimierbare Bin-

ung errechnet werden (rote Linie). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Versuchen  $\pm$  SD.

Durch vorherige Behandlung der Ratten mit Ethinylöstradiol konnte eine Steigerung der gesamten Bindung beobachtet werden, die für Remnants großer Chylomikronen deutlicher ausgeprägt ist, als für Remnants kleiner Chylomikronen (LCR:  $12,86 \pm 4,95$  ng Ligand pro  $\mu$ g Membranprotein bei Einsatz von  $2 \mu$ g/ml, Anstieg bis auf  $23,28 \pm 1,28$  ng Ligand pro  $\mu$ g Membranprotein bei Einsatz von  $12 \mu$ g/ml, SCR:  $6,60 \pm 2,59$  ng Ligand pro  $\mu$ g Membranprotein bei Einsatz von  $2 \mu$ g/ml, Anstieg bis auf  $19,13 \text{ ng} \pm 3,79$  ng Ligand pro  $\mu$ g Membranprotein bei Einsatz von  $12 \mu$ g/ml). Ferner erkennt man auch, daß für Remnants großer Chylomikronen die unspezifische, nicht durch LDL supprimierbare Bindung stärker ansteigt, als für Remnants kleiner Chylomikronen.

Die spezifische, durch LDL supprimierbare Bindung an endosomalen Membranen von Ethinylöstradiol-vorbehandelten Ratten ist für Remnants großer Chylomikronen größer als für Remnants kleiner Chylomikronen. Dieser Effekt ist in Abbildung 3.4 dargestellt.





**Abb. 3.4 Einfluss der LDL-Rezeptordichte auf das Bindungsverhalten großer und kleiner Chylomikronen an endosomalen Membranen.** Dargestellt sind die Mittelwerte ( $n=8 \pm SD$ ) der spezifischen, durch LDL supprimierbaren Bindung für Remnants großer Chylomikronen (LCR) sowie für Remnants kleiner Chylomikronen (SCR) an endosomalen Membranen nicht vorbehandelter Ratten (Normal-Endomembranen) sowie an endosomalen Membranen von Ethinylöstradiol-vorbehandelten Ratten (EE-Endomembranen).

Während an endosomalen Membranen nicht vorbehandelter Ratten (Normal-Endomembranen) die spezifische Bindung von Remnants kleiner Chylomikronen mit zunehmender Ligandenkonzentration noch keine Sättigung zeigt (SCR:  $1,91 \pm 0,61$  ng Ligand pro µg Membranprotein bei Einsatz von 2 µg/ml, Anstieg bis auf  $11,25 \pm 2,14$  ng Ligand pro µg Membranprotein bei Einsatz von 12 µg/ml), wird diese für Remnants großer Chylomikronen im Bereich höherer Ligandenkonzentrationen bereits erreicht (LCR:  $0,88 \pm 0,51$  ng Ligand pro µg Membranprotein bei Einsatz von 2 µg/ml, Anstieg bis auf  $2,58 \pm 0,74$  ng Ligand pro µg Membranprotein bei Einsatz von 12 µg/ml).

An endosomalen Membranen von Ethinylöstradiol-vorbehandelten Ratten (EE-Endomembranen) zeigt sich für Remnants großer Chylomikronen eine stärkere spezifische, durch LDL supprimierbare Bindung, als für Remnants kleiner Chylomikronen (LCR:  $10,80 \pm 6,33$  ng Ligand pro µg Membranprotein bei Einsatz von 2 µg/ml, Anstieg bis auf  $17,17 \pm 6,97$  ng Ligand pro µg Membranprotein bei Einsatz von 12 µg/ml, SCR:  $5,52 \pm 3,03$  ng Ligand pro µg Membranprotein bei Einsatz von 2 µg/ml, Anstieg bis auf  $14,67 \pm 1,67$  ng Ligand pro µg Membranprotein bei Einsatz von 12 µg/ml).

## 3.2 Einsatz von $^3\text{H}$ Cholesterin-markierten Remnants an endosomalen Membranen der Rattenleber

Da bei Verwendung von  $^{125}\text{J}$  außer den Apolipoproteinen auch der Lipidanteil der Lipoproteine markiert wird und geringe Mengen freies  $^{125}\text{J}$  die Lipoproteine kontaminiert, wurden Kontrollexperimente mit der aufwendigeren in vivo Markierung mit  $^3\text{H}$  Cholesterin als stabileren Isotop durchgeführt. Zur Präparation radioaktiv markierter Chylomikronen wurde bei der Gewinnung der Lymphe bereits der Nährlösung  $^3\text{H}$  Cholesterin beigemischt. Die anschließende Präparation der Remnants erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben. Ein weiterer Präparationsschritt zur anschließenden radioaktiven Markierung konnte somit entfallen.

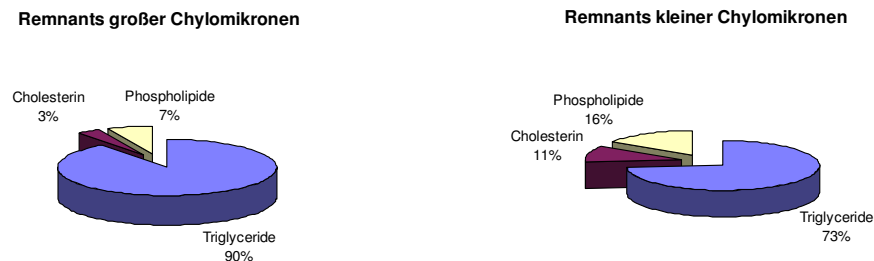


Abb. 3.5 Lipidverteilung von  $^3\text{H}$  Cholesterin-markierten Remnants großer und kleiner Chylomikronen aus 8 verschiedenen Präparationen

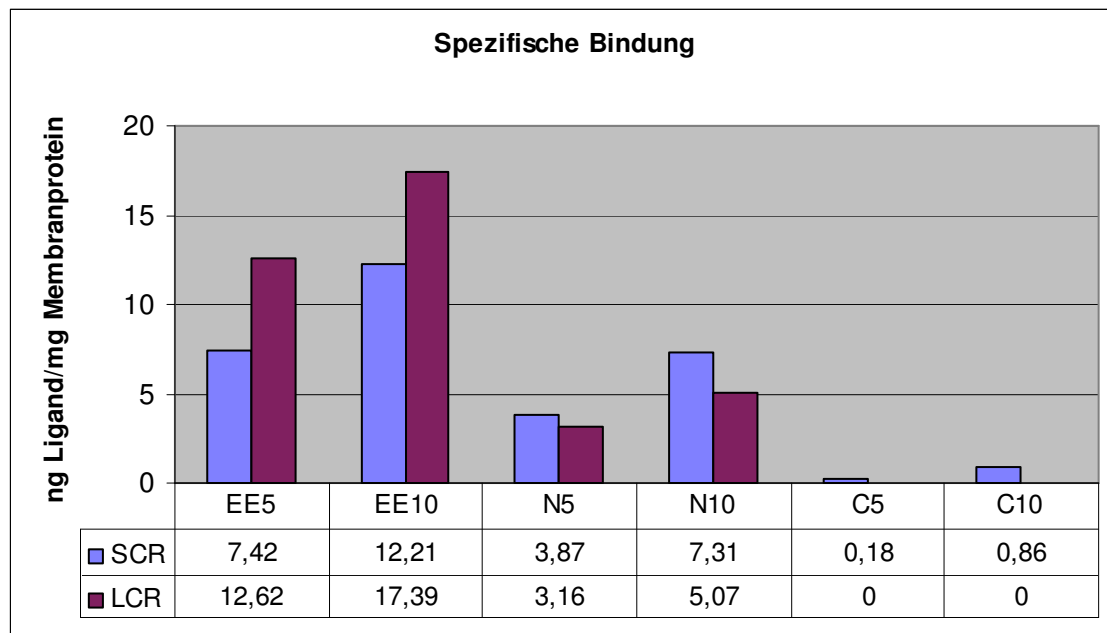
### 3.2.1 Membranbindungsassays mit $^3\text{H}$ Cholesterin-markierten Remnants an hepatozellulären Membranen von Lebern Ethinylöstradiol-vorbehandelter und nicht vorbehandelter Ratten

Es wurden Bindungsassays an endosomalen Membranen von Ethinylöstradiol-vorbehandelten Ratten (EE-Endomembranen), endosomalen Membranen nicht vorbehandelter Ratten (Normal-Endomembranen), sowie an nicht vorbehandelten Membranen der gesamten Leber (Crude-Membranen) mit Konzentrationen von 5 bzw. 10  $\mu\text{g}$  Cholesterin pro ml durchgeführt. Um eine für die Messung ausreichend große Menge membrangebundener Radioaktivität in den Assays zu erzielen, wurden unterschiedlich hohe Konzentrationen an Membranprotein wie in Tabelle 1.1 eingesetzt. Die Ergebnisse von 2 Versuchen sind in Abbildung 3.6 dargestellt



EE-Endomembranen	40µg/ml bei Einsatz von 10µg/ml Ligand
	80µg/ml bei Einsatz von 5µg/ml Ligand
Normal-Endomembranen	150 µg/ml bei Einsatz von 10µg/ml Ligand
	300 µg/ml bei Einsatz von 5µg/ml Ligand
Crude-Membranen	500µg/ml bei Einsatz von 10µg/ml Ligand
	1000µg/ml bei Einsatz von 5µg/ml Ligand

**Tabelle 3.1 Eingesetzte Menge Membranprotein**



**Abb. 3.6 Vergleich der spezifischen Bindung von <sup>3</sup>H Cholesterin-markierten Remnants kleiner Chylomikronen (SCR) und großer Chylomikronen (LCR) an endosomalen Membranen.** Ermittelt wurde die nicht durch LDL supprimierbare Bindung für jeweils 5 bzw. 10 µg Cholesterin pro ml Assayvolumen an endosomalen Membranen von Ethinylöstradiol-vorbehandelten Ratten (EE5 und EE10), endosomalen Membranen nicht vorbehandelter Ratten (N5 und N10), und unbehandelten Membranen der gesamten Rattenleber (C5 und C10). Gemessen wurde die gesamte membrangebundene Bindung. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 2 mg (Protein) LDL bestimmt. Aus der Differenz dieser beiden Werte konnte die spezifische, durch LDL supprimierbare Bindung errechnet werden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen in ng Cholesterin pro mg Membranprotein.

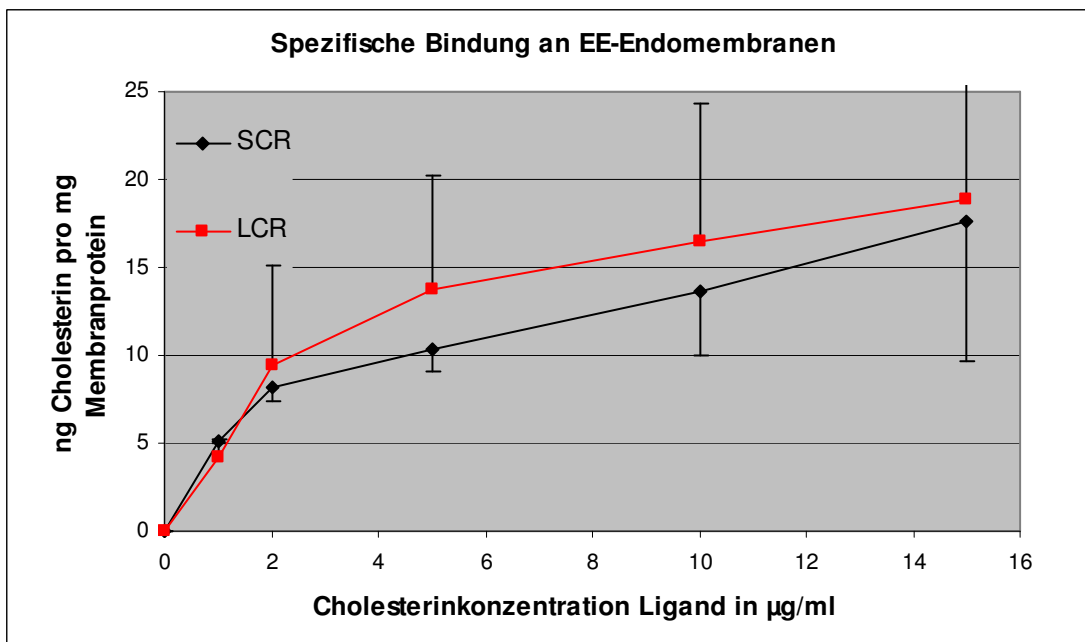
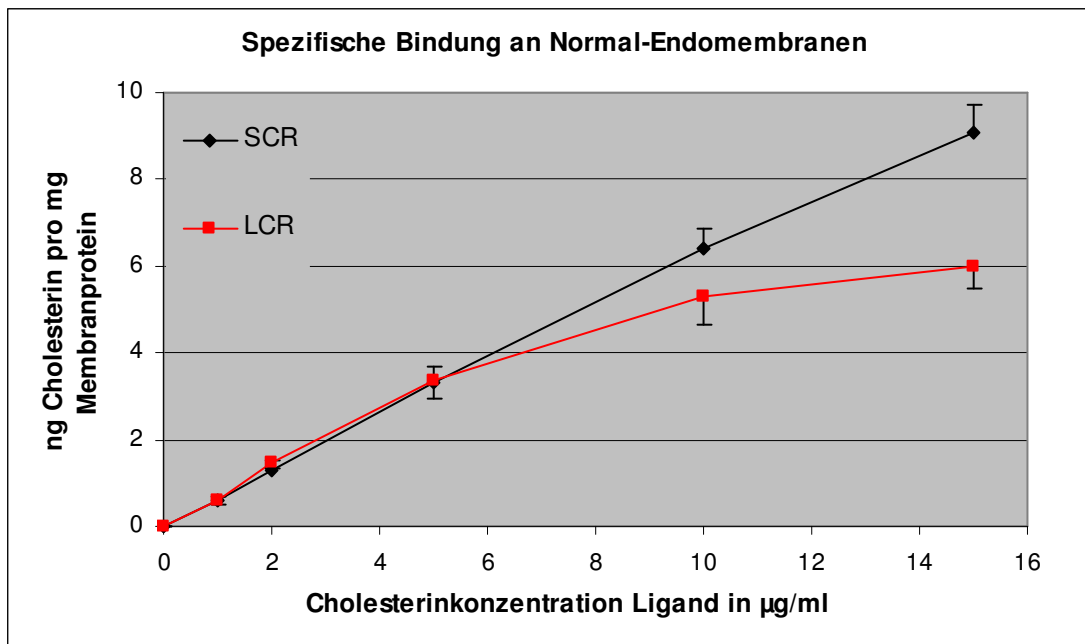
Die spezifische Bindung von Remnants kleiner Chylomikronen an endosomalen Membranen nicht vorbehandelter Ratten ist stärker ausgeprägt als von Remnants großer Chylomikronen. (SCR: 3,87 ng Cholesterin pro µg Membranprotein bei Einsatz von 5 µg/ml, 7,31 ng Ligand pro µg Membranprotein bei Einsatz von 10 µg/ml, LCR: 3,16 ng Cholesterin pro µg Membranprotein bei Einsatz von 5 µg/ml, 5,07 ng Cholesterin pro µg Membranprotein bei Einsatz von 10 µg/ml).

An endosomalen Membranen von Ethinylöstradiol-vorbehandelten Ratten dagegen ist die spezifische Bindung von Remnants großer Chylomikronen stärker ausgeprägt als von Remnants kleiner Chylomikronen (LCR: 12,62 ng Cholesterin pro mg Membranprotein beim Einsatz von 5 µg/ml, 17,39 ng Cholesterin pro mg Membranprotein beim Einsatz von 10 µg/ml, SCR 7,42 ng Cholesterin pro mg Membranprotein beim Einsatz von 5 µg/ml, 12,21 ng Cholesterin pro mg Membranprotein beim Einsatz von 10 µg/ml).

Durch vorherige Behandlung der Ratten mit Ethinylöstradiol konnte insgesamt eine Steigerung der Bindungskapazität zur Zelloberfläche erzielt werden, die für Remnants großer Chylomikronen stärker ausgeprägt ist als für Remnants kleiner Chylomikronen. Zum Vergleichen der Aktivität am vermuteten LDL-Rezeptor, wurden Bindungskurven mit <sup>3</sup>H Cholesterin-markierten Remnants in aufsteigender Ligandenkonzentration an endosomalen Membranen von Ethinylöstradiol-vorbehandelten Ratten mit denen an endosomalen Membranen nicht vorbehandelter Ratten verglichen.

### **3.2.2 Einfluss der LDL-Rezeptordichte auf die Bindung <sup>3</sup>H Cholesterin-markierter Remnants an endosomalen Membranen**

Um eine aussagekräftige Radioaktivität zu erzielen, mußten einige Parameter der Bindungsassays modifiziert werden. So wurde pro Assay 80 µg anstelle von 40 µg Membranprotein verwendet und das zu zählende Volumen wurde von 50 auf 90 µl erhöht. Eingesetzt wurden jeweils 1,2,5,10 und 15 µg Cholesterin pro ml. Die gesamte membran-gebundene, sowie die durch LDL-Überschuss supprimierbare Aktivität wurden direkt gemessen, hieraus wurde die spezifische Bindung der Liganden errechnet.



**Abb. 3.7** Einfluß der LDL-Rezeptordichte auf das Bindungsverhalten von  $^3\text{H}$  Cholesterin-markierten Remnants großer und kleiner Chylomikronen an endosomalen Membranen. Dargestellt wird die spezifische, durch LDL supprimierbare Bindung von  $^3\text{H}$  Cholesterin-markierten Remnants kleiner Chylomikronen (SCR) und großer Chylomikronen (LCR) an endosomalen Membranen nicht vorbehandelter Ratten (Normal-Endomembranen) und endosomalen Membranen von Ethinylöstradiolvorbehandelten Ratten (EE-Endomembranen). Eingesetzt wurden jeweils 1, 2, 5, 10 und 15  $\mu\text{g}$  Cholesterin Ligand pro ml Assayvolumen. sowie 80  $\mu\text{g}$  Membranprotein pro Assay. Ausgewertet wurden 6 Versuche  $\pm$  SD.

An endosomalen Membranen nicht vorbehandelter Ratten gibt es im Bereich geringer Ligandenkonzentration keine nennenswerten Unterschiede im spezifischen Bindungsverhalten für Remnants sowohl großer, als auch kleiner Chylomikronen (SCR: 0,61 ng Cholesterin pro mg Membranprotein, LCR: 0,62 ng Cholesterin pro mg Membranprotein bei Einsatz von 1 µg/ml, SCR: 1,27 ng Cholesterin pro mg Membranprotein, LCR: 1,49 ng Cholesterin pro mg Membranprotein bei Einsatz von 2 µg/ml, SCR: 3,29 ng Cholesterin pro mg Membranprotein, LCR: 3,36 ng Cholesterin pro mg Membranprotein bei Einsatz von 5 µg/ml). Erst bei weiter ansteigender Ligandenkonzentration nimmt die Bindungskapazität von Remnants kleiner Chylomikronen stärker zu, als die der großen (SCR:  $9,06 \pm 0,64$  ng Cholesterin pro µg Membranprotein, LCR:  $6,00 \pm 0,53$  ng Cholesterin pro µg Membranprotein bei Einsatz von 15 µg/ml).

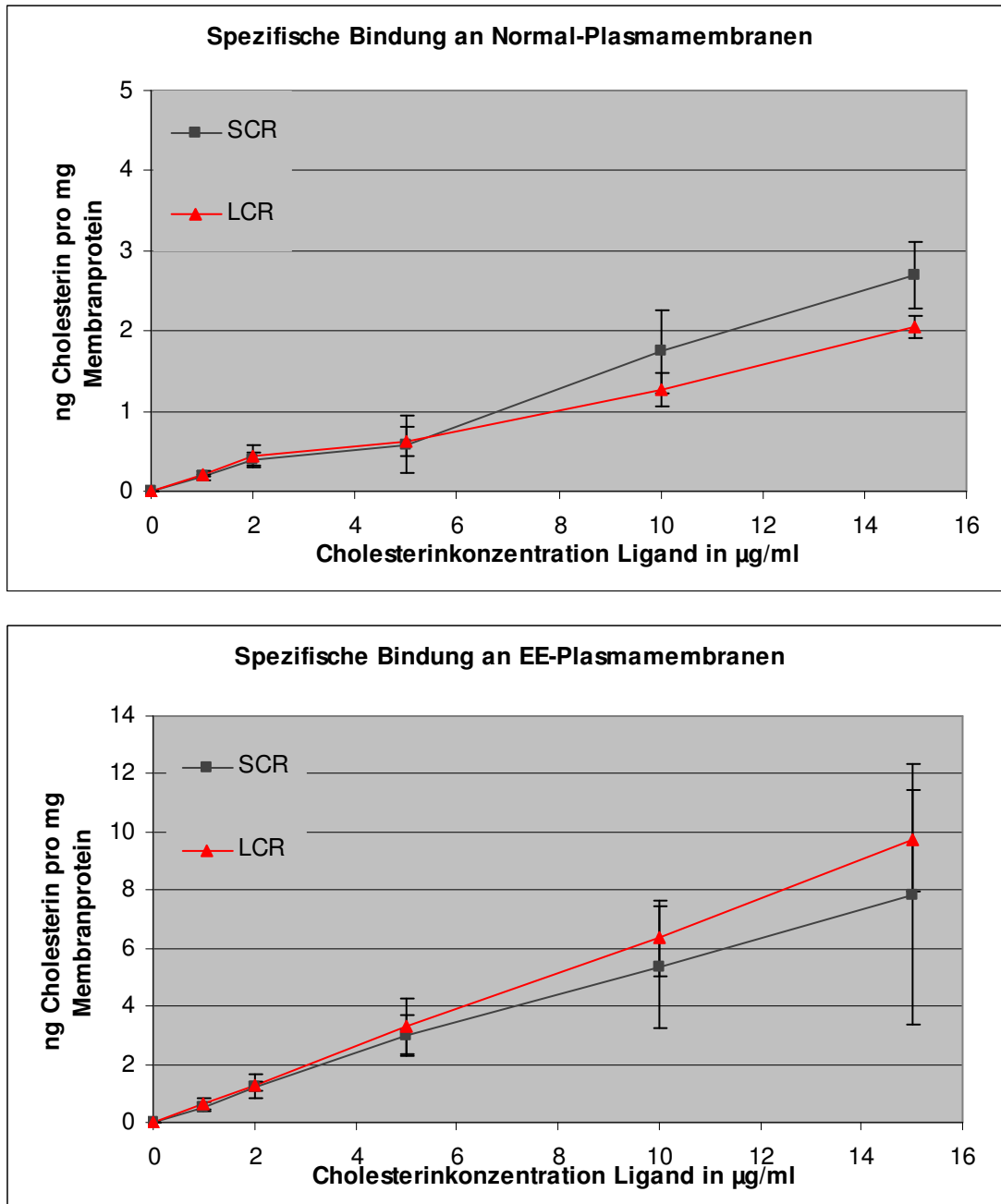
Die vorherige Behandlung der Ratten mit Ethinylöstradiol führt zu einer Steigerung der spezifischen, durch LDL supprimierbaren Bindung für Remnants großer und kleiner Chylomikronen (SCR: 5,14 ng Cholesterin pro mg Membranprotein, LCR: 4,23 ng Cholesterin pro mg Membranprotein bei Einsatz von 1 µg Ligand; SCR: 8,24 ng Cholesterin pro mg Membranprotein, LCR: 9,45 ng Cholesterin pro mg Membranprotein bei Einsatz von 2 µg Ligand). Ab einer Ligandenkonzentration von 5 µg Cholesterin pro ml ist die Bindung für Remnants großer Chylomikronen geringfügig stärker ausgeprägt, als für Remnants kleiner Chylomikronen (SCR: 10,39 ng Cholesterin pro mg Membranprotein, LCR: 13,72 ng Cholesterin pro mg Membranprotein beim Einsatz von 5 µg/ml, SCR: 13,68 ng Cholesterin pro mg Membranprotein, LCR: 16,51 ng Cholesterin pro mg Membranprotein beim Einsatz von 10 µg/ml, SCR: 17,57 ng Cholesterin pro mg Membranprotein, LCR 18,84,72 ng Cholesterin pro mg Membranprotein beim Einsatz von 15 µg/ml).

Welchen Einfluss die vorherige Behandlung der Ratten mit Ethinylöstradiol auf das Bindungsvermögen von Remnants an Plasmamembranen ausübt, wird im folgenden Kapitel untersucht.

### **3.2.3 Einfluß der LDL-Rezeptordichte auf die Bindung <sup>3</sup>H Cholesterin-markierter Remnants an Plasmamembranen**

An Plasmamembranen nicht vorbehandelter Ratten ist kein nennenswerter Unterschied im spezifischen Bindungsverhalten von Remnants sowohl großer, als auch kleiner Chylomikronen erkennbar (SCR:  $0,19 \pm 0,01$  ng Cholesterin pro µg Membranprotein bei Einsatz von 1 µg/ml, Anstieg bis auf  $2,7 \pm 0,41$  ng Cholesterin pro µg Membranprotein

bei Einsatz von 15  $\mu\text{g/ml}$ , LCR:  $0,2 \pm 0,05$  ng Cholesterin pro  $\mu\text{g}$  Membranprotein bei Einsatz von 1  $\mu\text{g/ml}$ , linearer Anstieg bis auf  $2,04 \text{ ng} \pm 0,14$  ng Cholesterin pro  $\mu\text{g}$  Membranprotein bei Einsatz von 15  $\mu\text{g/ml}$ ). Dargestellt sind die Ergebnisse in Abbildung 3.8



**Abb. 3.8 Einfluss der LDL-Rezeptordichte auf das Bindungsverhalten von  $^3\text{H}$  Cholesterin-markierten Remnants großer und kleiner Chylomikronen an Plasmamembranen.** Aus 6 Versuchen  $\pm$  SD wurde die spezifische, durch LDL supprimierbare Bindung von  $^3\text{H}$  Cholesterin-markierten Remnants kleiner Chylomikronen (SCR) und großer Chylomikronen (LCR) an Plasmamembranen von Ethinylöstradiol-vorbehandelten Ratten (EE-Plasmamembranen) und Plasmamembranen nicht vorbehandelter Ratten (Normal-Plasmamembranen) verglichen. Eingesetzt wurden jeweils 1, 2, 5,

*10 und 15 µg Cholesterin Ligand pro ml Assayvolumen sowie 400 µg Membranprotein pro Assay.*

Durch vorherige Behandlung der Ratten mit Ethinylöstradiol konnte auch zu Plasmamembranen eine Steigerung der Affinität für Remnants großer und kleiner Chylomikronen erzielt werden. Der Effekt hier ist aber insgesamt schwächer als der an endosomalen Membranen (Abb.3.7: Spezifische Bindung SCR:  $0,53 \pm 0,17$  ng Cholesterin pro µg Membranprotein bei Einsatz von 1 µg/ml, linearer Anstieg bis auf  $7,84 \pm 4,49$  ng Cholesterin pro µg Membranprotein bei Einsatz von 15 µg/ml, Spezifische Bindung LCR:  $0,65 \pm 0,17$  ng Cholesterin pro µg Membranprotein bei Einsatz von 1 µg/ml, Anstieg bis auf  $9,72 \pm 1,76$  ng Cholesterin pro µg Membranprotein bei Einsatz von 15 µg/ml).

# 4 Diskussion

## 4.1 Lipoproteinstoffwechsel der Remnants

Ziel dieser Arbeit war es, die Bindungskapazität für Remnants großer Chylomikronen am LDL-Rezeptor hepatozellulärer Membranen zu ermitteln, und mit der von Remnants kleiner Chylomikronen zu vergleichen. Aus vorherigen Experimenten ist bekannt, dass die Aufnahme von Remnants der Chylomikronen über den LDL-Rezeptor erfolgen kann [34,38]. Hierbei scheinen die hepatische Lipase und Apolipoproteine der Klasse E einen förderlichen Effekt zu haben [108], während Apolipoproteine der Klasse C eher inhibitorisch wirksam sind [111]. Aber nicht nur die biochemische Zusammensetzung, auch die Größe scheint einen Einfluss auf die Bindung an zelluläre Strukturen zu haben. So konnte gezeigt werden, dass nach erfolgter Lipolyse Remnants mit kleinerem Durchmesser und größerer Dichte eine stärkere Affinität zur Zelloberfläche aufweisen, als solche mit größerem Durchmesser und geringerer Dichte [99]. Es wird angenommen, dass dieses durch die bessere Erreichbarkeit des Apolipoprotein E ermöglicht wird. Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass es für Remnants sowohl großer, als auch kleiner Chylomikronen Parallelen in Bezug auf die Apolipoprotein E vermittelte Bindung an der Zelloberfläche gibt.

Um zunächst Hinweise darauf zu erlangen, welche Rezeptoren als mögliche Bindungsstelle dienen können, wurden in Vorversuchen Ligandenblotts mit radioaktiv markierten Remnants an endosomalen Membranen durchgeführt. Hier zeigten sich deutliche Übereinstimmungen der Bandenmuster beider Liganden im Bereich des bekannten LDL-Rezeptors [97], zum geringeren Teil auch im Bereich des Asialoglykoproteinrezeptors, sowie der hepatischen Lipase, die beide ebenfalls als Bindungsstellen für Lipoproteine in Betracht kommen [52, 117]. Es scheint so, daß Remnants großer Chylomikronen in vitro in ähnlich großem Umfang eine Bindung am LDL-Rezeptor eingehen können, wie Remnants von kleinen Chylomikronen.

Um dieses zu beweisen, musste das Ausmaß der Bindungskapazität genauer quantifiziert werden. Hierfür wurden in der weiteren Suchphase Membranbindungsassays an diversen hepatozellulären Membranen unter identischen Bedingungen durchgeführt, auf deren Zelloberfläche die Dichte des bekannten LDL-Rezeptors, der bereits in vorherigen Versuchen als mögliche Bindungsstelle für Remnants von Chylomikronen identifiziert wurde [118], unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

## **4.2 Aktivität <sup>125</sup>J markierter Remnants großer und kleiner Chylomikronen zum vermuteten LDL-Rezeptor endosomaler Membranen.**

An nicht aufgereinigten Leberzellmembranen, auf denen nur geringe Mengen des bekannten LDL-Rezeptors nachzuweisen sind [119], war kein Unterschied im Bindungsverhalten von Remnants großer und kleiner Chylomikronen zu ermitteln. Auch konnte durch exzessiven LDL Überschuss keine Suppression der Bindungskapazität erzielt werden. Im Gegensatz hierzu wurde an endosomalen Membranen, an denen eine größere LDL-Rezeptordichte vorliegt [45], eine höhere, und besser durch LDL supprimierbare Bindung ermittelt. In diesem Fall zeigt sich für Remnants kleiner Chylomikronen nur eine geringgradig größere Bindung als für Remnants großer Chylomikronen. Die stärkste und am deutlichsten durch LDL supprimierbare Bindungskapazität konnte an endosomalen Membranen von Lebern Ethinylöstradiol-vorbehandelter Ratten nachgewiesen werden. Bekanntermaßen kann die LDL-Rezeptordichte unter Östrogen einfluss um den Faktor 10 gesteigert werden [115]. Auch in unseren Versuchen konnte für Remnants großer Chylomikronen eine etwas stärkere rezeptorabhängige Bindung nachgewiesen werden, als für Remnants kleiner Chylomikronen. Insgesamt aber lassen sich auch hier keine deutlichen Unterschiede im Bindungsverhalten beider Liganden erkennen.

Die Ergebnisse der letzteren Versuche haben gezeigt, dass Remnants großer und kleiner Chylomikronen am LDL-Rezeptor in vitro in ähnlich großem Umfang binden können. Dass dieses in vivo nicht möglich ist, kann durch mehrere Ursachen bedingt sein. Es ist postuliert worden, dass Lipoproteine vor der rezeptorgebundenen Aufnahme in die Hepatozyten zunächst die Fenestration der Sinusoide passieren müssen, bevor sie in Interaktion mit dem LDL-Rezeptor treten können [121]. Großvolumigen Partikeln wie z.B. Chylomikronen oder deren Remnants kann der Weg durch die Lebersinusoide allein durch ihre Größe versperrt sein. Durch die Präparation der Membranen werden diese strukturellen Hindernisse beseitigt, und alle vorhandenen möglichen Bindungsstellen dem Liganden besser zugänglich gemacht.

Auch die relativ kurze Passagezeit in vivo kann der Grund für die geringere Bindung von Remnants großer Chylomikronen zum LDL-Rezeptor sein. Der für die Bindung notwendige Anteil an Apolipoprotein E kann bei Lipoproteinen mit einem relativ hohen Triglyzeridanteil häufig verdeckt sein [99], so dass der kurzzeitige Kontakt in vivo unter



Umständen nicht ausreicht, um eine Bindung zum korrespondierenden Rezeptor herzustellen.

Ferner können auch, durch die weiterhin aktive Lipase, aus Remnants großer Chylomikronen kleinere Partikel mit hoher Dichte und relativ hohem Apolipoprotein-E Anteil entstehen, die in Ihrer Abmessung und Zusammensetzung nicht mehr den ursprünglich präparierten Lipoproteinen entsprechen. Veränderungen, die maßgeblich zur erhöhten Bindungsbereitschaft zum LDL-Rezeptor beitragen [99; 100] und somit ein unechtes Ergebnis widerspiegeln.

Darüber hinaus kann es, gerade bei einem Einsatz höherer Mengen an Radioaktivität zur unerwünschten Kontamination langkettiger Fettsäuren mit  $^{125}\text{J}$  kommen, so dass für Liganden mit einem hohen Anteil an Triglyzeriden bei der Ermittlung der Bindungsstärke oft falsch zu hohe Ergebnisse ermittelt werden. Durch Anwendung des  $^3\text{H}$ -Isotops sollte diese Fehlerquelle vermieden werden.

### **4.3 Vergleich der Bindungskapazität $^3\text{H}$ Cholesterin markierter Remnants großer und kleiner Chylomikronen an hepatozellulären Membranen**

In den Kontrollexperimenten mit  $^3\text{H}$  Cholesterin als radioaktiven Marker konnten die Ergebnisse, wie sie in den bisherigen Versuchen mit  $^{125}\text{J}$  markierten Remnants erhoben wurden, bestätigt werden. Die spezifische, durch LDL supprimierbare Bindung für Remnants kleiner Chylomikronen an endosomalen Membranen von Lebern nicht vorbehandelter Ratten ist geringgradig stärker ausgeprägt, als für Remnants großer Chylomikronen. An endosomalen Membranen von Lebern Ethinylöstradiol-vorbehandelter Ratten kann für Remnants großer und kleiner Chylomikronen die spezifische Bindung deutlich gesteigert werden. Auffällig ist, daß im Bereich geringer Ligandenkonzentrationen Remnants großer Chylomikronen eine etwas stärkere Affinität zum LDL-Rezeptor aufweisen, als Remnants kleiner Chylomikronen. Dieser Unterschied nimmt mit steigender Ligandenkonzentration stetig ab. An nicht vorbehandelten Plasmamembranen kann für Remnants großer und kleiner Chylomikronen kaum noch ein Unterschied hinsichtlich der LDL-Rezeptor-gebundenen Aktivität ermittelt werden. Bei ihnen kann ebenfalls durch vorherige Behandlung der Ratten mit Ethinylöstradiol eine Steigerung der Affinität erzielt werden; dieser Effekt ist aber insgesamt schwächer ausgeprägt als der an endosomalen Membranen.

## 4.4 Schlussfolgerung

An Membranen mit hoher LDL-Rezeptordichte kann auch für Remnants großer Chylomikronen in vitro eine hohe Bindungskapazität gemessen werden. Diese Bindung an den LDL-Rezeptor der Leber scheint im Gegensatz zu experimentellen Ergebnissen in vivo zu stehen. Für die hohe Bindung an den LDL-Rezeptor in vitro kann es mehrere Ursachen geben.

Die rezeptorvermittelte Aufnahme von Lipoproteinen durch Hepatozyten erfordert das Erreichen des Disse'schen Raums [102]. Während HDL Partikel diesen durch Transzytose erreichen, beschreiten Lipoproteine mit geringerer Dichte einen Weg hauptsächlich durch die sinusoidalen Fenestrations der Endothelien [103]. Durch die Präparation der Membranen können größere Mengen des LDL-Rezeptors freigelegt werden, die in vivo für Remnants großer Chylomikronen schwer, oder gar nicht zugänglich sind. Die sinusoidale Struktur in vivo, die nach der Membranpräparation beseitigt ist, könnte daher für die verzögerte Aufnahme von Remnants großer Chylomikronen in die Hepatozyten der intakten Leber verantwortlich sein.

Auch kann sich die verlängerte Expositionszeit der Liganden zu den Membranen, wie sie im Bindungsassay gegeben ist, als förderlich erweisen, während bei einmaliger Leberpassage in vivo deutlich weniger Zeit zur Verfügung steht, um eine Rezeptor-Ligandenbindung einzugehen. Die verlängerte Inkubationszeit im Assay kann von Vorteil für Lipoproteine mit großen Ausmaßen sein, bei denen der, für die Bindung erforderliche Anteil an Apolipoprotein E, durch den hohen Anteil an Neutralfetten verdeckt sein kann.

Ferner wird Östrogeneinfluss auch die Dichte anderer Zellen, wie z.B. der von „Kupffer'schen Sternzellen“ auf der Zelloberfläche vergrößert [105], die ebenfalls als mögliche Bindungsstelle dienen können [104]. Aber auch für bestimmte sinusoidale Endothelzellen konnte eine Beteiligung an der rezeptorvermittelten Endozytose diverser Lipoproteine nachgewiesen werden [106].

Es scheint also so, dass in vitro die Bindung von Remnants großer wie kleiner Chylomikronen an den LDL-Rezeptor möglich ist, in vivo aber die Strukturen des sinusoidalen Endothels und die Größe der sinusoidalen Fenestrations die Bindung von Remnants großer Chylomikronen behindern.

## 5 Zusammenfassung

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass in Ratten die Aufnahmerate von Remnants kleiner Chylomikronen in hepatozelluläre Endosomen mit der LDL-Rezeptordichte korreliert. In vivo werden Remnants großer Chylomikronen zwar schneller aus dem Plasma eliminiert, können aber erst später in den Endosomen nachgewiesen werden [62]. In welchem Umfang der LDL-Rezeptor als Bindungsstelle an der Endozytose beteiligt ist, war unbekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Remnants sowohl kleiner, als auch großer Chylomikronen mit hoher Affinität und Spezifität an endosomalen Membranen von Ratten binden. Die Bindungskapazität ist gering, aber eindeutig nachweisbar. Wenn die Ratten mit Ethinylöstradiol vorbehandelt waren, der LDL-Rezeptor also stimuliert worden war, war die Bindungskapazität für Remnants kleiner, wie auch großer Chylomikronen deutlich gesteigert.

Die Ergebnisse, die mit  $^{125}\text{J}$  markierten Lipoproteinen ermittelt wurden, ließen sich auch in Kontrollversuchen mit  $^3\text{H}$  Cholesterin als stabileren radioaktiven Marker bestätigen. Auch in diesem Fall führte die Aktivierung des LDL-Rezeptors zur höheren spezifischen Bindung von Remnants kleiner, als auch großer Chylomikronen. Dieser Effekt ließ sich auch an Plasmamembranen nachweisen, allerdings bei insgesamt geringerer Bindungskapazität.

Die verzögerte Endozytose von Remnants großer Chylomikronen in die Hepatozyten von intakten Rattenlebern, wie sie unter in vivo Bedingungen im Leberperfusionsmodell beobachtet wurde, scheint daher, nach diesen Ergebnissen, nicht auf eine zu geringe Affinität zum LDL-Rezeptor zu beruhen. Vielmehr könnte der zu geringe Durchmesser der sinusoidalen Fenestrations den direkten Kontakt von Remnants großer Chylomikronen mit den Hepatozyten erschweren.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Hamosh M, Klaeveman HL, Wolf RO, et al  
Pharyngeal lipase and digestion of dietary triglyceride in man. *J. Clin Invest* (United States), May 1975, 55(5) p908-13.
2. Schulthess G, Lipka G, Compassi S, et al  
Absorption of monoacylglycerols by small intestinal brush border membrane. *Biochemistry* (United States), Apr 19 1994, 33(15) p4500-8.
3. Scheibner J, Fuchs M, Hormann E, et al  
Complex feedback regulation of bile acid synthesis in the hamster: the role of newly synthesized cholesterol. *Hepatology* (United States), Jul 1999, 30(1) p230-7.
4. Yu KC, Jiang Y, Chen W, et al  
Rapid initial removal of chylomicron remnants by the mouse liver does not require hepatically localized apolipoprotein E. *J. Lipid Res* (United States), Nov 2000, 41(11) p1715-27.
5. van Greevenbroek MM, de Bruin TW  
Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* (Ireland), Dec 1998, 141 Suppl 1 pS9-16.
6. Isherwood SG, Williams CM, Gould BJ  
Apolipoprotein B-48 as a marker for chylomicrons and their remnants: studies in the postprandial state. *Proc. Nutr Soc* (England), Mar 1997, 56(1B) p497-505
7. Demant T, Seeberg K, Bedynek A, et al  
The metabolism of lipoprotein(a) and other apolipoprotein B-containing lipoproteins: a kinetic study in humans. *Atherosclerosis* (Ireland), Aug 2001, 157(2) p325-39.
8. Yamamura T  
Remnant lipoproteins. *Nippon Rinsho* (Japan), Feb 2001, 59 Suppl 2 p545-9

9. Hu YM, Xue H, Wang KQ  
Studies on the effect of lipoproteins and apoproteins on lipoprotein receptors. Isolation of lipoproteins and LDS by one-step ultracentrifugation. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao (China)*, Apr 1985, 7(2) p102-7.
10. Carvajal O, Nakayama M, Kishi T, et al  
Effect of medium-chain fatty acid positional distribution in dietary triacylglycerol on lymphatic lipid transport and chylomicron composition in rats. *Lipids (United States)*, Dec 2000, 35(12) p1345-51.
11. Windler E, Greeve J, Jackle S, et al  
Endocytic mechanisms for uptake and metabolism of chylomicron remnants in the liver. *Z. Gastroenterol (Germany)*, Jun 1996, 34 Suppl 3 p103-4.
12. Bjorkegren J, Karpe F, Milne RW, et al  
Differences in apolipoprotein and lipid composition between human chylomicron remnants and very low density lipoproteins isolated from fasting and postprandial plasma. *J Lipid Res (United States)*, Jul 1998, 39(7) p1412-20.
13. Sakr SW, Attia N, Haourigui M, et al  
Fatty acid composition of an oral load affects chylomicron size in human subjects. *Br. J. Nutr (England)*, Jan 1997, 77(1) p19-31
14. Borensztajn J, Kotlar TJ  
Liver uptake of chylomicron remnants with high and low apoprotein E:C ratios. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (United States)*, Sep 1984, 81(18) p5863-6.
15. Chang S, Zhang SH, Maeda N, et al  
Hepatic clearance of chylomicron remnants in mice lacking apoprotein E. *Biochim Biophys Acta (Netherlands)*, Nov 17 1994, 1215(1-2) p205-8.
16. Crawford SE, Borensztajn J  
Plasma clearance and liver uptake of chylomicron remnants generated by hepatic lipase lipolysis: evidence for a lactoferrin-sensitive and apolipoprotein E-independent pathway.

17. Yang LY, Kuksis A  
Size and composition of lymph chylomicrons following feeding corn oil or its fatty acid methyl esters. *Biochem Cell Biol (Canada)*, Jun 1987, 65(6) p514-24
18. Kalogeris TJ, Story JA  
Lymph chylomicron composition and size are modified by level of intestinally infused cholesterol and triglyceride source in rats. *J. Nutr. (United States)*, May 1992, 122(5) p1045-1048.
19. Hayashi H, Fujimoto K, Cardelli JA, et al  
Fat feeding increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine. *Am J Physiol (United States)*, Nov 1990, 259(5 Pt 1) pG709-19
20. Havel RJ, Kane JP  
Introduction, structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Stanbury JB, Wyngaarden JB et al. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. IncHealth Professions Division, 1995: 1841-1853.
21. Titov VN  
Lipoproteins as functional associates of protein-lipid complexes (literature review). *Klin. Lab. Diagn. (Russia)*, Jul 1997, (7) p13-9.
22. Alpers DH, Lock DR, Lancaster N, et al  
Distribution of apolipoproteins A-I and B among intestinal lipoproteins. *J Lipid Res (United States)*, Jan 1985, 26(1) p1-10.
23. Kowal RC, Herz J, Weisgraber KH, et al  
Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem (United States)*, Jun 25 1990, 265(18) p10771-9.
24. Shafi S, Brady SE, Bensadoun A, et al.  
Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in rat liver. *J Lipid Res (United States)*, Apr 1994, 35(4) p709-20.

25. Griglio S, Sultan F, Lagrange D  
Role of hepatic lipase in the catabolism of chylomicron remnants in the rat. *Diabete Metab (France)*, 1992, 18(1 Pt 2) p150-5.
26. Landin B, Nilsson A, Twu JS, et al.  
A role for hepatic lipase in chylomicron and high density lipoprotein phospholipid metabolism. *J Lipid Res (United States)*, Jun 1984, 25(6) p559-63.
27. Nilsson A, Chen Q, Dahlman E  
Metabolism of chylomicron phosphatidylinositol in the rat: fate in vivo and hydrolysis with lipoprotein lipase and hepatic lipase in vitro. *J Lipid Res (United States)*, Dec 1994, 35(12) p2151-60.
28. Boyle KE, Phillips MC, Lund-Katz S  
Kinetics and mechanism of exchange of apolipoprotein C-III molecules from very low density lipoprotein particles. *Biochim Biophys Acta (Netherlands)*, Mar 19 1999, 1430(2) p302-12.
29. Crawford SE, Borensztajn J  
Plasma clearance and liver uptake of chylomicron remnants generated by hepatic lipase lipolysis: evidence for a lactoferrin-sensitive and apolipoprotein E-independent pathway.
30. Hultin M, Olivecrona T  
Conversion of chylomicrons into remnants. *Atherosclerosis (Ireland)*, Dec 1998, 141 Suppl 1 pS25-9.
31. Cooper AD  
Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res (United States)*, Nov 1997, 38(11) p2173-92.
32. Karpe F, Humphreys SM, Samra JS, et al.  
Clearance of lipoprotein remnant particles in adipose tissue and muscle in humans. *J. Lipid Res (United States)*, Nov 1997, 38(11) p2335-43
33. Takahashi S, Suzuki J, Kohno M, Oida K, Tamai T, Miyabo S, Yamamoto T, Nakai T (1995) Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to

- the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 270:15747-15754.
34. Havel RJ  
Receptor and non-receptor mediated uptake of chylomicron remnants by the liver. *Atherosclerosis (Ireland)*, Dec 1998, 141 Suppl 1 pS1-7.
35. Fujioka Y, Cooper AD, Fong LG  
Multiple processes are involved in the uptake of chylomicron remnants by mouse peritoneal macrophages. *J Lipid Res (United States)*, Dec 1998, 39(12) p2339-49.
36. Pal S, Elsegood CL, Proctor SD, et al  
Detection of LDL receptor by ligand blotting with chylomicron remnants labelled with colloidal gold. *Ann. Clin. Biochem. (England)*, Jul 2000, 37 ( Pt 4) p471-8.
37. Yu KC, Jiang Y, Chen W, et al  
Evaluation of the components of the chylomicron remnant removal mechanism by use of the isolated perfused mouse liver. *J. Lipid. Res. (United States)*, Oct 1999, 40(10) p1899-910.
38. Havel RJ  
Chylomicron remnants: hepatic receptors and metabolism. *Curr. Opin. Lipidol (United States)*, Oct 1995, 6(5) p312-6.
39. Wade DP, Knight BL, Soutar AK  
Binding of low-density lipoprotein and chylomicron remnants to the hepatic low-density lipoprotein receptor of dogs, rats and rabbits demonstrated by ligand blotting. Failure to detect a distinct chylomicron-remnant-binding protein by ligand blotting. *Eur. J. Biochem. (Germany, West)*, Sep 1 1986, 159(2) p333-40.
40. Freeman MW Macrophage scavenger receptors. 1994 *Curr Opin Lipidol* 5:143-148
41. Mamo JC, Elsegood CL, Gennat HC, et al.  
Degradation of chylomicron remnants by macrophages occurs via phagocytosis. *Biochemistry (United States)*, Aug 6 1996, 35(31) p10210-4.



42. Sambrano GR, Steinberg D  
Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:1396-1400.
43. Jones AL, Hradek GT, Hornick C, et al  
Uptake and processing of remnants of chylomicrons and very low density lipoproteins by rat liver. J Lipid Res (United States), Nov 1984, 25(11) p1151-8.
44. Jaeckle S, Brady Se, Havel RJ  
Membrane binding sites for plasma lipoproteins on endosomes from rat liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (United States), Mar 1989, 86(6) p1880-4.
45. Belcher JD, Hamilton RL, Brady SE, et al  
Isolation and characterization of three endosomal fractions from the liver of estradiol-treated rats. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (United States), Oct 1987, 84(19) p6785-9.
46. Hammond TG, Goda FO, Navar GL, et al  
Membrane potential mediates H(+)-ATPase dependence of degradative pathway endosomal fusion. J Membr Biol (United States), Mar 15 1998, 162(2) p157-67.
47. Luzio JP, Mullock BM, Pryor PR, et al  
Relationship between endosomes and lysosomes. Biochem. Soc. Trans. (England) Aug. 2001, 29(Pt 4) p476-80
48. Luzio JP, Rous BA, Bright NA, et al  
Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. J. Cell. Sci. (England), May 2000, 113 ( Pt 9) p1515-24.
49. Kadowaki H, Patton GM, Robins SJ  
Metabolism of high density lipoprotein lipids by the rat liver: evidence for participation of hepatic lipase in the uptake of cholesteryl ester. J. Lipid Res. (United States), Nov 1992, 33(11) p1689-98.

50. Choi SY, Goldberg IJ, Curtiss LK, et al  
Interaction between ApoB and hepatic lipase mediates the uptake of ApoB-containing lipoproteins. *J. Biol Chem (United States)*, Aug 7 1998, 273(32) p20456-65.
51. Krapp A, Ahle S, Kersting S, et al  
Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor-related protein (LRP). *J Lipid Res (United States)*, May 1996, 37(5) p926-38.
52. Diard P, Malewiak MI, Lagrange D, et al  
Hepatic lipase may act as a ligand in the uptake of artificial chylomicron remnant-like particles by isolated rat hepatocytes. *Biochem. J. (England)*, May 1 1994, 299 ( Pt 3) p889.
53. Crawford SE, Borensztajn J  
Plasma clearance and liver uptake of chylomicron remnants generated by hepatic lipase lipolysis: evidence for a lactoferrin-sensitive and apolipoprotein E-independent pathway. *J Lipid Res (United States)*, May 1999, 40(5) p797-805.
54. de Faria E, Fong LG, Komaromy M, et al  
Relative roles of the LDL receptor, the LDL receptor-like protein, and hepatic lipase in chylomicron remnant removal by the liver. *J. Lipid Res (United States)*, Jan 1996, 37(1) p197-209.
55. Chang S, Borensztajn J  
Uptake of chylomicron remnants and hepatic lipase-treated chylomicrons by a non-transformed murine hepatocyte cell line in culture. *Biochim Biophys Acta (Netherlands)*, Apr 28 1995, 1256(1) p81-7.
56. Sugiyama T, Kumagai H, Morikawa Y, et al  
A novel low-density lipoprotein receptor-related protein mediating cellular uptake of apolipoprotein E-enriched beta-VLDL in vitro. *Biochemistry (United States)*, Dec 26 2000, 39(51) p15817-25.
57. Reblin T, Niemeier A, Meyer N, et al  
Cellular uptake of lipoprotein[a] by mouse embryonic fibroblasts via the LDL re-

- ceptor and the LDL receptor-related protein. *J. Lipid. Res. (United States)*, Oct 1997, 38(10) p2103-10.
58. Krapp A, Ahle S, Kersting S, et al  
Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor-related protein (LRP). *J. Lipid. Res. (United States)*, May 1996, 37(5) p926-36.
59. 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. (United States)*, Jul 25 1993, 268(21) p15804.
60. Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, et al  
Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (United States)*, Aug 1989, 8615.
61. Beisiegel U, Krapp A, Weber W, Olivecrona G (1994)  
The role of alpha 2M receptor/LRP in chylomicron remnant metabolism. *Ann. N Y Acad. Sci.* 737:53-69.
62. Windler E, Greeve J, Robenek H, et al  
Differences in the mechanisms of uptake and endocytosis of small and large chylomicron remnants by rat liver. *Hepatology (United States)*, Aug 1996, 24(2) p344-51.
63. Westerveld HE  
Estrogens and postprandial lipid metabolism. *Atherosclerosis (Ireland)*, Dec 1998, 141 Suppl 1 pS105.
64. Cooper AD, Nutik R, Chen J  
Characterization of the estrogen-induced lipoprotein receptor of rat liver. *J. Lipid. Res. (United States)*, Jan 1987, 28(1) p59-68.

65. Field PA, Gibbons GF  
Decreased hepatic expression of the low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL receptor-related protein in aging rats is associated with delayed clearance of chylomicrons from the circulation. *Metabolism (United States)*, Apr 2000, 49(4) p492-8.
66. Martins IJ, Hone E, Chi C, et al.  
Relative roles of LDLr and LRP in the metabolism of chylomicron remnants in genetically manipulated mice. *J. Lipid Res (United States)*, Feb 2000, 41(2) p205-13.
67. Yu KC, Chen W, Cooper AD  
LDL receptor-related protein mediates cell-surface clustering and hepatic sequestration of chylomicron remnants in LDLR-deficient mice. *J. Clin. Invest. (United States)*, Jun 2001, 107(11) p1387-94.
68. Jeon H, Shipley GG  
Localization of the N-terminal domain of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem. (United States)*, Sep 29 2000, 275(39) p30465-70.
69. Fisher CA, Narayanaswami V, Ryan RO  
The lipid-associated conformation of the low density lipoprotein receptor binding domain of human apolipoprotein E. *J. Biol. Chem. (United States)*, Oct 27 2000, 275(43) p33601-6.
70. Braddock DT, Mercurius KO, Subramanian RM, et al  
Conformationally specific enhancement of receptor-mediated LDL binding and internalization by peptide models of a conserved anionic N-terminal domain of human apolipoprotein E. *Biochemistry (United States)*, Nov 5 1996, 35(44) p13975-84.
71. Conserved C-terminal residues within the lectin-like domain of LOX-1 are essential for oxidized low-density-lipoprotein binding. *Biochem. J. (England)*, Apr 15 2001, 355(Pt 2) p289-96.

72. Endoplasmic reticulum localization of the low density lipoprotein receptor mediates presecretory degradation of apolipoprotein B. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* (United States), Apr 2 2002, 99(7) p4337-42.
73. Veniant MM, Zlot CH, Walzem RL, et al  
Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice. *J. Clin. Invest.* (United States), Oct 15 1998, 102(8) p1559-68.
74. Rudel LL, Kelley K, Sawyer JK, et al  
Dietary monounsaturated fatty acids promote aortic atherosclerosis in LDL receptor-null, human ApoB100-overexpressing transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (United States), Nov 1998, 18(11) p1818-27.
75. Murayama T, Yokode M, Horiuchi H, et al  
Overexpression of low density lipoprotein receptor eliminates apolipoprotein B100-containing lipoproteins from circulation and markedly prevents early atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* (Ireland), Dec 2000, 153(2) p295-302.
76. Mokuno H, Brady S, Kotite L, et al  
Effect of the 39-kDa receptor-associated protein on the hepatic uptake and endocytosis of chylomicron remnants and low density lipoproteins in the rat. *J Biol Chem* (United States), May 6 1994, 269(18) p13238-43.
77. Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, et al  
Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J* (England), Jun 1990, 9(6) p1769-76.
78. Lorent K, Overbergh L, Moechars D, et al.  
Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience* (England), Apr 1995, 65(4) p1009-25.

79. Strickland DK, Kounnas MZ, Argraves WS  
LDL receptor-related protein: a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism. *Faseb J.* (United States), Jul 1995, 9(10) p890-8.
80. Warshawsky I, Bu G, Schwartz AL  
39-kD protein inhibits tissue-type plasminogen activator clearance in vivo. *J. Clin. Invest.* (United States), Aug 1993, 92(2) p937-44.
81. Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A  
IDL, VLDL, chylomicrons and atherosclerosis. *Eur. J. Epidemiol* (Italy), May 1992, 8 Suppl 1 p92-8.
82. Proctor SD, Mamo JC  
Retention of fluorescent-labelled chylomicron remnants within the intima of the arterial wall--evidence that plaque cholesterol may be derived from post-prandial lipoproteins. *Eur. J. Clin. Invest.* (England), Jun 1998, 28(6) p497-503.
83. Murase T, Okubo M, Hara M  
Does chylomicronemia cause atherosclerosis? *Tohoku J Exp Med* (Japan), Feb 1991, 163(2) p129-34.
84. Yu KC, Mamo JC  
Chylomicron-remnant-induced foam cell formation and cytotoxicity: a possible mechanism of cell death in atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)* (England), Feb 2000, 98(2) p183-92.
85. van Vlijmen BJ, van Ree JH, Frants RR, et al  
Elevated levels of chylomicron- and VLDL-remnants leads to atherosclerosis in apoE transgenic mice. *Z. Gastroenterol* (Germany), Jun 1996, 34 Suppl 3 p113-5.
86. Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A  
IDL, VLDL, chylomicrons and atherosclerosis. *Eur J Epidemiol* (Italy), May 1992, 8 Suppl 1 p92-8.
87. Chang S, Maeda N, Borensztajn J  
The role of lipoprotein lipase and apoprotein E in the recognition of chylomi-

- crons and chylomicron remnants by cultured isolated mouse hepatocytes. *Biochem. J.* (England), Aug 15 1996, 318 ( Pt 1) p29-34.
88. Sehayek E  
Cellular metabolism of apoprotein-B containing lipoproteins: the role of apo-proteins, heparan sulfate and cellular receptors. *Isr. J. Med. Sci.* (Israel), Jun 1996, 32(6) p445-8.
89. Dietschy JM  
Theoretical considerations of what regulates low-density-lipoprotein and high-density-lipoprotein cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* (United States), May 1997, 65(5 Suppl) p1581-9.
90. Bierman EL, Oram JF  
The interaction of high-density lipoproteins with extrahepatic cells. *Am. Heart J.*(United States), Feb 1987, 113(2 Pt 2) p549-50.
91. Nevin P, Koelsch D, Mansbach CM  
Intestinal triacylglycerol storage pool size changes under differing physiological conditions. *J. Lipid. Res.* (United States), Nov 1995, 36(11) p2405-12.
92. Colvin PL  
Estrogen increases low-density lipoprotein receptor-independent catabolism of apolipoprotein B in hyperlipidemic rabbits. *Metabolism* (United States), Jul 1996, 45(7) p889-96.
93. Yu KC, Jiang Y, Chen W, et al  
Evaluation of the components of the chylomicron remnant removal mechanism by use of the isolated perfused mouse liver. *J. Lipid Res.* (United States), Oct 1999, 40(10) p1899-910.
94. Arbeeny CM, Rifici VA  
The uptake of chylomicron remnants and very low density lipoprotein remnants by the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* (United States), Aug 10 1984, 259(15) p9662-6.

95. Skottova N, Savonen R, Lookene A, et al.  
Lipoprotein lipase enhances removal of chylomicrons and chylomicron remnants by the perfused rat liver. *J. Lipid. Res. (United States)*, Jun 1995, 36(6) p1334-44
96. Nathan BP, Jiang Y, Wong GK, et al.  
Apolipoprotein E4 inhibits, and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult mouse cortical neurons through the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Brain. Res. (Netherlands)*, Feb 22 2002, 928(1-2) p96-105.
97. Kroon PA, Thompson GM, Chao YS  
A comparison of the low-density-lipoprotein receptor from bovine adrenal cortex, rabbit and rat liver and adrenal glands by lipoprotein blotting. *Biochem J. (England)*, Oct 15 1984, 223(2) p329-35.
98. Rudling MJ  
Role of the liver for the receptor-mediated catabolism of low-density lipoprotein in the 17 alpha-ethinylestradiol-treated rat. *Biochim Biophys Acta (Netherlands)*, Jun 2 1987, 919(2) p175-86.
99. Brasaemle DL, Cornely-Moss K, Bensadoun A  
Hepatic lipase treatment of chylomicron remnants increases exposure of apolipoprotein E. *J. Lipid Res. (United States)*, Mar 1993, 34(3) p455-65.
100. Hopkins GJ, Barter PJ  
Role of triglyceride-rich lipoproteins and hepatic lipase in determining the particle size and composition of high density lipoproteins. *J. Lipid Res (United States)*, Dec 1986, 27(12) p1265-77.
101. Granot E, Schwiigelshohn B, Tabas I, et al  
Effects of particle size on cell uptake of model triglyceride-rich particles with and without apoprotein E. *Biochemistry (United States)*, Dec 20 1994, 33(50) p15190-7.



102. van Berkel TJ, Kruijt JK, Nagelkerke JF, et al  
The receptor-mediated interaction of lipoproteins with liver cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* (United States), 1987, 210 p137-44.
103. Pravotorov GV, Usynin IF, Poliakov LM, et al  
The receptor-mediated endocytosis of complexes of colloidal gold with high-density lipoproteins by the sinusoidal cells of the isolated rat liver. *Tsitologiya* (Russia), 1993, 35(11-12) p42-5.
104. Mommaas-Kienhuis AM, Nagelkerke JF, Vermeer BJ, et al  
Visualization of the interaction of native and modified low density lipoproteins with isolated rat liver cells. *Eur. J. Cell. Biol.* (Germany, West), Jul 1985, 38(1) p42-50.
105. Franke H, Durer U, Schlag B, et al.  
In vivo binding and uptake of low-density lipoprotein-gold- and albumin-gold conjugates by parenchymal and sinusoidal cells of the fetal rat liver. *Cell Tissue Res* (Germany, West), Jul 1987, 249(1) p221-6.
106. Pitas RE, Boyles J, Mahley RW, et al.  
Uptake of chemically modified low density lipoproteins in vivo is mediated by specific endothelial cells. *J. Cell Biol.* (United States), Jan 1985, 100(1) p103-17.
107. Peterson GL  
A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* (United States), Dec 1977, 83(2) p346-56.
108. Windler E, Havel R J  
Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J Lipid Res.* 1985 May;26(5):556-65.
109. Hamilton RL, Goerke J, Guo LS, et al  
Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. *J Lipid Res* (United States), Nov 1980, 21(8) p981-92.

110. Pathak RK, Yokode M, Hammer RE, et al.  
Tissue-specific sorting of the human LDL receptor in polarized epithelia of transgenic mice. *J. Cell Biol.* (United States), Aug 1990, 111(2) p347-59.
111. Windler E, Chao Y, Havel RJ  
Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. Opposing effects of homologous apolipoprotein E and individual C apoproteins. *J. Biol. Chem.* (United States), Sep 10 1980, 255(17) p8303-7.
112. 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* (United States), Jul 25 1993, 268(21) p15804-11.
113. Freeman MW  
Macrophage scavenger receptors. (1994) *Curr. Opin. Lipidol* 5:143-148
114. Sambrano GR, Steinberg D  
Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1396-1400.
115. Windler EE, Kovanen PT, Chao YS, Brown MS, Havel RJ, Goldstein JL.  
The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that membrane mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *J Biol Chem.* 1980 Nov 10;255(21):10464-71.
116. Enrich, C. Vergel M. and Evans W.H  
Functional identification of three major phosphoproteins in endocytic fractions from rat liver. A comparative in vivo and in vitro study. *Eur. J. Biochem.* 231, 802-08 (1995).
117. Windler E, Greeve J, Levkau B, Kolb, V, Daerr W and Greten H.  
The human asialoglycoprotein receptor is a possible binding site for low-density lipoproteins and chylomicron remnants. *Biochem. J.* 1991 May 15;276 ( Pt 1) :79-87.

118. Windler E, Greeve J, Daerr W, Greten H.  
Binding of rat chylomicrons and their remnants to the hepatic low-density-lipo-protein receptor and its role in remnant removal. *Biochem. J.* (1988) 252, 553-561
119. Carlos Enrich, Peter Tabonat and W. Howard Evans  
A two-dimensional electrophoretic analysis of the proteins and glycoproteins of liver plasma membrane domains and endosomes Implications for endocytosis and transcytosis. *Biochem. J.* (1990) 271, 171-178.
120. Cooper AD, Erickson SK, Nutik R, and Shrewsbury MA  
Characterization of chylomicron remnant binding to rat liver membranes. *Journal of Lipid Research* Volume 23, 1982.
121. Robert W. Mahley, Zhong-Sheng Ji  
Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *Journal of Lipid Research* Volume 40, 1999.
122. Stähler F, Munz E, Kattermann R.  
Enzymatische Bestimmung von Gesamt-Cholesterin im serum. Richtigkeit und Methodenvergleich. *Dtsch Med Wochenschr.* 1975 Apr 18;100(16):876-80–885-7
123. Siedel J. Hägele E.O., Ziegenhorn J. et al.  
CHOLESTEROL CHOD – PAP. *Clin. Chem.* 1983;29:1075
124. Takayama M, Itoh S, Nagasaki T, et al.  
A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin Chim Acta (Netherlands)*, Aug 15 1977, 79(1) p93-8
125. Wasner, H.K.  
Preparation of a liver plasma membrane with an adrenalineresponsive cyclase after inhibition of prostaglandine synthesis by indomethacin. Aug 1976, *FEBS Lett.*, 72, 127-130.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

<b>AMP</b>	Adenylnukleotidmonophosphat
<b>ATP</b>	Adenylnukleotidtriphosphat
<b>APO</b>	Apolipoprotein
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>Ci</b>	Curie
<b>CURL</b>	Compartment of Uncoupling Receptors and Ligands
<b>DMEM</b>	Dulbeccos Modified Eagle Medium
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
<b>HDL</b>	High Density Lipoproteins
<b>IDL</b>	Intermediate Density Lipoproteins
<b>KD</b>	Kilodalton
<b>LCR</b>	Chylomikronen großer Remnants
<b>LDL</b>	Low Density Lipoproteins
<b>LDL-R</b>	Low Density Lipoprotein Rezeptor
<b>LRP</b>	LDL-Receptor-Related Protein
<b>MVB</b>	Multiple Vesicular bodies
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>RAP</b>	Receptor Associated Protein
<b>RRC</b>	Receptor Recycling Compartement
<b>SCR</b>	Chylomikronen kleiner Remnants
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulphat
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure
<b>TRIS</b>	Trishydroxymethylaminomethan
<b>UPM</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>VLDL</b>	Very Low Density Lipoproteins
<b>YWTD</b>	Tyrosin – Tryptophan – Threonin - Asparaginsäure – Tetrapeptid

## 8 Danksagung

Mein besonderem Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. E. Windler für die Vergabe des Themas, die interessante Aufgabenstellung, seine engagierte Unterstützung bei der Planung und Durchführung meiner Versuche, die Hilfestellung bei Fragen und Problemen, sowie die ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. H. Greten, dem ehemaligen Direktor der Medizinischen Klinik I der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf. Er hat mir insbesondere die Möglichkeit geboten, an seiner Klinik die vorliegende Arbeit anfertigen zu können.

Ferner möchte ich Herrn Prof. Dr. F. Rinninger sowie Herrn Prof. Dr. J. Greeve für die Hilfe und Unterstützung während meiner Tätigkeit im Labor danken.

Herrn Peter Gorski, Walter Tauscher sowie Christine Voß für die Hilfe bei Laborarbeiten und Durchführung der Experimente.

Meinen Eltern sowie meiner Schwester Dr. Kristine Kruse für Ihre Unterstützung.

## 9 Lebenslauf

Name	Kruse , Peter	
Geburtsdatum	18.08.1968	
Geburtsort	Hamburg	
Familienstand	ledig	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
Schulbildung	1974-1978	Besuch der Grundschule Barmstedt
	1978-1988	Besuch des Elsa - Brändström - Gymnasiums, Elmshom
Bundeswehr	1989-1990	Sanitätssoldat im Sanitätsbataillon 6
Studiengang	ab Oktober 1990	Studium der Humanmedizin in Hamburg
	August 1992	Ärztliche Vorprüfung
	August 1994	1. Staatsexamen
	März 1995	Beginn der Dissertation
	März 1998	2. Staatsexamen
	April 1998- April 1999	Praktisches Jahr an der Universitäts Klinik Eppendorf
	April 1999	3. Staatsexamen
Beruf	Mai 1999- November 2000	Arzt im Praktikum an der Universitäts-Augenklinik-Rostock
	Dezember 2000	Approbation als Arzt
	Dezember 2000 August 2002-	Assistenzarzt der Augenklinik im Zentralklinikum Augsburg
	Seit August 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universitäts-Augenklinik der Charité zu Berlin
	März 2006	Anerkennung zum Facharzt für Augenheilkunde

## **Eidesstattliche Versicherung**

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

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

Hamburg,      November 2006

Peter Kruse