Aus dem
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Abteilung für Molekulare Zellbiologie
des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf
Universität Hamburg
Prof.Dr.Dr. Ulrike Beisiegel

Funktionelle Testung adenoviraler Vektoren zur Behandlung der Familiären Hypercholesterinämie

Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Ole Dannenberg
aus Hamburg

Hamburg, 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin
Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher:

Referent:

Koreferent:

Inhaltsverzeichnis

1.	**Einleitung**	**1**
	Der Lipoproteinmetabolismus	**1**
	Struktur und Funktion der Lipoproteine	1
	Transport der Lipide	3
	Rezeptoren des Lipoproteinmetabolismus	6
	Rezeptor-vermittelte Endozytose	9
	Hyperlipoproteinämien	**10**
	Familiäre Hypercholesterinämie	11
	Diagnose der Familiären Hypercholesterinämie	13
	Therapie der Familiären Hypercholesterinämie	14
	Gentherapie der Familiären Hypercholesterinämie	15
	Der Adenovirus	**18**
	Ziel der Arbeit	**24**
2.	**Methoden und Material**	**25**
	Nachweis der Funktionalität von Vektoren in vitro	26
	Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis derTrans-fektionseffizienz von LDL-R und VLDL-R Konstrukten	27
	Quantitative Aufnahme-Experimente mit HuH7-Zellen	29
	Testung von Antikörpern gegen den LDL-R	30
	Westernblot-Analyse VLDL-R und LDL-R überexpre-mierender Konstrukte	32
	Nachweis der Funktionalität LDL-R überexpremierender Konstrukte	34
	Qualitativer Nachweis von LDL-R im Lebergewebe infizierter LDL-R k/o-Mäuse mittels Westernblot- Analyse	35
	Nachweis der Funktionalität LDL-R überexpremierdender Konstrukte an WHHL-Kaninchen	36

3. Ergebnisse **37**

Vektoren für in vitro Experimente 37

Nachweis überexpremierender Proteine mittels Westernblot-Analyse 40

Nachweis der Funktion der Vektoren in vitro 45

Nachweis der Funktionalität der Vektoren in vivo 54

4. Diskussion **64**

5. Zusammenfassung **73**

6. Literaturverzeichnis **75**

7. Danksagung **82**

8. Lebenslauf **83**

Verzeichnis der Abkürzungen

Ad	**Adenovirus**
Ad.βGal	**Ad-Serotyp 5-basierender Vektor mit βGal-Expressionskassette unter Kontrolle des RSV-Promotors**
Ad.hLDLR	**Ad-Serotyp 5-basierender Vektor mit hLDLR-Expressionskassette unter Kontrolle des RSV-Promotors**
α-LDLR	**anti-LDLR-Serum**
AP 600	**Autologer Promotor**
ATP	**Adenosintriphosphat**
βGal	**beta-Galaktosidase**
cDNA	**komplementäre DNA**
CETP	**Cholesterin-Ester-Transfer-Protein**
CM	**Chylomikronen**
CMV	**Cytomegalievirus**
EGF	**epidermaler Wachstumsfaktor**
FH	**Familiäre Hypercholesterinämie**
HDL	**high density lipoprotein**
hLDLR	**humaner LDL-Rezeptor**
HL	**Hepatische Lipase**
HuH7-Zelle	**Humane Hepatoma-Zellen**
IDL	**intermediate density proteins**
kD	**Kilodalton**
KHK	**koronare Herzerkrankung**
k/o-Maus	**LDL-R-knock-out Maus**
LCAT	**Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase**
LDL	**low density lipoprotein**
LDLR	**LDL-Rezeptor**
LpL	**Lipoproteinlipase**
LRP	**LDL-Rezeptor-Related Protein**
mRNA	**messenger RNA**
NZW	**New Zealand White (Kaninchen)**
rLDLR	**Kaninchen-LDL-Rezeptor**
RNA	**Ribonucleinsäure**
rpm	**Umdrehungen pro Minute**
RSV	**Rous-Sarkom-Virus**
SREBP	**Sterol regulatory element binding protein**
VLDL	**very low density lipoprotein**
WHHL	**Watanabe Heritable Hyperlipidemic (Kaninchen)**

Einleitung

Der Lipoproteinmetabolismus

Lipide sind für den Säugetierorganismus unverzichtbare Substanzen. Sie werden als Brennstoffe, Signalmoleküle, Hormonvorstufen, für die Wärmeisolation und als Strukturbausteine für Zellmembranen verwendet. Die physiologisch wichtigsten Klassen der Lipide sind Triglyceride (TG), Phospho- und Sphingolipide sowie das Cholesterin. Das Blut als transportierendes Milieu hat hydrophile Eigenschaften, was den Transport von Lipiden im vaskulären System unmöglich macht. Der tierische Organismus löst dieses Problem, indem er, dem chemischen Charakter der Lipide entsprechend, Lipide gemeinsam mit sogenannten Apolipoproteinen als Lipoproteine transportiert.
Im Laufe der Entwicklung ist daraus ein System mit verschiedenen Lipoproteinen und Lipoprotein-Rezeptoren entstanden, dessen Bedeutung in den letzten zwei Jahrzehnten von der Wissenschaft erkannt wurde. So können sowohl genetisch bedingte Defekte als auch die Lebens- bzw. Ernährungsweise zu Dysregulationen des Lipoproteinmetabolismus führen.

Struktur und Funktion der Lipoproteine

Die Lipoproteine haben alle ein gemeinsames Bauprinzip: es handelt sich um große sphärische Partikel mit einer hydrophilen Oberfläche und einem lipophilem Kern. Die Hülle, ein amphiphiler Monolayer, bestehend aus Phospholipiden und freiem Cholesterin, in die die Apolipoproteine eingebettet sind, umgibt den aus Triglyceriden und Cholesterin-Estern bestehenden hydrophoben Kern. Der Monolayer und die Apolipoproteine führen durch ihre physikodynamischen Eigenschaften zu einer thermodynamisch günstigen Aggregation der Lipide innerhalb eines wässrigen Systems und ermöglichen dieser Stoffklasse somit einen regulierbaren und gezielten Transport (Mahley et al, 1984).
Im humanen Blut werden die Lipoproteine in 5 Klassen eingeteilt. Die Einteilung erfolgt nach Dichte, Größe, elektrischer Ladung sowie nach Zusammenstellung der Lipide und Apolipoproteine (Gotto et al, 1986). In Tabelle 1 werden die Ei-

genschaften der einzelnen Klassen Chylomikronen (CM), Lipoproteien sehr geringer Dichte (very low density proteins, VLDL),Lipoproteinen intermediärer Dichte (intermediate density proteins, IDL), Lipoproteinen geringer Dichte (low density proteins, LDL) und Lipoproteine hoher Dichte (high density proteins, HDL) dargestellt. Die Bezeichnung der Lipoproteine nach ihrer Dichte beruht auf der Trennung der Fraktionen in einem Kaliumbromid-(KBr) Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation (Havel et al, 1955).

	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Syntheseort	Darm	Leber	intraplasmal	VLDL	Leber/Darm
Molekulargewicht [kDa]	5-1000x10^3	10-80x10^3	5-10 x10^3	2-3 x10^3	65-386
Durchmesser [nm]	75-1200	30-80	25-35	18-25	5-12
Dichte [g/ml]	<0,96	0,96-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21
Mobilität *	Start	pre-β	slow pre β	β	α
Komposition [% der Masse]					
Triglyzeride	86	55	23	6	4
Phospholipide	7	18	19	22	34
Cholesterolester	3	12	29	42	14
Cholesterol	2	7	9	8	4
Protein	1-2	6-10	11	21	45-55
Apolipoproteine					
ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV	+	-	-	-	+
$ApoB_{100}$	-	+	+	+	-
$ApoB_{48}$	+	-	-	-	-
ApoE	+	+	+	-	+
ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III	+	+	+	-	+

Tabelle 1: Physikalische Eigenschaften, Lipid und Apolipoprotein Zusammensetzung der Lipoproteine

Die Daten zu den physikalischen Eigenschaften, sowie der Komposition der Lipide und der Apolipoproteine der Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL und der HDL sind der Literatur entnommen (Gotto et al., 1986; Havel et al., 1955; Kane, 1996, Handbuch der Stoffwechselstörungen, Schwandt, Richter, 2001). Die Mobiltäten sind entsprechend der Plasma α und β- Globuline nach elektrophoretischer Auftrennung in einem nativen Agarosegel angegeben. Die Plus- bzw. Minuszeichen sollen die An- bzw. Abwesenheit des entsprechenden Apolipoproteins auf dem jeweiligen Lipoproteinpartikel anzeigen

Die Lipoproteine des Plasmas variieren in ihrer Größe beträchtlich. Die Anteile der Triglyceride laufen parallel zur Größe und die Dichte steigt progredient zum

kleineren Durchmesser der Partikel. Dieses ist auf das unterschiedliche Verhältnis von Proteinen an der Oberfläche zu Lipiden im Kern zurückzuführen.
Der Proteinanteil der Lipoproteine nimmt rein funktionale Aufgaben wahr. Er gewährleistet neben der strukturellen Integrität auch ein gezieltes Erkennen ihrer charakteristischen Oberflächenstruktur durch spezifische Rezeptoren (Goldstein and Brown, 1986). Man unterscheidet 10 verschiedene Gruppen von Apolipoproteinen, die in Abhängigkeit ihrer Verwandschaft in 6 Familien (A,B,C,D,E,(a)) eingeteilt werden (Havel et al, 1980, Camato et al, 1989, Scanu et al, 1991). Sie wirken als enzymatische Cofaktoren bei der katabolischen Hydrolyse der Lipoproteine einerseits durch die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT) (Aron et al., 1978, Steinmetz et al., 1985, Zorich et al.,1985) und andererseits durch die Lipoprotein-Lipase (LPL) (Smith et al. 1980, Kinnunen et al., 1977).

Transport der Lipide

Zu unterscheiden sind bei dem Transport zwei verschiedene Wege, die aus der Gliederung des Lipoproteinmetabolismus hervorgehen. Es gibt zum einen die exogenen, mit der Nahrung aufgenommenen Lipide und zum anderen die endogenen, von der Leber synthetisierten Lipide. Im folgenden werden diese beiden Wege näher erläutert.

A) Weg der exogenen Lipide
Die Verdauung der Lipide beginnt mit der Hydrolyse langkettiger Fettsäuren aus den Triglyzeriden durch die pharyngeale Lipase im Mund. Unter dem Einfluß von Gallensäuren werden die Nahrungslipide zu kleinen gemischten Mizellen emulgiert. An diesen kleinen Partikeln ist über die Colipase die Pankreaslipase verankert, die dort hydrolytisch aktiv wird. (Dolphin, 1992). Die Gallensäuren spalten sich ab und gelangen über den enterohepatischen Kreislauf wieder in die Leber. Freie Fettsäuren und 2-Monoglyzeride werden in die Enterozyten des Jejunums eingeschleust. Hier beginnt die Resynthese der Lipide und ihre Inkorporation in die sogenannten Chylomikronen. Dabei ist die Assoziation mit dem Apolipoprotein Apo B_{48} ein notwendiger erster Schritt. Nach weiterer An-

bindung der Apolipoprteine A-I, A-II und A-IV werden die gebildeten Chylomikronen in den interstitiellen Raum exozytiert, mit der Lymphe gesammelt und über den Ductus thoracicus in die Blutbahn abgegeben (Hussain et al., 1996, Kane, 1996). Intravaskulär werden die Chylomikronen durch die Aktivität der endothelzell-gebundenen Lipoprotein-Lipase (LpL) hydrolytisch gespalten (Eisenberg et al., 1990). Es entstehen freie Fettsäuren, die entweder in Adipozyten gespeichert oder der β-Oxidation im Herz- und Skelettmuskel zugeführt werden (Olivecrona und Bengtsson-Olivecrona, 1993). Die verbliebenen Chylomikronen-Remnants werden von weiteren Veränderungen begleitet. Die C-Apolipoproteine und das Apolipoprotein E (ApoE) aus der HDL verbinden sich mit den Chylomikronen und verändern dadurch ihre Eigenschaften (Mahley und Hussain, 1991). Insbesondere die Assoziation mit ApoE erhöht die Affinität zu den Lipoprotein-Rezeptoren der Leber (Kowal et al., 1989, Beisiegel, 1992). Von den C-Apolipoproteinen ist ApoC-II ein essentieller Cofaktor für die LpL-Aktivität (Olivecrona and Bengtsson-Olivecrona, 1993). Die weiteren C-Apoproteine inhibieren die zelluläre Aufnahme der CM-R (Masucci-Magoulas et al., 1997, Ebara et al., 1997, Swaney and Weisgraber, 1994).

Nach der hydrolytischen Spaltung der Chylomikronen in CM-R mittels der LpL, verbleibt diese an den CM-R (Felts et al., 1975, Goldberg et al., 1986, Zambon et al., 1996). Dadurch wird die Aufnahme über das LDL-Rezeptor-Related-Protein (LRP) möglich. Ebenso wie das LRP, so befindet sich auch die Hepatische Lipase (HL), die durch ApoE aktiviert wird, an den Leberzellen. Sie dient auch als Ligand für die Aufnahme von CM-R (Krapp et al., 1996).

Der wirksamste Mechanismus der Aufnahme von CM-R in die Leber stellt jedoch die Bindung von ApoE an den LDL-Rezeptor und LRP dar (Beisiegel, 1995, Beisiegel et al., 1989, Bradley and Gianturco, 1986, Kowal et al. 1989, Willnow et al., 1994). Die Aufnahme erfolgt über Endozytose in Hepatozyten.

B) Weg der endogenen Lipide

Der Weg der endogenen Lipide beginnt in der Leber, dem Hauptort biochemischer Fettsäuresynthese. Hier werden zunächst VLDL-Partikel synthetisiert und von den Hepatozyten, in geringerem Maße auch von den Enterozyten, sezerniert. Sie erhalten vor allem endogene Triglyzeride und Phospholipide und als ApoB-Komponente das $ApoB_{100}$. Die VLDL1 gelangt über den Blutkreislauf in

die Peripherie und wird durch die endothelständige Lipoprotein-Lipase zur kleineren VLDL2 und schließlich zur IDL hydrolysiert (Griffin and Packard, 1994). Die VLDL wird in der Peripherie teilweise durch die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL) hydrolisiert (Griffin and Packard, 1994), teilweise auch als kompletter Partikel durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. Verantwortlich hierfür ist der VLDL-Rezeptor(Takahashi et al.,1992), der das ApoE als Ligand erkennt (Beisiegel, 1995). Die VLDL2 und die IDL werden ca. zur Hälfte wieder in die Leber aufgenommen. Dies geschieht vornehmlich über den endozytotisch wirkenden LDL-Rezeptor oder die LRP.

Die nicht in die Leber aufgenommenen IDL-Partikel werden wieder durch die LpL und HL hydrolytisch zu LDL gespalten. Während der Hydrolyse zum LDL-Partikel kommt es des zum Verlust aller Apolipoproteine außer dem $ApoB_{100}$. Nach einer Verweildauer von ca. 2-3 Tagen erfolgt die Aufnahme der LDL-Partikel über die Bindung von $ApoB_{100}$ an den LDL-Rezeptor (Brown and Goldstein, 1986). Sie erfolgt zu ungefähr gleichen Teilen in der Leber und in nichthepatischem Gewebe. Um intrazellulär eine zu hohe Cholesterinkonzentration zu vermeiden, wird sowohl die Neusynthese als auch die Aufnahme von LDL-Partikeln über Sterol-regulierte Bindungsproteine gesteuert (Brown and Goldstein, 1997).

Die Elimination von Cholesterin aus dem Organismus erfolgt ausschließlich über die Ausscheidung von Gallensäuren. Da periphere Zellen nicht in der Lage sind , freies Cholesterin und Gallensäuren auszuscheiden, geben diese das freie Cholesterin an extrazelluläre Akzeptoren weiter. Beim sogenannten reversen Transport des Cholesterins spielen die in den Leber- und Darmzellen gebildeten HDL-Partikel die Hauptrolle. Unter dem Einfluß der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) übernimmt die HDL das Cholesterin und deponiert es verestert im Kern. Das Koenzym dieser Reaktion ist dabei das auf der HDL befindlich ApoA-I (Fielding et al., 1972). Die HDL überträgt wiederum ihr Cholesterin auf größere Lipoproteine. Dieses wird enzymatisch durch das Cholesterin-Ester-Transfer-Protein (CETP) gesteuert. Ein Teil der in der HDL sich befindenen Cholesterin-Ester wird auch direkt an die Leber herantransportiert (Pieters et al. 1991) und dort über den Scavenger-Rezeptor B1 (SR-B1) in die Leber aufgenommen (Krieger etal., 1995).

Rezeptoren im Lipoproteinmetabolismus

Die Funktion der Lipoprotein-Rezeptoren besteht in der Bindung und Aufnahme von Lipoproteinen aus der Zirkulation. Mittlerweile sind 7 Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie im Säugetierorganismus bekannt:

- LDL-Rezeptor (Brown and Goldstein, 1974)
- LRP (Herz et al., 1988)
- GP330/Megalin (Raychowdhury et al., 1989, Saito et al., 1994)
- VLDL-Rezeptor (Takahashi et al., 1992)
- LR 11 (Yamazaki et al., 1996)
- LR8B (Novak et al., 1996)
- ApoE-Rezeptor 2 (Kim et al.,1996)

Gemeinsam ist den Mitgliedern, daß sie alle aus 5 verschiedenen Domänen bestehen:

1. complement-type-Domäne

Ihren Namen hat diese Domäne von ihrer homologen Struktur zu verschiedenen Komplementfaktoren. Sie bildet das C-terminale-Ende des Rezeptor-Proteins. Es besteht aus einer variablen Wiederholung von 40 Aminosäuren (AS) mit drei Disulfidbrücken, die eine konservierte S-D-E(Ser-Asp-Glu)-Sequenz umgeben. Die Domäne ist negativ geladen und ist für die Liganden-bindung verantwortlich (Mahley et al.,1977, Goldstein et al., 1983, Russell et al., 1989).

2. EGF-type-Domäne

Sie besitzt eine 35%ige Sequenzhomologie zum Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), was zur Namensgebung beitrug. Eine Konsensus-Sequenz Y-W-T-D (Tyr-Trp-Thr-Asp), mehrfach wiederholt, trennt die wachstumsartigen Faktoren voneinander. Notwendig ist diese Domäne für die intrazelluläre, säureinduzierte Dissoziation der Liganden (Davis et al., 1987).

3. O-Glycosyl-Domäne

Die 18 O-Glycosid enthaltene Domäne gewährleistet wahrscheinlich eine ausreichenden Abstand der extrazellulären Domäne von der Zelloberfläche (Davis et al., 1986).

4. Transmembrandomäne

5. Carboy-terminale-Domäne

In dieser Domäne sind N-P-X-Y (Asp-Pro-Yal-Tyr)-Sequenzen enthalten, die einerseits für das Recycling des Rezeptors (Chen et al., 1990) und andererseits für die Bindung des Rezeptors an bestimmte Membranbereiche, den coated pits, zuständig ist.

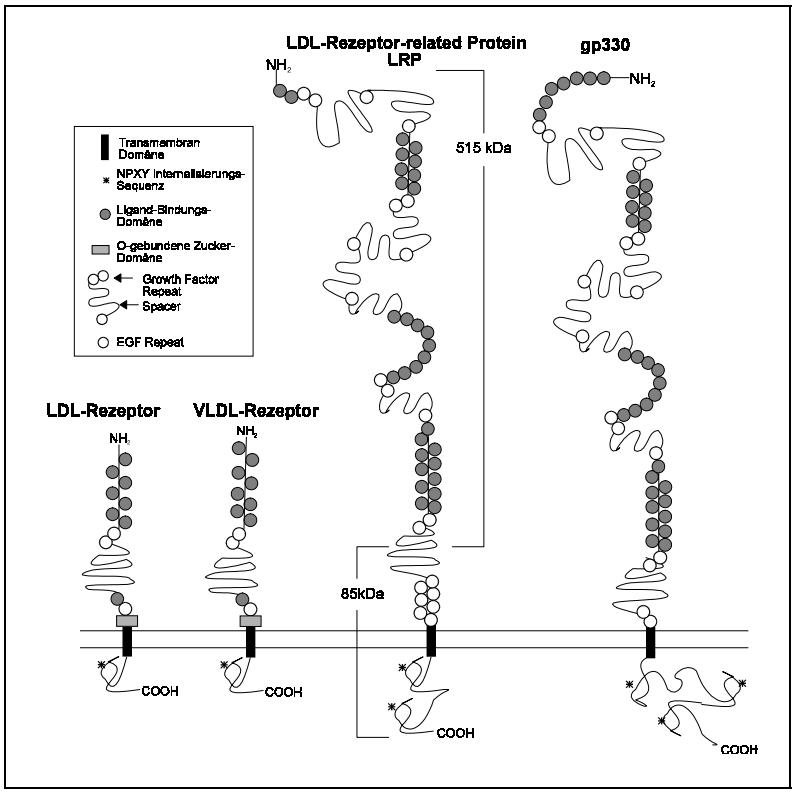


Abbildung 1: Schematische Darstellung des für den Lipoproteinstoffwechsel relavanten Teils der LDL Rezeptor Gen Familie

Gezeigt sind die Anordnungen der einzelnen funktionalen Domainen für den LDL R (Brown and Goldstein, 1974), den VLDL R (Takahashi al et., 1992), für LRP (Herz et al., 1988) und gp330/Megalin (Raychowdhury et al., 1989; Saito et al., 1994).

Im weiteren werden nun die für diese Arbeit wichtigen Rezptoren, LDL-Rezeptor und VLDL-Rezeptor, beschrieben.

LDL-Rezeptor

Der LDL-Rezeptor ist ein aus 839 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein. Er vermittelt die Bindung, die Aufnahme und den Abbau von LDL. Durch homozygote Defekte im LDL-Rezeptor-Gen kann es zur familiären Hypercholesterinämie kommen, deren Folgen im weiteren Verlauf dieser Arbeit beschrieben werden.

Der Genlocus des humanen LDL-R befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 19 (p13.1-p13.3). Er umfaßt 18 Exons und dementsprechend 17 Introns (Südhof et al.).

Die Synthese beginnt mit einem 120 kDa Vorläuferprotein, das innerhalb des Golgi- Apparates zum reifen, 160 kDa großen LDL-Rezeptor prozessiert wird. Kurze Zeit nach der Translation gelangt der LDL-Rezeptor zur Zelloberfläche, wo er sich in Clathrin umsäumten Bereichen (Clathrin-Stachelsaum-Grübchen) der Plasmamembran konzentriert.

Die complement-type-Domäne umfaßt sieben Wiederholungen der 40 AS langen, konservierten S-D-E Sequenz mit je drei Disulfidbrücken. Durch eine Traube von positiv geladenen AS auf den Apolipoproteinen erfolgt die Bindung auf Grund der komlementären negativen AS auf dem Rezeptor.

Die regulatorische Größe, an der sich die Expression des LDL-Rezeptors orientiert, ist das freie zytoplasmatische Cholesterin (Dietschy et al., 1970). Hohe Konzentrationen an zytosolischem Cholesterin führen zur Hemmung der Cholesterinsynthese, zur vermehrten Speicherung durch Veresterung und zu einer Verminderung der Aufnahme exogenen Cholesterins. Die Hemmung der Cholesterinbiosynthese erfolgt über das Herabsetzen und die verminderte Expression des Schlüsselenzyms 3-Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase). Einschränkend auf die Aufnahme von exogenem Cholesterin mittels LDL ist die Limitation der Expression des LDL-Rezeptors (Goldstein and Brown, 1986). Die Expressionregulation findet auf Transkriptionsebene statt. In den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und des Zellkernes befinden sich inaktive Vorläufer der Transkriptionsfaktoren SREBP-1 und SREBP-2 (sterol regulatory element binding protein 1 /2). Kommt es zu einem Absinken

des zytosolischen Cholesteringehaltes, so erfolgt eine proteolytische Aktivierung der Transkriptionsfaktoren und die Transkription des LDL-Rezeptorgens beginnt. Bei einem erhöhten intrazellulären Cholesterinspiegel kommt es zu einer Hemmung der Expression des LDL-Rezeptorgens. Somit ist die Zelle in der Lage, mit den dargestellten Mechanismen den Cholesterinspiegel den jeweiligen Bedürfnissen anzupassen.

VLDL-Rezeptor

Auf Grund von Beobachtungen gelang es 1992 den VLDL-Rezeptor zu identifizieren. Er ist in der Lage VLDL, nicht aber LDL zu binden. Der Unterschied zwischen dem VLDL-Rezeptor und dem LDL-Rezeptor ist ein zusätzliche Domäne zur Bindung der Liganden. Im Vergeich hat der VLDL-Rezeptor somit 8 Wiederholungen der aus 40 AS komplementfaktor-ähnlichen Sequenz. Es besteht zwischen den verschiedene Spezies eine hohe Homologie des VLDL-Rezeptor.
Die Expression des VLDL-Rezeptor findet vor allem in Herz-, Muskel- und Fettgewebe und nur in sehr geringem Maße in der Leber statt. Dieses sind also vor allem Gewebe, die ihre Energie in Form von Fettsäuren aus triglyzeridreichen Lipoproteinen beziehen.

Rezeptor-vermittelte Endozytose

Die Lipoproteine bedienen sich der Rezeptor-vermittelten Endozytose, um in die Zelle aufgenommen zu werden.
Der LDL-Rezeptor als Transmembran-Rezeptor ist in sogenannten Stachelsaum-Grübchen vorzufinden, dessen zytoplasmatischer Teil aus einer Schicht direkt an die Membran bindender Clathrin-assoziierter Proteine aufgebaut ist. Um diese Proteine herum, säumen sich Clathrin-Unterheiten. Die Anhäufung der LDL-Rezeptor werden auch „coated-pits“ genannt. Kurze Zeit nach der Entstehung kommt es zu einer Invagination der entsprechenden Membranabschnitte. Die Folge ist ein zytoplasmatisches umhülltes Vesikel. Die Invagination ist ein Liganden unabhängiger Prozeß, der Energie in Form von ATP benötigt. Der nächste Schritt ist das Entfernen des Clathrin-Mantels durch sogenannte „uncoating Enzyme“, ein ebenfalls ATP-abhängiger Prozeß. Nun beginnt der Weg des LDL durch die einzelnen Zellkompartimente. Die entstandenen Endosomen verschmelzen mit Sortierenden-Endosomen, die zu den frühen Endosomen zu-

zuordnen sind. In diesen erfolgt die Dissoziation von LDL-Rezeptor und Ligand. Zuständig zeigt sich eine Ansäuerung der Kompartimente mittels ATP-abhängiger Protonenpumpen. Die Rezeptoren sammeln sich in tubulären Auswüchsen. Diese werden dann abgeschnürt und transportieren den Rezeptor als sogenannter Recycling-Vesikel wieder zur Zelloberfläche Der Zyklus von der Invagination bis zum erneuten Erscheinen des LDL-Rezeptor an der Zelloberfläche nimmt ca. 10 Minuten in Anspruch.
Das Endosom mit dem enthaltenen LDL wird dem lysosomalen Kompartiment zugeführt. Dort werden sowohl der Proteinanteil, das $ApoB_{100}$, als auch der in den Partikeln vorwiegend enthaltene Cholesterin-Ester hydrolytisch abgebaut. Entstehende Fett- und Aminosäuren werden dem Intermediärstoffwechsel zugeführt. Die frei gewordenen Cholesterin-Moleküle werden in die Plasmamembran eingebaut (Tabas, 1995) oder werden zwecks Speicherung in zytosolischen Tröpfchen durch die ACAT reverestert. Die Neusynthese des Cholesterins und die Expression des LDL-Rezeptor wird durch zelluläre Kontrollwege, die sterol-regulierten Bindungsproteine, reduziert.

Hyperlipoproteinämien

Die Hyperlipoproteinämien beruhen auf ererbten und erworbenen Defekten von Proteinen, z.B. Enzymen, Transportproteinen oder Rezeptoren. Man unterscheidet zwischen primären (ererbten) und sekundären (erworbenen) Hyperlipoproteinämien. Die sekundären kommen im Rahmen von Krankheiten wie cholestatischer Lebererkrankungen, Hypothyreose oder falscher Ernährungsweise vor. Die primären werden bei reiner Bestimmung des Cholesterin- und Triglyzeridspiegels deskriptiv in drei Gruppen eingeteilt.Häufig sind genetische Prädisposition und exogene Faktoren zur Ausprägung der Krankheit wichtig.

Name	Ursache / gen.Defekt	Phänotyp
Hypercholesterinämie TC> 180 mg/dl	LDL-R- / $ApoB_{100}$-Defekt	Erhöhung der LDL >115 mg/dl
Hypertriglyzeridämie TG> 180 mg/dl	LPL- / CII-Defekt	VLDL und Chylomikronen Erhöhung
Kombinierte Hyperlipidämie TC >180 mg/dl TG >100 mg/dl	Polygene Ursache	Remnant-Akkumulation

Tabelle 2: Primäre Hyperlipoproteinämien (European Guideline)

Familiäre Hypercholesterinämie (FH)

Zu den häufigsten Erkrankungen dieser Gruppe gehört die Familiäre Hypercholesterinämie (FH). Sie ist auf einen Defekt im LDL-Rezeptor-Gen zurückzuführen. Bei Individuen mit diesem Defekt liegt ein bereits zum Zeitpunkt der Geburt erhöhter Cholesterin-Wert vor. Vorallem ist es darauf zurückzuführen, daß das LDL nicht mehr oder nicht ausreichend aus dem Blutplasma eliminiert werden kann. Die FH wurde bereits im Jahre 1938 beschrieben (Thannhauser et al., 1938; Müller, 1938), aber sie zählt erst seit 1964 zu den monogenetischen Erkrankungen (Khachadurian, 1964). Sie unterliegt einem autosomal-dominantem Erbgang und tritt bei heterozygoten Trägern mit einer Häufigkeit von 1:500 und bei Homozygoten mit einer Frequenz von 1:1.000.000 auf (Patterson et al., 1972; Goldstein et al., 1973).

Das im Blut zirkulierende LDL kann bei der FH nicht mehr eliminiert werden, so daß es zu einer Akkumulation von LDL-Cholesterin kommt. Das LDL-Cholesterin lagert sich vor allem in den Makrophagen der Haut, Sehnen und Arterienwänden in Form von Cholesterin-Estern ab. In der Haut und den Sehnen führt das zu sogenannten Xanthomen, in den Augen rufen Cholesterinablagerungen den arcus lipoides corneae hervor. Beides ist jedoch nur für die Differentialdiagnose wichtig und hat kaum pathogenes Potential. Prognostisch am ungünstigsten wirkt sich die frühzeitige und massive Arteriosklerose mit den entsprechenden kardiovaskulären Komplikationen aus.

Während bei Heterozygoten die LDL-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von LDL-Partikeln „nur“ zu 50% eingeschränkt ist, ist die Elimination der LDL-Partikel bei homozygoten Trägern nahezu vollständig aufgehoben.

Die Folgen des erhöhten LDL-Plasma-Titers ist der vermehrte Einstrom von LDL in den subendothelialen Raum der Arterienwand. Nach oxidativer Modifikation wirken die LDL-Partikel als immunologischer Stimulus. Daraus folgt eine Entzündungsreaktion in deren Verlauf es zu einer Volumenzunahme der Gefäßwand durch einwandernde glatte Muskelzellen und zur Bildung von Schaumzellen aus LDL-phagozytierenden Makrophagen kommt. Hierdurch verringert sich das Gefäßvolumen und es kommt zu einer starken Behinderung des Blutstromes mit der Folge einer Mangelversorgung weiter peripher gelegenen Gewebes, die sich vor allem im Myokard dramatisch manifestiert. Es kommt bereits in juvenilen Alter zu myokardialer Insuffizienz mit daraus resultierendem Myokardinfarkt.

Als erster klinischer Parameter fällt in der Anamnese der von FH betroffenen Patienten der signifikant erhöhte Plasmacholesterinspiegel auf. Abhängig vom genetischen Status liegt er bei heterozygot betroffenen Patienten im Durchschnitt bei 350 mg/dl. Der Wert bei homozygot betroffenen liegt im Mittel bei 700 mg/dl. Dieses läßt sich ausschließlich auf eine Erhöhung der LDL-Lipoprotein-Fraktion zurückführen. Zum einen beruht dieses auf der Akkumulation von LDL-Partikeln auf Grund einer verlängerten Halbwertszeit im Blut (von 2,5 auf 6 Tage), zum anderen auf einer erhöhten Bildungsrate von LDL aus IDL (IDL wird in Normalpersonen auch über den LDL-Rezeptor sehr schnell in die Leber aufgenommen).

Der Cholesterin-Wert liegt im Vergleich dazu bei normolipämischen Personen im Mittel bei 180 mg/dl. Der zweite charakteristische Phänotyp sind die oben beschriebenen Ablagerungen des Cholesterins in Haut, Sehnen, Auge und Arterien.

Bei heterozygot erkrankten Personen zeigt sich als einziges klinisches Symptom zunächst nur die Erhöhung des Cholesterin-Spiegels. Innerhalb des zweiten Lebensjahrzehntes kommt es häufig, nicht aber zwangsläufig, zur Ausbildung der Xanthome und des arcus lipoides corneae. Die Artherombildung tritt ab der vierten Lebensdekade auf. Das durchschnittlich erreichte Lebensalter beträgt 50-60 Jahre.

Die Lebenserwartung der homozygot erkrankten liegt dahingegend weitaus niedriger. Die Patienten sterben meist vor Erreichen des 30. Lebensjahres infolge der sich bereits im 1. oder 2. Lebensjahrzehntes manifestierenden Artherombildung mit KHK und Myokardinfarkten.

Die FH beruht auf einem Defekt des LDL-Rezeptors. Die Defekte sind auf Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen zurückzuführen, die sich in fünf Mutationsklassen einteilen lassen (Hobbs et al., 1990):

1. Die Synthese des Rezeptors ist gestört. Bei homozygoten Merkmalsträgern ist weniger als 2% der normalen Rezeptoraktivität an der Zelloberfläche nachweisbar.
2. Der intrazelluläre Transport des LDL-Rezeptors ist gestört. Es kommt innerhalb des Golgi-Apparates nicht zur regulären Prozessierung der 120 kD Vorstufe des Rezeptors
3. Die Bindungsfähigkeit an den LDL-Rezeptor ist beeinträchtigt.
4. Die Invagination des LDL-Rezeptors in die coated-pits ist gestört.
5. Das Recycling des LDL-Rezeptors zurück zur Zelloberfläche ist gestört.

Diagnose der FH

Diagnostisch steht der Lipidstatus der Patienten im Vordergrund. Hierbei ist ebenfalls die Kontrolle der Verwandten, insbesondere der Eltern, sinnvoll, um die Diagnose FH zu stellen. Abzugrenzen sind die Ergebnisse gegen die sekundäre und kombinierte Hypercholesterinämie. Zusätzlich zur Blutkontrolle ist die Un-

tersuchung der Xanthome indiziert, da einige Typen von Xanthomen spezifisch für homozygote Personen sind.

Zusätzlich können biochemische Analysen spezifischere Ergebnisse liefern:

- Bindungs-, Aufnahme-, und Degradations-Analysen mit ^{125}I-markierten LDL auf kultivierten Patienten-Fibroblasten.
- Rezeptor-Expressionsumfangs-Untersuchung mittels Immunblotting und Immunpräzipitation
- PCR-Analysen
- Messung der cholesterinvermittelten Suppression der 3-HMG-CoA-Reduktase

Therapie der FH

Die Therapie richtet sich nach der Form der FH.

a) Heterozygot Erkrankten wird zunächst eine fett- und cholesterinarme Diät mit weniger als 150 mg/dl pro Tag verordnet. Parallel wird eine lipidsenkende Therapie aus drei kombinierten Medikanten verschrieben. Zum einen werden Ionenaustauscherharze (Cholestyramin, Cholestipol) verabreicht. Sie binden im Dünndarm Gallensäuren und entziehen diese somit dem enterohepatischen Kreislauf. Die Folge ist die erhöhte Ausscheidung von Cholesterin und eine Senkung des Plasma-Cholesterin-Spiegels um 15-20%. Weiter werden den betroffenen 3-HMG-CoA-Reduktasehemmer (sog. „Statine“) verschrieben. Sie bewirken, daß die, durch die Ionenaustauscherharze gesteigerte, Cholesterinsynthese unterbunden wird. Gegenregulatorisch kommt es in den Hepatozyten auch zu vermehrten Expression von LDL-Rezeptoren. Hierdurch wird der Cholesteringehalt im Plasma um ca. 30% gesenkt. Als drittes Präparat werden Nicotinsäure-Derivate verabreicht, die über eine Hemmung der VLDL-Synthese in der Leber zu einer verminderten vaskulären Entstehung von LDL führt. Dieses läßt den Gesamtcholesterinspiegel auf unter 40% des Ausgangswertes sinken.
b) Bei homozygot Erkrankten ist die Therapie auf Grund nicht-funktionaler LDL-Rezeptoren weitaus schwieriger. Sie beruht auf chirurgischer (Lebertransplantation) oder physikalischer Methode. Diese stützt sich auf das Prinzip der Apharese. Es wird eine extrakorporale Filtration des Blutplasmas über Heparin-Sepharose, Dextran-Sulfat-Zellulose oder anti-LDL-Agarose durch-

geführt. Eine kurzfristige Senkung des LDL-Cholesterins um ca. 70% ist möglich. Sie hält jedoch nur für etwa 7 Tage an, so daß die Therapie wöchentlich durchgeführt werden muß.

Gentherapie der Familiären Hypercholesterinämie

Mit der zunehmenden Zahl von Erkrankungen, die vollständig oder teilweise auf einem genetischen Defekt basieren, entwickelte sich seit Anfang der siebziger Jahre die Idee einer Gentherapie. Das Ziel ist ein therapeutischer Effekt durch Änderung der genetischen Konstituion des Patienten. Konzeptionell ist dieses durch eine Keimbahntherapie oder eine somatische Gentherapie möglich.
Die Keimbahntherapie ist durch ihre irreversible Änderung des Keimbahngenoms allerdings ethisch fragwürdig. Folgende Generationen haben dadurch keinen Einfluß auf ihre am Genom erfolgten Veränderungen.
Somit steht die somatische Gentherapie zur Zeit im Vordergrund. Ihre Veränderungen ist auf somatische Zellen und bestimmte Gewebebezirke begrenzt. Im Rahmen der somatischen Gentherapie werden Substitutionen, Additionen, Deletionen bzw Depletionen genetischer Informationen in den Zielzellen durchgeführt. Sie dienen dem Erzielen therapeutischer Effekte bei erworbenen und ererbten Defekten. Zu diesen Defekten gehören :

- Monogene Erbkrankheiten (FH, Cystische Fibrose, Faktor VIII-/ Faktor IX-Mangel, α1- Antitrypsinmangel und Adenosin-Desaminase-Defizienz)
- Krebserkrankungen
- Virale Erkrankungen (HIV-Infektionen, Hepatitis-B-Virus Infektionen, Epstein-Barr-Virus- Infektionen, Herpes-Simplex-Virus Infektionen)

Die Art der Erkrankung bestimmt die Strategie der gentherapeutischen Behandlung. Danach richtet sich 1) das genetisch zu modifizierende Zielgewebe, 2) die notwendige Persistenz der genetischen Veränderung und 3) der erforderliche Expressions-umfang.
In Abhängigkeit zu der Proliferation, Regenerationsfähigkeit und der Kultivierbarkeit des Gewebes wird zwischen der in vivo und ex vivo Strategie unterschieden.

Die ex vivo Strategie setzt die chirurgische Entnahme des Zielgewebes voraus. Die genetische Modifikation erfolgt extrakorporal. Im Anschluß wird das genetisch modifizierte Gewebe reimplantiert.

Im Gegensatz dazu wird bei der in vivo Strategie die genetische Modifikation mit einem rekombinanten Vektor durchgeführt, der im allerersten Fall per Spritze in die Blutbahn injeziert wird.

Der Vorteil der in vivo Strategie ist die geringe Invasivität. Der Nachteil der sich aus dieser Methode ergibt, ist die entstehende Immunogenität gegen den im Patienten direkt auftretenden Vektor und das Problem der Gewährleistung der Zielsteuerung an das gewünschte Gewebe.

Die notwendige Persistenz der genetischen Veränderung richtet sich nach der Art der Erkrankung. Erworbene Defekte können durch einmalige Modifikation der genetischen Information behandlet werden, wohingegen die ererbten Defekte einer dauerhaften Substitution unterworfen werden müssen.

Der Expressionsumfang eines therapeutischen Gens muß den physiologischen Erfordernissen durch entsprechende Promotorkonstruktionen angepaßt werden.

Es gibt einen Vektoren-Pool, der die heute verfügbaren Vektoren zusammenfaßt.

Vektor	**Gruppe**	**Transferprinzip**	**Einsatz bis heute[1)]**
Adenovirus	I	viral	ja
Retrovirus	I	viral	ja
Adenoassoziierter Virus AAV[2)]	I	viral	nein
Herpesvirus HSV[3)]	I	viral	nein
Bakulovirus[4)]	I	viral	nein
Liposomen	I	chemisch	ja
DNA-Protein-Komplexe[6)]	I	chemisch	ja
Kompositvektoren[7)]	I	chemisch/viral	nein
$Ca_3(PO_4)_2$	II	chemisch	nein
Ballastische Transfektion[8)]	II	physikalisch	nein
Jet-Injection[9)]	II	physikalisch	nein
Mikroinjektion[10)]	II	physikalisch	nein
Elektroporation	II	physikalisch	nein

Tabelle 3: Heute verfügbarer Vektoren-Pool und Gentransfermethoden

Methoden des Gentransfers, die heute routinemäßig Einsatz finden. Aufgeführtt sind auch neuartigere Vektortypen wie Adenoassoziierter Virus[2)] (Flotte et al.,1995 review), Herpes-Simplex.Virus[3)] (Ali ei al.,1994), Bakulovirus[4)] (Hofman et al., 1996), die in ihrer

Vektorqualität weniger gut charakterisiert sind. Die Spalte „Einsatz bis heute“[1)] bezieht sich auf die Nutzung des jeweiligen Gentransferprinzips im Zuge eines klinischen Gentherapieversuches. DNA-Protein-Komplexe[6)] sind Aggregate aus kationischen Protein und DNA, die über ligandenwirksame Komponenten der Proteinstruktur rezeptorvermittelt aufgenommen werden (Wu et al., 1991). Unter Kompositvektoren[7)] versteht man im engeren Sinne DNA-Proteinstrukturen mit viralen und nonviralen Anteilen, die die Nutzung einiger viraler Eigenschaften (Aufnahme, Kernlokalisation, Replikation) ohne die Übernahme der gesamten viralen Funktionseinheit ermöglichen sollen. Ballistische Transfektion[8)] beruht auf der Aggregatbildung von DNA und Projektilen (i.a. Gold oder Wolfram), die mit großer Geschwindigkeit in die Zelle geschossen werden (Yang et al., 1990). Jet-Injection[9)] beschreibt den DNA-Transfer in Zielzellen bei hoher Geschwindigkeit eines flüssigen Trägermediums (Furth et al., 1992). Unter Mikroinjektion[10)] versteht man das gezielte manuelle Eiinbringen von DNA in Zellen/Zellkerne mit einer feinen Glaskanüle.

Die Anforderungen, die an einen Vektor gestellt werden sind unterschiedlicher Art. Einerseits ist die Effizienz des Gentransfers, die Pathogenität und Immunogenität des Vektors von entscheidener Bedeutung. Andererseites muß auch auf die Verpackungskapazität, den Zielzelltropismus und die erzielbare Transgenstabilität geachtet werden. Die Methode, die diesen Anforderungen bis heute am gerechtesten werden sind Vektoren viralen Ursprunges. Insbesondere konnten mit Retroviren und Adenoviren Erfolge erzielt werden. Das Prinzip der Modifikation eines viralen Vektor beruht auf der Löschung eines Teils der genetischen Information des Wildtyp-Virus und dem Ersatz durch ein gentechnisches Konstrukt.

Retroviren sind Viren der RNA-Gruppe mit einer Größe von 8 kb. Ihr viraler Zyklus beinhaltet die reverse Trankription ihres Genoms in doppelsträngige DNA und dessen stabile Integration in das Wirtsgenom. Während Retroviren in vitro eine hohe Transferrate erreichen, werden sie in vivo sehr schnell durch das humane Komplementsystem deaktiviert. Zwei weitere Nachteile sind 1) die Integration in nur proliferierendes Gewebe (Miller et al., 1990), das die Leber als Zielgewebe von in vivo Versuchen somit ausschließt und 2) die geringe Verpackungskapazität von lediglich 7 kb.

Der Adenovirus, ein sowohl auf proliferierende als auch ruhende Zellen wirkender Virus, scheint zur Zeit der vielversprechenste Vektor für die in vivo Strategie zu sein.

Der Adenovirus

Das erste Mitglied der Familie Adenoviridae wurde 1953 aus Tonsillengewebe isoliert (Rowe et al., 1953). Es sind bisher 47 humanpathogene Serotypen identifiziert worden, die in 6 Untergruppen unterteilt werden (A-F). Einige dieser Stämme erwiesen sich in neugeborenen Nagetieren als oncogen. Dieses oncogene Potential konnte für humanpathogene Adenoviren nicht festgestellt werden. Vielmehr sind diese mit akuten respiratorischen Infektionen, epidemischen Konjunktividen und kindlichen Gastroentertiden assoziiert.

Gruppe	**Typ**	**oncogenes Potential**
A	12, 18, 31	hoch
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	niedrig
C	1, 2, 5, 6	keines
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39	keines
E	4	keines
F-G	10, 41-47	keines

Tabelle 4: humane Adenoviren.

Der reife Adenovirus besteht strukturell aus drei Komponenten: 1.) dem Capsid, 2.) dem Gerüst (Scaffold) und 3.) der Kernstruktur (Core). Das Capsid ist aus 252 Untereinheiten zusammengesetzt, 240 Hexonproteinen und 12 Pentonproteinen. An den Kanten setzen 60 trimere Faserproteine (pIV) an. Es hat eine Durchmesser von 70 nm. Das Scaffold-Gerüst hält das Capsid zusammen. Adenoviren besitzen eine doppelsträngige lineare DNA als genetisches Material, die an ihren Enden inverse terminale Wiederholungen (inversed terminal repeats, ITR) einer Länge von 100-140 bp haben. An die 5´-Enden des DNA-Moleküls ist je ein terminales 55 kDa großes Protein gebunden, das entscheidend für die nukleäre Matrix-Befestigung, die effiziente Transkription und die Initiation derviralen DNA-Replikation ist. Die Abbildung zeigt schematisch einen Adenovirus.

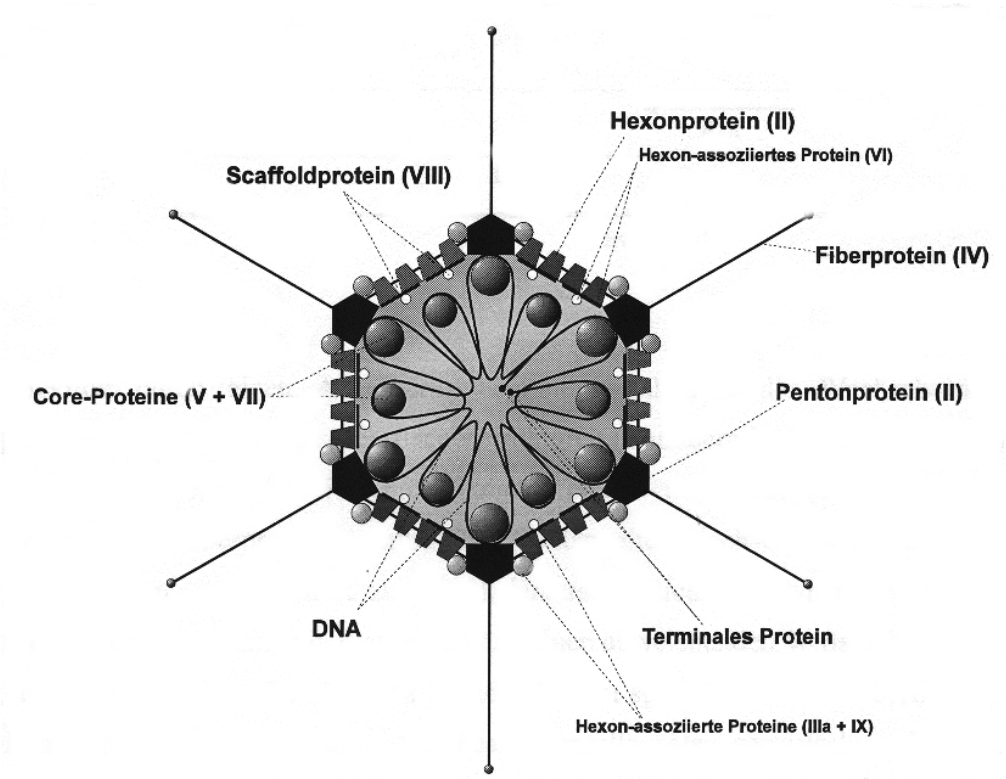


Abbildung 2: Der Adenovirus

Die viralen Transkriptionseinheiten sind funktional in frühe (E1a, E1b, E2a&2b, E3 und E4) und späte Regionen unterteilt, beruhend auf dem Zeitpunkt ihrer Transkription nach erfolgter Infektion. Die Umschaltung von der frühen zur späten Phase der Infektion beträgt ca. 6-8 Stunden. Mit Ausnahme der E2-Region stehen alle Regionen der frühen Phase unter der Kontrolle eines autologen Promotors. Die späte Region wird konzentriet vom „major late promotor“ transkribiert. Die Abbildung zeigt das adenovirale Genom.

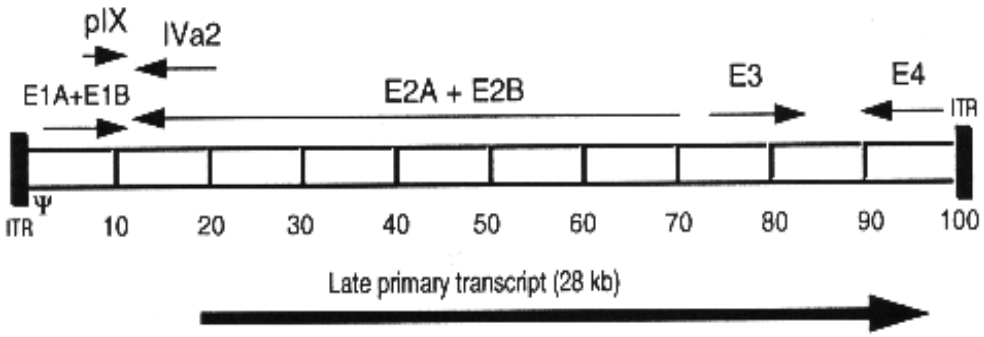


Abbildung 3: Das adenovirale Genom.

Der Infektionszyklus einer Zelle durch einen Adenovirus ist nach 20-24 Stunden abgeschlossen. Er beginnt über die Wechselwirkung der Kopfdomäne des Fiberproteins mit zellulären Oberflächenstrukturen (Londberg-Holm et al., 1969), die bisher nicht für alle Vertreter der Adenoviridae-Familie identifiziert wurden. Adenoviren des Serotyps 2 und 5 binden spezifisch an ein Oberflächenprotein der Immunglobulin-Familie.

Es kommt zur Endozytose und zur Bildung eines Clathrin-umschlossenen Vesikels. Nach erfolgter Endosombildung (Pastan et al., 1987) beginnt das Entweichen des Virus aus dem sauren Milieu des frühen Endosoms durch pH-abhängige Konformationsänderung (Wolfhart, 1988). Auf dem Weg des Virions zur Kernhülle erfolgt die schrittweise Dissoziation des Capsids (Greber et al., 1993). Dabei werden zunächst die Pentonproteine und anschließend die Hexonproteine abgelöst. Der Transfer des viralen Genoms in das Nukleoplasma erfolgt über die Bindung an nukleäre Poren (Dales and Chardonnet, 1973).

Ein bis zwei Stunden nach der Infektion erreicht die virale DNA den Zellkern. Nun beginnt die Transkription der E1a-Region, die für einen viralen Transkriptionsfaktor codiert. So kommt es zur Expression der frühen viralen Gene und es kommt über ein E4-codiertes Protein zu einem Stillstand der zellulären Proteinsynthese und zu einem verstärktem Transport viraler mRNA in das Zytosol. Im Anschluß an die ausreichende Expression der frühen Gene beginnt die Replikation der viralen DNA und somit auch die Expression der späten Gene. Es entstehen sogenannte Strukturproteine, die sich mit der DNA zu Virionen im Nukleoplasma zusammenschließen. Sie werden ungezielt aus dem noch metabolisch aktivem Zellkern freigesetzt.

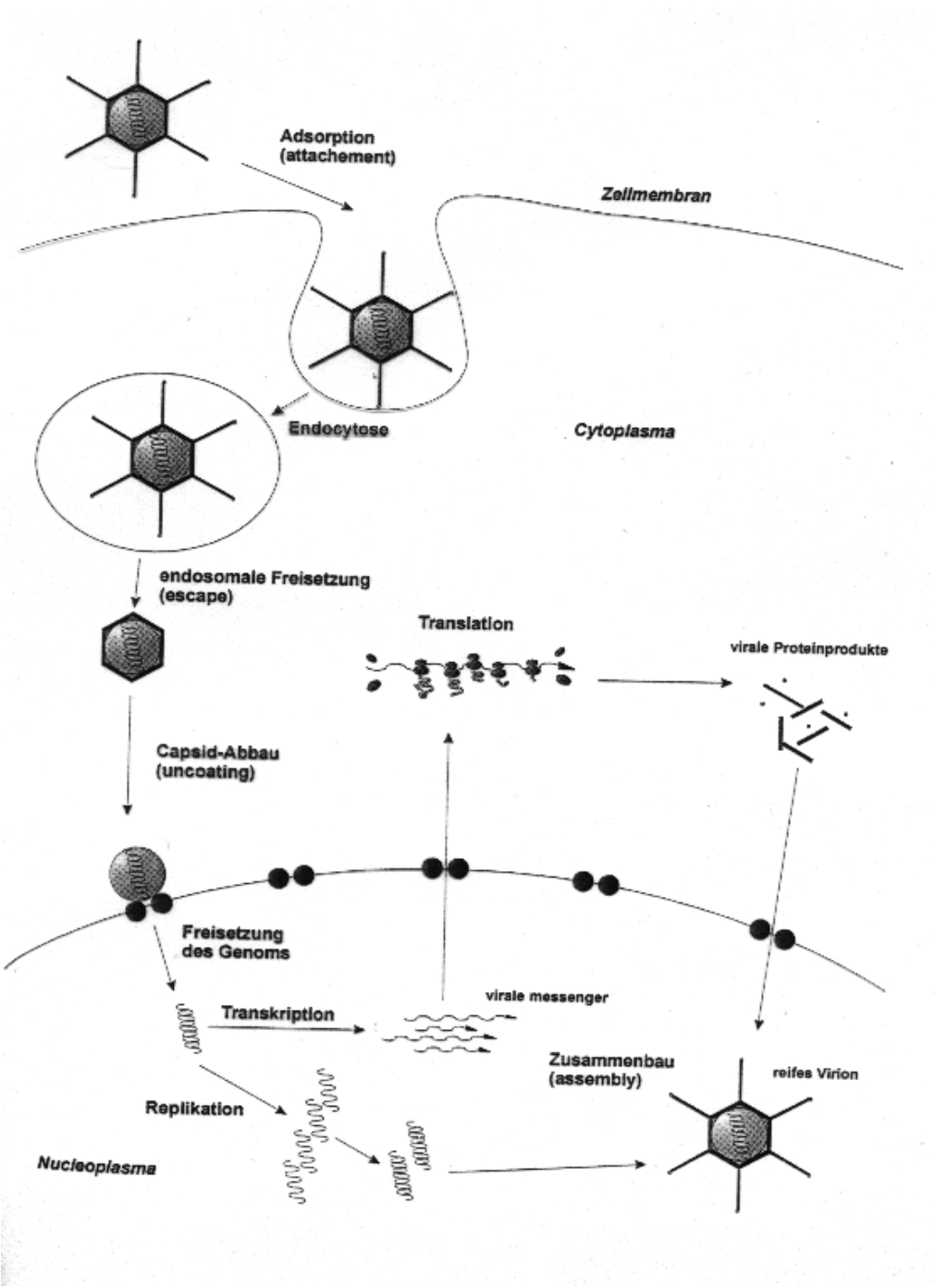


Abbildung 4: Der adenovirale Lebenszyklus

Durch akkumulierende virale Komponenten entstehen nukleäre Läsionen, die schließlich zum Zusammenbruch des nukleären und später auch zellulären Metabolismus führen. Es fällt jedoch auf, daß trotz dieser zytopathischen Effekte, eine adenovirale Infektion meist einen klinisch milden Verlauf nimmt (Rubin and Rorke, 1988). Es zeigen sich vor allem nasopharyngeale und pulmonale Infektionen. In seltenen Fällen kann es auch zu Keratokonjunktivitis, infantiler

Gastroenteritis und hämorrhagischer Zystitis kommen. Die Symptome treten jedoch bei immunkompetenten Personen abgeschwächt oder überhaupt nicht auf. Auf Grund einer möglichen Persistenz infektiöser Virionen in sekundärem lymphatischem Gewebe könnte es zur Aufrechterhaltung eines langfristigen immunologischen Gedächtnisses kommen (Horowitz,1990). Daher ist eine Reinfektion mit einem Adenovirus desselben Serotyps nahezu ausgeschlossen.
Zu gentherapeutischen Zwecken werden in erster Linie die Serotypen 2 und 5, die wenig pathogene Potenz besitzen, verwendet. Adenoviren haben eine hohe Verpackungskapazität (106% der Größe ihres Wildtyp-Genoms). Weiterhin wird ein großer Teil der E1-Region und der nicht replikationsnotwendigen E3-Region entfernt, was die Replikationsfähigkeit der Viren unterbindet.
Die hergestellten Vektoren infizieren sowohl ruhende als auch proliferiende Gewebe, somit unter anderem Hepatozyten, Lymphozyten und Neurone (Abken et al., 1987; Akli et al., 1993), Makrophagen (Haddada et al., 1993) und Endothelzellen (Lemarchand et al., 1992).
Der Einsatz der heutigen adenoviralen Vektorsysteme wird durch zwei Faktoren limitiert. 1) Die transferierte genetische Information geht auf Grund von Zellteilungsvorgängen oder Degradatiosvorgängen verloren (Strauss, 1994). 2) Die humorale und zelluläre Immunantwort führt zu Inaktivität viral eingebrachter Strukturen (Yang et al., 1994).
In der gentherapeutischen Behandlung der FH ist der adenovirale Vektor zur Zeit die erste Wahl. Die Behandlung ist auf eine Senkung des Serumcholesterinspiegels ausgerichtet. Die Wirkungsprinzipien zielen in erster Linie auf eine erhöhte Lipoproteinaufnahme der Hepatozyten ab, z.B. LDL-Rezeptor-Gentransfer (Choewdhury et al., 1991; Herz&Gerard 1993; Ishibashi et al., 1993; Kozarsky et al., 1994 Li et al., 1995) oder VLDL-Rezeptor-Gentransfer (Kobayashi at al., 1996). Adenovirale Vektoren werden neben Untersuchungen in vitro auch in vivo eingesetzt. Informationen über die Wirkung dieser Vektoren sind an Tiermodellen gewonnen worden. Hier sind die LDL-Rezeptor-*Knockout*-Maus (Ishibashi et al., 1993) und das Watanabe-(WHHL)-Kaninchen (Watanabe, 1980) zu nennen. Ishibashi gelang es, die Rezeptordefizienz bei LDL-R $^{-/-}$-Mäusen durch adenoviralen Gentransfer zu kompensieren. Ihr anfänglich hypercholesterinämischer Zustand wurde wieder aufgehoben. Auf Grund physiologischer Unterschiede im Lipoproteinmetabolismus zwischen Maus und

Mensch sind die gewonnenen Informationen allerdings begrenzt. Diese Differenzen treten zwischen dem Kaninchen und dem Menschen nicht auf. Daher ist das WHHL-Kaninchen mit einer homozygoten LDL-R-Defizienz zur Zeit das informativste Tiermodell der FH. Im Vergleich zu einem Referenz-Kaninchen (New Zealand White, NZW-Kaninchen, Plasmacholestrerinwert 40-50 mg/dl) hat es einen Plasmacholesterinwert von 700-900 mg/dl. Ein weiterer Vorteil liegt in der wesentlich höheren Lebensdauer im Vergleich zur Maus.

Adenovirale Vektoren haben eine ausreichend hohe Kapazität, um zu einer benötigten Transduktionseffizienz zu führen. Es war daher möglich im WHHL-Kaninchen eine gegenüber dem NZW-Kaninchen 10-fach höhere LDL-Rezeptor-Überexpression in der Leber zu erreichen (Wilson et al., 1993). Der verwendete Promotor war hierbei der Cytomegalievirus-Promotor, CMV. Dies führte zu einem Abfall der Plasmacholesterinkonzentration für eine Woche auf Normwerte. Innerhalb der folgenden zwei Wochen stieg dieser Wert jedoch wieder auf Ausgangsniveau. Eine erneute Applikation führte zu keinem Abfall der Cholesterinkonzentration im Plasma. Eine weitere adenovirale Transfektionsstudie einer Kaninchen-LDL-R-cDNA mit einem Rous-Sarkom-Virus(RSV)-Promotor führte ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme des Cholesterinspiegels (Li et al., 1995). Hier kam es drei Wochen nach der Applikation zu einem Anstieg der Plasmacholestreinkonzentration auf Ausgangswerte. Eine erneute Transfektion ergab keinen Rückgang der Konzentrationen. Dieses Phänomen beruht am ehesten auf einer Immunreaktion gegen das Virus und/oder die Transgenstrukturen. Es konnte der Nachweis erbracht werden, daß hohe Titer neutralisierender Antikörper gegen den applizierten Vektor vorhanden sind (Wilson et al., 1993). Um eine erfolgreiche Gentherapie in der Zukunft am Menschen durchführen zu können, ist es daher notwendig, die Immunantwort zu umgehen.

Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Funktionalität von adenoviralen Vektoren für die gentherapeutische Behandlung der Familiären Hypercholesterinämie untersucht werden. Die eingesetzten adenoviralen Vektoren, die die Überexpression des LDLRs bzw. des VLDLRs induzieren sollen, werden von Dr. Frank Schnieders bzw. Dr. Günther Cichon (MDC, Berlin) im Rahmen eines BMBF-geförderten Verbundprojektes zur Verfügung gestellt. Die Transgene stehen unter der Kontrolle verschiedener Promotoren, die eine starke leberspezifische Expression induzieren bzw. zur Cholesterin-regulierten Expression führen.
Die Expression und Funktionalität der untersuchten Proteine wird nach adenoviraler Infektion in verschiedenen Zellinien mittels der Western Blot Technik bzw. mit Aufnahmeexperimenten von radioaktiv-markierten Lipoproteinen *in vitro* quantifiziert. Für die Expressionsanalysen wird ein im Schaf hergestellter Peptid-Antikörper genutzt und charakterisiert, wobei der Einfluss der verschiedenen Promotoren getestet wird. Die Funktionalität der Vektoren soll der adenoviralen Vektoren soll ebenfalls im Tierexperiment überprüft werden. Zu diesem Zweck werden LDLR defiziente Mäuse und Kaninchen (Watanabe-Hyperlipidemic, WHHL) mit den oben erwähnten adenoviralen Gentransfer Vektoren infiziert (durchgeführt an der Humboldt Universität zu Berlin). Die Seren der Tiere werden vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion gewonnen und das jeweilige Lipoproteinprofil mittels Gelfiltrationsanalyse (FPLC) bestimmt. Zusätzlich wird Proteinlysat der infizierten Lebern hergestellt, um die Expression des LDLRs mittels Westen Blot Analyse zu vergleichen.
Die Ergebnisse sollen einerseits Information für die allgemeine Weiterentwicklung von Vektoren erbringen, andererseits auch den therapeutischen Nutzen eines Gentransfers für das Krankheitsbild der „Familiären Hypercholesterinämie“ aufzeigen.

Methoden und Material

- Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien, Firma Merck, Darmstadt oder Sigma Chemie, Taufkirchen
- Auto-Gamma-Counter Cobra II (Packard)
- Blotting-Kammer (Biorad)
- FPLC (Firma Pharmacia Biotech, Deutschland)
- FPLC-Säule Superose®6 (Firma Pharmacia Biotech, Deutschland)
- Glasplatten für die Gelelektrophorese (Firma Desaga)
- IBM Computer zur digitalen Verarbeitung aller Daten mit den Programmen Corel Draw und MS Office
- Laborzentrifuge Biofuge fresco (Hareus, Deutschland)
- Laborzentrifuge Labofuge (Hareus, Deutschland)
- Laborzentrifuge Rotanda /RP (Hettich, Deutschland) für Plasmazentrifugation
- Lichtmikroskop Olympus, Objektive Olympus Sp Plan 4x, Sp Plan 10x, CD Plan 20x und 40x
- Magnetrührer (Heidolph)
- Nitrocellulose Porengröße 45µm und Blotting Papier von Schleicher und Schuell
- Objektträger, 13mm Deckgläschen und Pinzetten (Firma Roth)
- Parafilm und alle Plastikwaren zur Inkubation (Firma Wilke und Witzel, Hamburg)
- Rollenmischgerät RM5 (Assistent Deutschland)
- Rotationsmischer 3300 (Eppendorf)
- Spektralphotometer 150-20 (Hitachi) mit eingebauter Küvette
- Sterile Filter (Sartorius)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf)
- Ultrazentrifuge Beckman L7-55 mit Swing out Rotor SW 41 mit passenden Zetrifugationsröhrchen
- Ultrazentrifuge Beckman TL-100
- Ultrazentrifuge Sorvall OTD65B mit Festwinkelrotor FW647 und Swing out Rotor SW 641 mit passenden Zentrifugationsröhrchen

- Vertoxer (Heidolph)
- Zellkultur Brutschrank (Heraeus)

Nachweis der Funktionalität von Vektoren in vitro

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde die Transfektionseffizienz von LDL-Rezeptor- und VLDL-Rezeptor-Promotoren nachgewiesen. Alle eingesetzten Vektoren wurden an der Humboldt-Universität zu Berlin hergestellt.

Zellkultur

Methode:
Die Zellkultur ist in diesem Teil der Arbeit die Grundlage für alle folgenden Arbeitsschritte. Daher werden im folgenden die allgemeinen Arbeitsregeln, die für die humane Hepatoma Zellinie (HuH7-Zellen) gelten, aufgeführt.
Die Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank (Hood) durchgeführt. Die im flüssigen Stickstoff gelagerten HuH7-Zellen wurden bei 37°C aufgetaut, und das 1ml umfassende Pellet wurde in 225 ml Zellkulturflaschen überführt, die bereits 12ml Medium enthielten. Nach ca. 48 Stunden waren die Zellen konfluierend gewachsen.
Zum Aufteilen der dicht gewachsenen Zellen auf diverse Gefäße mußten die Zellen durch Trypsinieren von der Kulturflasche abgelöst werden. Die Zellen wurden dafür zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 5ml Trypsinlösung ca. 3 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle bis zur Ablösung der Zellen inkubiert. Die nun von der Zellkulturflasche abgelösten Zellen wurden in ein 12ml Röhrchen mit vorgelegtem 8ml Vollmedium zur Inhibition der Trypsinlösung überführt und 5 Minuten bei 400x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Volumen von 6ml Vollmedium resuspensiert und für die Zellzählung ein Alliquot von 100µl entnommen. Es wurde eine 1:2 Verdünnung mit 100µl Trypanlösung hergestellt, um tote Zellen erkennen zu können, und anschließend wurden in der Neubauer-Zählkammer Zellen gezählt. Die Lebend-Zellzahl wurde berechnet (Zahl der Zellen in 16 Kleinstquadraten x Verdünnung $x10^4$

=Zellzahl/ml), und eine Zellsuspension mit definierter Zellzahl hergestellt. Die Aussaat für das Immunfluoreszenz-Experiment erfolgte in 6-Lochplatten, die mit je $2x10^5$ Zellen und je 4 runden Deckgläschen pro Loch bestückt waren.

Material:

- Trypsin / EDTA-Lösung (GIBCO)
- 10x Trypanblaulösung (GIBCO)
- Vollmedium:
    1. Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) für Hepatoma-Zellen
    2. 10% Foetales Kälberserum (FCS), (GIBCO)
    3. 100IU/ml Streptomycin/ Penicillin (GiBCO)
    4. 1x Glutaminlösung (GIBCO)
- Zellen: HuH7 (humane Hepatoma-Zellinie aus dem UKE, Hamburg)
- Alle anderen Materialien wurden bereits oben beschrieben

Transfektion

Methode:

Man gibt zunächst ca. 500 µl des DMEM-Mediums in ein Tube und inkubiert es im Verhältnis 10:1 mit FuGene-Reagenz. In diesem Fall wurden Medium und Reagenz mit 1 µg DNA versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einer 6-well-Platte waren bereits HuH7 Zellen zur Subkonfluenz kultiviert worden. Man tropft nun vorsichtig den DNA-haltigen Ansatz auf die Zellen und läßt sie mindestens 24 Stunden, jedoch maximal 72 Stunden den Transfektionsansatz aufnehmen.

Material:

- FuGene Transfection Reagent (Roche)
- DMEM-Medium (Gibco)
- gereinigte Plasmid DNA

Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der Transfektionseffizienz von LDL-R und VLDL-R Konstrukten

Methode:

Zur Darstellung der Transfektionseffizienz mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurden die auf den Deckgläschen gewachsenen HuH7-Zellen zu-

nächst mit kaltem DMEM gewaschen und für 30 Minuten im Kühlschrank bei 4°C gekühlt. Die Inkubationsmedien wurden mit LDL-R bzw. VLDL-R Promotoren angesetzt und im Kühlraum bei 4°C auf die Zellen pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem vorsichtigen Waschen mit PBS wurde die Fixierung der auf den Deckgläschen haftenden Zellen mit 1ml PFA-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 12-Lochplatten durchgeführt. Danach wurden die Zellen 5x 5 Minuten mit PBS und 1x mit Glycin-PBS Puffer gewaschen. Im Anschluß erfolgte die 15 minütige Inkubation mit 50ml Blocklösung, die danach mit Filterpapier entfernt worden ist. Der nächste Schritt war die indirekte Immunfluoreszenz bei 37°C für 60 Minuten mit einem in Blocklösung verdünnten primären Antikörper gegen LDL-R bzw. VLDL-R. Nach erfolgtem viermaligem Waschen für je 5 Minuten mit Glycin-PBS-Puffer folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper bei 37°C für 45 Minuten mit je 50µl Lösung, die in Blocklösung 1:1000 verdünnte Cy3-gekoppelte Antikörper gegen Immunglobuline des Kaninchens enthielt. Wiederum folgten 5 Waschschritte 5 Minuten dauernd mit PBS. Die Zellkerne wurden mit DAPI-Lösung für 3 Minuten gefärbt, und schließlich wurden die Deckgläschen auf einem Objektträger mit 5µl Mowiol eingedeckelt. Nachdem die Objektträger über Nacht getrocknet waren, erfolgte die mikroskopische Untersuchung der Zellen.

Material:

- VLDL-R- und LDL-R-Konstrukte (Herstellung an der „Humboldt Universität zu Berlin“)
- Phosphatgepufferte Salzlösung PBS (Gibco, phosphate buffered saline, 2,7mM KCl, 1,5mM KH_2PO_4, 137mM NaCl, 8,1mM Na_2HPO_4, pH=7,4)
- Inkubationsmedium (2% BSA (Sigma) in DMEM)
- PFA-Lösung (8%ige PFA-Stammlösung wurde nach Erhitzen auf 60°C mit einem äquivalentem Volumen 2x PBS gemischt)
- Glycin-PBS-Lösung (20nM Glycin in PBS)
- Blocklösung (1% BSA, 10% Ziegenserum (Dianova, Hamburg), 5% Pferdeserum (GIBCO) in Glycin-PBS-Lösung)
- Antikörper:
    1. αLDL-R aus
    2. αVLDL-R aus
    3. Cy3-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Immunglobuline des Kaninchens (Jackson Immuno Research, Dianova, Hamburg)
- Dapi-PBS-Lösung (Hoechst Nukleus stain 1:1.000.000 in PBS)
- Alle anderen Materialien wurden bereits oben beschrieben

Quantitative Aufnahme-Experimente mit HuH7-Zellen

Für die quantitative Aufnahme von ^{125}I-markierten Lipoproteinen wurden zunächst HuH7-Zellen in 6-Lochplatten mit definierten Zellzahlen ausgesetzt. 24 Stunden nach der Aussaat wurden die konfluent gewachsenen Zellen mit VLDL-R und LDL-R überexpremierenden Konstrukten bzw. mit Kontrollvektoren transfiziert. Die Transfektion nahm Dr. J.Heeren in einem S2-Sicherheitslabor vor. Am 2. Tag nach der Aussaat wurden die Aufnahme-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden ^{125}I-markierte Lipoproteine (die Markierung wurde von Dr.T.Grewal, Labor Dr.Jäckle, und Dr.J.Heeren, Labor Prof.U.Beisiegel, I.Med.Klinik, UKE,Hamburg, durchgeführt) den transfizierten Zellen zugesetzt. Abhängig von der spezifischen Aktivität wurden 1-2µg/ml Ligand in das Inkubationsmedium pipettiert, wobei in jedem vergleichbarem Versuch äquivalente Mengen des Liganden benutzt wurden. Um die spezifische Aufnahme zu bestimmen, wurde in den Ansätzen ein 30facher Überschuß an nicht markierten Liganden hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C wurden die Zellen bei 4°C viermal mit PBS gewaschen, wobei der erste für 1 Minute und die drei weiteren Waschschritte für jeweils 5 Minuten durchgeführt wurden. An der Oberfläche der Zellen gebundene Liganden wurden mit Heparinlösung abgelöst (unspezifische Bindung). Im Anschluß wurden die Zellen mit 1ml NaOH lysiert, und die in die Zelle aufgenommene Radioaktivität im Gammacounter gezählt. Das Zellprotein wurde gemäß der Methode nach Bradford bestimmt. Zur Berechnung einer Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Gamma-Globulinstammlösung (1mg/ml) eine Konzentrationsreihe im Bereich von 1 bis 16 µg/ml erstellt, mit Aqua bidest auf 700µl aufgefüllt und mit 100µl 0,1M NaOH ergänzt.

Es wurden 100µl der 0,1M NaOH Probe genommen und dieser 700µl Aqua bidest zugeführt.

Beiden wurde 200µl Bradford-Reagenz addiert, die Probe gut durchmischt, und nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten der proportional zur Proteinkonzentration entstandene bläuliche Farbstoff bei 595nm gemessen. Mit Hilfe der spezifischen Radioaktivität wurde die Aufnahme in ng aufgenommener Ligand pro mg Zellprotein berechnet. Die spezifische Aufnahme ergab sich aus der Subtraktion der unspezifischen Aufnahme von der Gesamtaufnahme.

Material:

- Lösungen der ^{125}I-LDL, der ^{125}I-Rap, der ^{125}I-CM, der LDL, der Rap, der CM und der ^{125}I-CM mit 30fachem Zusatz von nicht markiertem ApoE
- Heparinlösung (770 U/ml Liquemin®, La Roche, Schweiz)
- Natronlauge (0,1 N NaOH)
- Zellkulturplatten und –flaschen der Firmen Nunc und Falcon
- Medien
  - (1) DMEM-Vollmedium
    - -Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)
    - -10% fötales Kälberserum (FCS),(Gibco)
    - -1% (100 IE) Streptomycin/Penicillin(Gibco)
  - (2) Inkubationmedium (5%BSA (Sigma) in DMEM)
- PBS (phosphate buffered saline)2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4, 137 NaCl, 8,1 mM Na_2HPO_4, pH 7.4
- 1% Trypsin-EDTA (Gibco)
- 10x Tryptanblaulösung (Gibco)
- Eingesetzt wurden folgende Zellinien:
  - (1) HuH7: humane Hepatomazellinie (aus dem UKE Hamburg)
- Bradford-Proteinbestimmung:
  - (1) Gamma-Globulinstammlösung 1mg/ml
  - (2) Natronlauge (0,1N NaOH)
  - (3) Aqua Dest.
  - (4) Proteinreagenz (Bradford-Reagenz) der Firma Biorad

Testung von Antikörpern gegen den LDL-R

Es wurden Antikörper gegen die Peptide aus dem humanen LDL-Rezeptor bei der Firma Abimed hergestellt. Die aufgereinigten Antikörper wurden an Lebermembranpräparationen getestet.

Für die Auftrennung der Lebermembranpräparationen bei der Antikörpertestung, für die Auftrennung der Proteine der transfizierten HuH7-Zellen (siehe unten) und für den Nachweis von überexpremierten LDL-Rezeptoren in Lebermembran-präparationen infizierter LDL-R k/o-Mäuse (siehe unten) mit anschließender Westernblot-Analyse ist die diskontinuierliche SDS-Page nach Neville benutzt worden (Neville, 1971).

Zunächst wurde das Trenngel für die Trennung der Lipoproteine 10%ig gegossen. Das Sammelgel enthielt 3% Acrylamid. Einer definierten Menge an Protein aus den Lebermembranpräparationen wurden 10%iges SDS und jeweils 10% des Gesamtvolumens an β-Mercaptoethanol und Bromphenolblau (in [µl]) zugegeben. Die Proben wurden bei 95°C für 10 Minuten gekocht. Je 150µl der Proben wurden nach kurzer Abkühlung unter reduzierten Bedingungen elektrophoretisch getrennt. Proteinstandards (BSA [2µgProtein/µl]) wurden zur Bestimmung der Molekulargewichte parallel aufgetragen. Bei konstanten 30 mA erfolgte die Auftrennung für ca. 3,5 Stunden. Im Anschluß erfolgte eine Westernblot-Analyse. Hierzu wurden die Proteine zunächst durch Elektroblotting mit 250mA über Nacht auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dann erfolgte eine Immundetektion nach Beisiegel (Beisiegel et al., 1982). Die Proteine wurden zuächst mit Ponceau-Lösung gefärbt. Entsprechend der geplanten Inkubation mit den von der Firma Abimed hergestellten LDL-R Antikörpern wurde die Nirocellulose beschriftet und geschnitten. Zur Entfärbung wurde PBS benutzt, und die Nitrocellulosestreifen wurden dann in Blockingpuffer 1 Stunde blockiert. Nun erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper αLDL-R aus dem Schaf (αLDL-R 5193 und αLDL-R 5194) mit einer Verdünnung von 1:50 bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Blots 1 Minute mit Waschpuffer A, zweimal 10 Minuten mit Waschpuffer B und nochmals 1 Minute mit Waschpuffer A gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Die Nitrocellulosestreifen wurden 1 Stunde mit dem Antikörper Esel-α-Schaf-Immunglobulie mit einer Verdünnung von 1:2500 inkubiert. Nachfolgend wurden erneut, wie oben beschrieben, die Nitrocellulosestreifen gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels des ECL-Detektiossystems nach Herstellerangaben. Abschließend wurde der Blot auf einem Röntgenfilm in einer Filmkassette entwickelt.

Material:

- Trenngel aus je 10ml:
    1. Acrylamidlösung bestehend aus X g Acryamid (Roth, Y% x4 = X g); 0,4 g Bisacrylamid (Serva) ad 100 ml Aqua bidest.
    2. Untergelpuffer (1,7 M Tris-HCl (Roth); pH 9,18 mit 18%iger HCl)
    3. Temed-Lösung (0,6 ml Tetramethylethylendiamin (Temed, Serva) ad 100ml Aqua bidest)
    4. AP Lösung (200 mg Ammoniumpersulphat (Serva) ad 100 ml Aqua bidest)

- Sammelgel aus
    1. 5 ml Acrylamidlösung (12g Acrylamid(Roth) ; 0,8 g Bis-acryamid(Serva) ad
       100 ml Aqua bidest)
    2. 5 ml Obergelpuffer (0,2 M Tris-HCl (Roth) mit 1N H_2SO_4 auf pH 6,14)
    3. 2 ml AP-Lösung (200mg Ammoniumpersulphat (Serva) ad 100 ml Aqua bidest)
    4. 8 ml Aqua bidest
    5. 20µl unverdünntes Temed (Serva)
- Unterer Elektrodenpuffer (0,42 M Tris-HCl(Roth) mit 18%iger HCl auf pH 9,5)
- Oberer Elektrodenpuffer (0,04 M Borsäure; 0,04 Tris-HCl (Roth) 1Promille SDS (Serva) pH Wert mit 18%iger HCl auf 8,64)
- β-Mercaptophenol (Serva)
- Bromphenolblaupuffer (Spatelspitze Bromphenolblau in Aqua bidest lösen; 87%iges Glycerin mit Bromphenolblaulösung auf 80% verdünnen)
- SDS Lösung (10% Natriumdodecylsulphat (Serva) in 50mM Tris-HCl (Roth))
- Ponceau 0,2% in 3% Trichloessigsäure (Serva)
- Elektroblottingpuffer (20mM Tris-HCl (Roth), 150 mM Glycin (Serva), 20% Methanol)
- Blockingpuffer (5% BSA (Rinderserumalbumin Fraktion V ,Serva) in Waschpuffer A)
- Waschpuffer A (10mM Tris-HCl (Roth) , 86mM NaCl, 0,1% Tween 20 pH 7,4)
- Waschpuffer B (10mM Tris-HCl (Roth) , 86mM NaCl, 0,1% Tween 20, 0,3mM SDS (Serva), 6mM Natriumdesoxycholat pH 7,4
- ECL-System (Firma Amersham)
- Antikörper:
    1. Polyklonale Antikörper aus dem Schaf gegen LDL-R (αLDL-R 5193, Firma Abimed)
    2. Polyklonale Antikörper aus dem Schaf gegen LDL-R (αLDL-R 5194, Firma Abimed)
    3. Esel anti Schaf-Immunglobuline mit Meerrettich-Peroxidase (diano-va, Hamburg)

Westernblot-Analyse VLDL-R und LDL-R überexpremierender Konstrukte

Zur Testung von VLDL-R, LDL-R und Kontrollvektor Konstrukten wurden zunächst HuH7-Zellen auf Petrischalen zwei Tage bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend mit den Konstrukten transfiziert . Wiederum 24 Stunden später erfolgte der Essay. Die Zellen wurden zunächst mit 2ml kaltem PBS gewaschen. Die weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Mit einem

Zellschaber wurden die Zellen vom Boden der Petrischale gelöst und in ein Epitube überführt. Anschließend wurden die Epitube bei 1500 x g bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 500µl Zellysispuffer aufgenommen und homogenisiert. Nach 10minütigem Stehenlassen auf Eis wurden die Epitubes bei 4°C bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, und eine wie oben beschriebene Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Es wurden 50µg Protein pro Bahn aufgetragen. Nach diskontinuierlicher SDS-Page mit einem 7,5%igem Acryamid-Gel wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Dann erfolgte der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran mittels Elektroblotting mit 250mA über Nacht. Die weiteren Schritte sind bereits oben beschrieben worden. Es erfolgte eine Inkubation der Nitrocellulosestreifen mit dem ersten Antikörper αLDL-R 5193 aus dem Schaf (Verdünnung 1:50), αLDL-R638 aus dem Kaninchen (Verdünnung 1:1000), αVLDL-R 6A6 aus der Maus (Verdünnung 1: 500) bzw αβ-Gal aus dem Kaninchen (Verdünnung 1:1000). Nach der oben beschriebenen Waschung wurden die Nitrocellulosestreifen für 1 Stunde mit dem zweiten entsprechenden Anitkörper inkubiert. Die Detektions erfolgte mit dem ECL-Detektionssystem.

Material:

- Zellysispuffer (50mM Tris, 2mM $CaCl_2$, 80 mM$NaCl_2$, 1% Triton X100, ad aqua dest, PIC im Verhältnis 1:100-1:1000, auf pH 8,0)
- Antikörper:
  1. Polyklonale Antikörper aus dem Schaf gegen LDL-R (αLDL-R 5193,Firma Abimed)
  2. Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen LDL-R (αLDL-R 638, Firma
  3. Polyklonale Antikörper aus der Maus gegen VLDL-R (αVLDL-R 6A6, Firma
  4. Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen β-Galaktosidase (α-β-Gal, Firma CLONTECH Laboratories, Inc.)
  5. Ziege anti Maus-Immunglobuline gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Dianova, Hamburg)
  6. Esel anti Schaf-Immunglobuline gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Dianova, Hamburg)
  7. Ziege anti Kaninchen-Immunglobuline gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Dianova, Hamburg)
- Alle anderen Matreialien wurden bereits beschrieben

Nachweis der Funktionalität LDL-Rezeptor überexpremierender Konstrukte

Die Versuche wurden an LDL-R k/o-Mäusen an der „Humboldt Universität zu Berlin“ durchgeführt. Den Tieren wurde vor Beginn der Versuche Blut entnommen. Dann erfolgte die Infektion mit einem RSV gesteuerten LDL-R überexpremierenden Konstrukt. Am 6.Tag nach der Infektion wurde den LDL-R k/o-Mäusen erneut Blut abgenommen, und anschließend die Leber resiziert. Nach Zentrifugation des Blutes wurde das Serum im folgenden weiterverarbeitet.
Das Serum wurde zunächst mit einem 2,5%igem Anteil von 2M $CaCl_2$ rekalzifiziert, um das Fibrin auszufällen. Jeweils 100µl der Probe wurden auf eine FPLC-Säule Superose®6 aufgetragen. Als Laufmittel wurde PBS-Puffer verwendet. Das Serum trennte sich nach der Größe der Partikel auf und wurde in Tubes gesammelt. Die Fraktionsgröße betrug jeweils 0,5 ml. Für die Quantifizierung des Lipidgehaltes der Lipoproteine wurden das Cholesterin und die Triglyzeride mit Hilfe enzymatischer Farbtests (Testkits) der Firma Boehringer, Mannheim, photometrisch bestimmt. Die mitgelieferten Standards dienten zum Eichen des Photometers. Für die Bestimmung der Cholesterin- und Triglyzeridwerte wurden jeweils 10µl des fraktionierten Serum mit 1ml Cholesterin-bzw. Triglyzeridreagenz gemischt. Die Extinktion des entstandenen Farbstoffes wurde nach 10 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur bei 546 nm photometrisch bestimmt. Das Photometer errechnete mit den angegeben Faktoren 8,53 [mg/ml] für Cholesterin und 10,14 [mg/ml] für Triglyzeride die Konzentration der Lipoproteine in den Fraktionen.

Material:

- FPLC-Säule Superose®6 (Firma Pharmacia Biotech)
- Serum RSVLDL-R infizierter LDL-R k/o-Mäuse
- PBS-Puffer
- 2M $CaCl_2$
- Enzymatischer Farbtest für Cholesterin nach CHOD-PAP (Boehringer, Mannheim)
- Enzymatischer Farbtest für Triglyceride nach GPO-PAP (Boehringer, Mannheim)
- Qualitätskontrolle Precinorm® (Boehringer,Mannheim)
- Qulitätskontrolle Precipath® (Boehringer, Mannheim)

Qualitativer Nachweis von LDL-Rezeptoren im Lebergewebe infizierter LDL-R k/o-Mäuse mittels Westernblot-Analyse

Infizierten LDL-R k/o-Mäusen wurden an der „Humboldt Universität zu Berlin“ am 6.Tag nach erfolgter Infektion mit einem RSVLDL-R überexpremierenden Konstrukt die Leber resiziert. Das Lebergewebe wurde bei –20°C gelagert.
Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Hierzu wurden von dem Lebergewebe der infizierten Tiere, ebenso wie von Lebergewebe unbehandelter Mäuse und von humanen Lebern, Gewebestücke einer Größe von 200µg angefertigt. Das Gewebe wurde im Anschluß mit dem 6fachem Überschuß an Homogenisationspuffer (1,2ml) homogenisiert. Die entstanden Suspension wurde bei 800 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zentrifugation wurde unter denselben Bedingungen wiederholt, und der Überstand erneut abgenommen. Der nach der zweiten Zentrifugation gewonnene Überstand wurde nun für 1 Stunde bei 4°C bei 100.000 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet, in dem sich nun die Plasma-Membranen, das Endoplasmatische Retikulum und der Zellkern befinden, wurde mit 0,5 ml Resuspensionspuffer vorsichtig und vollständig resuspensiert und anschließend erneut bei 100000 x g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Das im Puffer befindliche Triton X 100 bewirkt, daß sich im Überstand nur noch angereicherte Fraktionen von Membranproteinen befinden. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde dann mit der bereits oben beschriebenen Methode nach Bradford bestimmt. Danach erfolgte unter reduzierten Bedingungen eine 10%ige SDS-Page mit anschließender Westernblot-Analyse. Dem Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran mittels Elektroblotting bei 250mA über Nacht folgte die Detektion mit dem ersten Antikörper bei 4°C ebenfalls über Nacht. Verwendet wurde ein α-LDL-R Antikörper aus dem Kaninchen mit einer Verdünnung von 1:500. Im Anschluß wurde die Detektion mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper, mit einer Verdünnung von 1:5000, für eine Stunde durchgeführt. Die Detektion der Nitrocellulosestreifen erfolgte, wie oben beschrieben mit dem ECL-Detektionssystem.

Material:

- Lebergewebe mit einem RSVLDL-R überexpremierenden Konstrukt infizierter LDL-R k/o-Mäuse, unbehandelter Mäuse und humanes Lebergewebe
- Homogenisationspuffer (20mM Tris HCl pH=7,4 , 2mM $MgCl_2$, 0,25M Sucrose)
- Resuspensionspuffer (50mM Tris HCl pH=8,0 , 2mM $CaCl_2$, 80mM NaCl, 1% Triton X ad 10ml Aqua bidest)
- Proteasen-Inhibitor, PIC: 1mM Pepstatin A, 10mM Chymostatin, 10mM Leupeptin, 10mM Antipain (Firma Calbiochem)
- Antikörper :
    1. Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen LDL-Rezeptoren (αLDL-R 638, Firma
    2. Ziege anti Kaninchen-Immunglobuline gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Dianova, Hamburg)
- Alle anderen Materialien sind bereits beschrieben worden

Nachweis der Funktionalität LDL-R überexpremierender Konstrukte an WHHL-Kaninchen

Die Infizierung der Watanabe-Kaninchen (WHHL-Kaninchen) mit einem LDL-Rezeptor überexpremierenden RSVLDL-R Konstrukt erfolgte an der „Humboldt Universität zu Berlin“. Zunächst wurde die Testung des Konstruktes an einem Kaninchen durchgeführt. Dabei wurden $1x10^{12}$ infektiöse Partikel pro Kilogramm Körpergewicht den Tieren injeziert. Nachdem die Experimente an dem Kaninchen gelangen, wurden im nächsten Schritt drei Kaninchen mit einem LDL-Rezeptor überexpremierenden Konstrukt infiziert. Das den Tieren entnommene Blut wurde zentrifugiert, und das gewonnene Serum bei –20°C gelagert.
Das Serum wurde zunächst mit 2m $CaCl_2$ behandelt und anschließend sind, wie oben beschrieben, 150µl über die FPLC-Säule Superose® aufgetrennt worden. Die Fraktionen wurden dann auf ihren Gehalt an Cholesterin und Triglyzeriden photometrisch bestimmt.

ERGEBNISSE

Zur Prüfung der Funktionalität von adeno-viralen Konstrukten wurden in dieser Arbeit zwei voneinander unabhängige Arbeitsschritte durchgeführt.
Zum einen wurden in vitro Experimente mit HuH7-Zellen durchgeführt, um verschiedene adeno-virale Konstrukte, die eine Überexpression von VLDL-R und LDL-R induzieren, zu testen. Hierzu wurde an den Zellen zum Nachweis der Funktionalität die Bindung und Aufnahme verschiedener Lipoproteine mit radioaktiven und Immunfluoreszenz-Methoden untersucht. Auch fand in diesem Zusammenhang eine Beurteilung der Expression über SDS-Page mit Western-Blotting statt.
Im zweiten Teil der Arbeit fand eine Auswertung der Seren von in vivo infizierten WHHL-Kaninchen und LDL-R k/o-Mäusen statt. Den Tieren wurden an der „Humboldt Universität zu Berlin“ LDL-R überexpremierende adeno-viralen Konstrukte injeziert. Die Auswertung erfolgte über die Auftrennung der Seren mittels FPLC und anschließender Analyse der fraktionierten Seren mit kommerziellen enzymatischen Farbtests.

Vektoren für in vitro Experimente

Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden in der Arbeitsgruppe Strauss an der „Humboldt Universität zu Berlin“ entwickelt.
Nach Herstellung eines Rezeptor-cDNA-Fragmentes des Kaninchen LDL-Rezeptors wurde dieses unter die Kontrolle eines RSV-Promotors (RSV= Rous Sarkom Virus) gebracht. An das 3´-terminale Ende wurde das Polyadenylierungssignal aus dem bovinen Wachstumshormon (bovine growth hormon), bGHPA, eingesetzt, der als humane Signalsequenz dient.

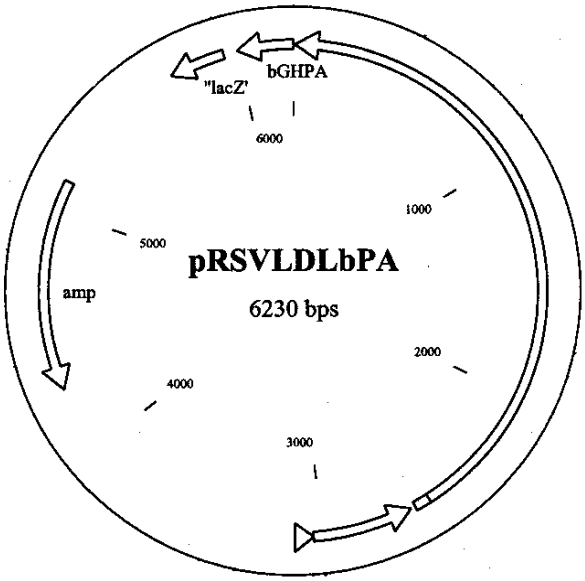


Abb. 5a: pRSVLDLbPA

Das zweite Plasmid war ein Rezeptor-cDNA-Fragment des Kaninchens unter der Kontrolle eines murinen Albuminpromotors. Dieser wurde mit drei zusätzlichen Bindungsstellen für leberspezifische Transkriptionsfaktoren (HNF3 sites) versehen.

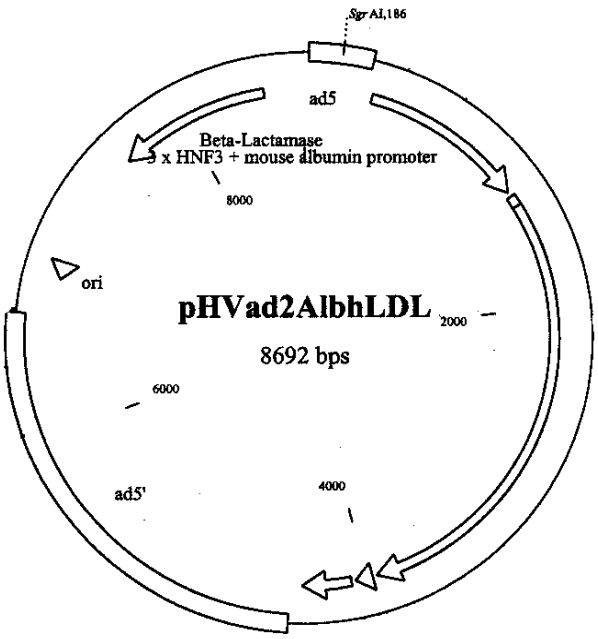


Abb. 5b: pHVad2AlbhLDL

Beim dritten Plasmid handelte es sich um ein Rezeptor-cDNA-Fragment des VLDL-Rezeptors. Der Promotor ist hierbei der Enhancer 2/CP. Es ist ein weitgehend leberspezifischer Hybridpromotor, zusammengesetzt aus dem minimalen CMV (Cytomegalivirus)-Promotor und dem Enhancer-Element des humanen Hepatitis B Virus Corepromotors.

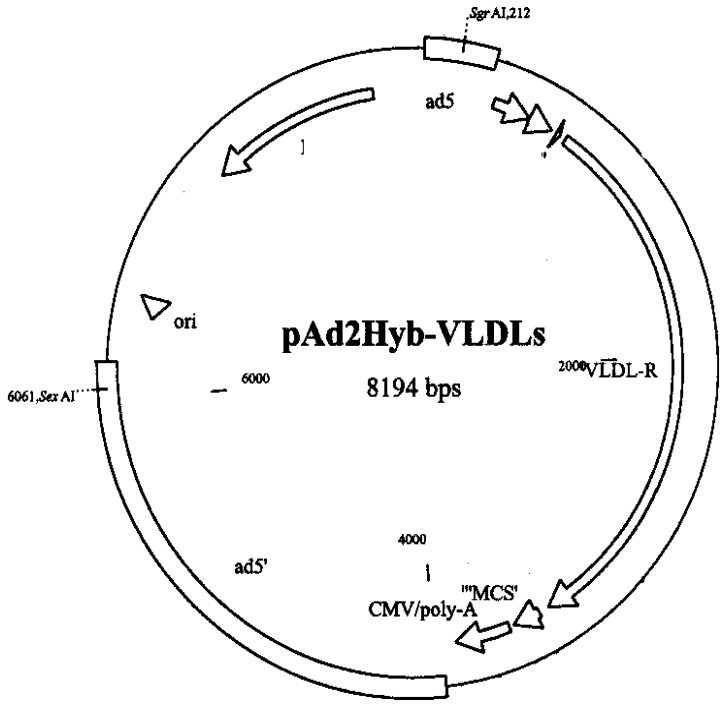


Abb. 5c: pAd2Hyb-VLDLs

Beim vierten Plasmid handelte es sich um ein humanes Rezeptor-cDNA-Fragment unter der Kontrolle des Autologen Promotors (AP600). Die Kontrolle des Autologen Promotors hat zur Folge, das dieses Konstrukt sterolreguliert wird, so dass es sich den Bedürfnissen des Organismus anpassend, die Expression des LDL-Rezeptors reguliert.

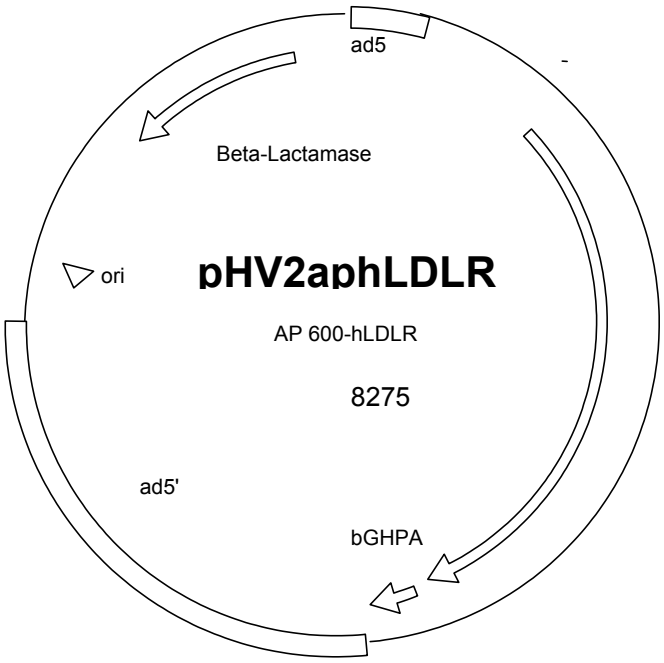


Abb. 5d: pHV2aphLDLR

Nachweis überexpremierten Proteins mittels Western-Blot-Analyse

Vor der funktionellen Testung in den in vitro Experimenten wurden die überexpremierenden Proteine, welche später auf die HuH7-Zellen transfiziert werden, mittels SDS-Page und Western-Blotting nachgewiesen.
Um die Transgene in verschiedenen Spezies nachweisen zu können, war es zunächst erforderlich einen Antikörper zu produzieren. Ziel war es, dabei einen Antikörper herzustellen, der spezifisch gegen den Kaninchen LDL-Rezeptor (Projekt 5194) gerichtet ist und einen polyklonalen Antikörper (Projekt 5193) gegen alle untersuchten Spezies herzustellen (mit freundlicher Unterstützung von Dr.J.Heeren, Labor Prof.U.Beisiegel,I.Med.Klinik, UKE Hamburg). Gegen

die Sequenz der LDL-Rezeptoren (rot-markiert) wurde mit Hilfe der Firma Abimed ein Antikörper hergestellt.

Antikörper Projekt 5193

```
Maus   9 RWVIALLLAAAGV- AVEDSGSRNEFQCRDGKC -IASKWVCDGSPECPDGSDESPKTCMSVTC 68
         RW +ALLLAAAG - AV D   RNEFQC+DGKC - I+ KWVCDGS EC DGSDES +TC+SVTC
Human  9 RWTVALLLAAAGT- AVGDRCERNEFQCQDGKC -ISYKWVCDGSAECQDGSDESQETCLSVTC 68
```

Antikörper Projekt 5194

```
Rabbit 1  LLAAAAGAAAGDKCGRNEFOCRN -GKCISYKWVCDGSSEC- ODGSDEWEOTCMSLTCKSDDF  60
            LL AAAG A GD+C RNEFQC++- GKCISYKWVCDGS+EC  QDGSDE ++TC+S+TCKS DF
Human 14  LLLAAAGTAVGDRCERNEFQCQD- GKCISYKWVCDGSAEC - QDGSDESQETCLSVTCKSGDF  73
```

Abb. 6a: Sequenzen der human, Maus und Kaninchen LDL-Rezeptoren für die Herstellung eines monoklonalen (Projekt 5194) und eines polyklonalen (Projekt 5193) Antikörpers

Die aufgereinigten Antikörper wurden mittels Western-Blotting an Lebermembran-präparationen getestet (die Methodik der Lebermembranpräparation wurde im Methoden- und Materialteil dieser Arbeit beschrieben). Der Antikörper 5194 erkennt ausschließlich den LDL-Rezeptor aus dem Kaninchen (Abb. 6b). Der Antikörper 5193 erkennt dagegen spezifisch den LDL-Rezeptor aus dem humanen Lebergewebe (Spur 1), aus der Maus (Spur 2), aus dem Kaninchen (Spur 3) und aus der Ratte (Spur 4) (Abb.6b).

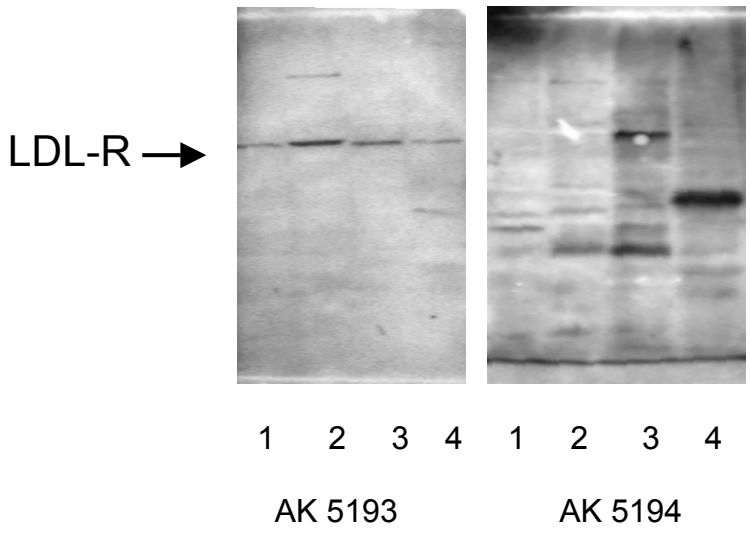


Abb. 6b: Nachweis der Funktionalität der LDL-R-Antikörper 5193 und 5194 mittels Western-Blotting an humanem Lebergewebe (Spur 1) Lebergewebe der Maus (Spur 2), des Kaninchens (Spur 3) und der Ratte (Spur4)

Die Präparation des Lebergewebes erfolgte wie im Abschnitt Methoden und Material beschrieben. Jeweils 120µg Protein des Lebergewebes der verschiedenen Spezies wurden pro Bahn einer 7,5%igen SDS-Page unter reduzierten Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran wurden die auf den Leberzellen befindlichen LDL-Rezeptoren mit den von der Firma Abimed hergstellten Antikörpern nachgewiesen.

Im nächsten Schritt wurde nun die Überexpression von LDL- und VLDL-Rezeptoren mittels einer SDS-Page und Westerblot-Analyse dargestellt. Zunächst wurden HuH7-Zellen ausgesetzt und mit einem 1) pHybVLDL-R-, 2) AlbLDL-R-, 3) RSVLDL-R-Vektor und 4) einem Kontrollvektor (β-Gal) transfiziert. Es folgte eine 48 stündige Inkubationszeit bei 37°C.

Die Detektion mit einem spezifischen Antikörper ergab, daß es nach der Inkubationszeit zu einer Überexpression des VLDL-R in HuH7-Zellen kam (Abb.7a). Die Überexpression des LDL-R in RSVLDL-R transfizierten Zellen konnte mittels des polyklonalen Antikörpers α-LDL-R 638 und des oben beschriebenen polyklonalen α-LDL-R 5193 –Antikörpers nachgewiesen werden (Abb.7b und 7c).

Die in diesem Zusammenhang ebenfalls nachzuweisende Überexpression des AlbLDL-R-Vektors gelang nicht, so daß davon auszugehen ist, daß dieser Vektor nicht funktionsfähig ist (Abb. 7b und 7c).
Die Detektion der Nitrocellulose-Membran mit einem polyklonalem Antikörper gegen β-Gal ergab ebenfalls ein Überexpressionssignal (Abb. 7d).

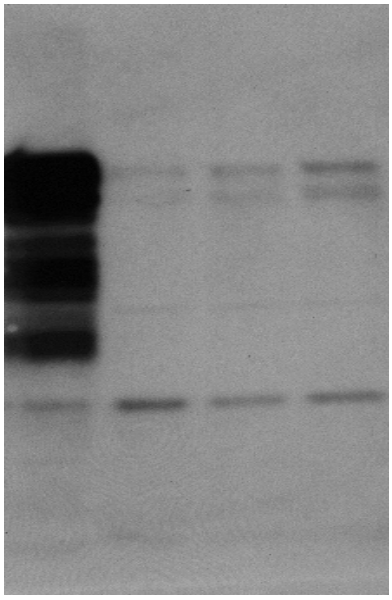


Abb. 7a: Detektion der Nitrocellulose-Membran mit dem polyklonalen α-VLDL-R Antikörper 6A6 zeigt eine Überexpression des VLDL-R

Die Hepatomazellen (HuH7) wurden mit den Transgenen pHybVLDL-R (Spur 1), AlbLDL-R (Spur 2), RSVLDL-R (Spur 3) und β-Gal (Spur 4) transfiziert und sind nach 48 stündiger Inkubatioszeit bei 37°C mit Zellysispuffer lysiert worden. Jeweils 50µg der lysierten Zellen sind pro Bahn einer 7,5%igen SDS-Page unter reduzierten Bedingungen aufgetrennt worden. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran.

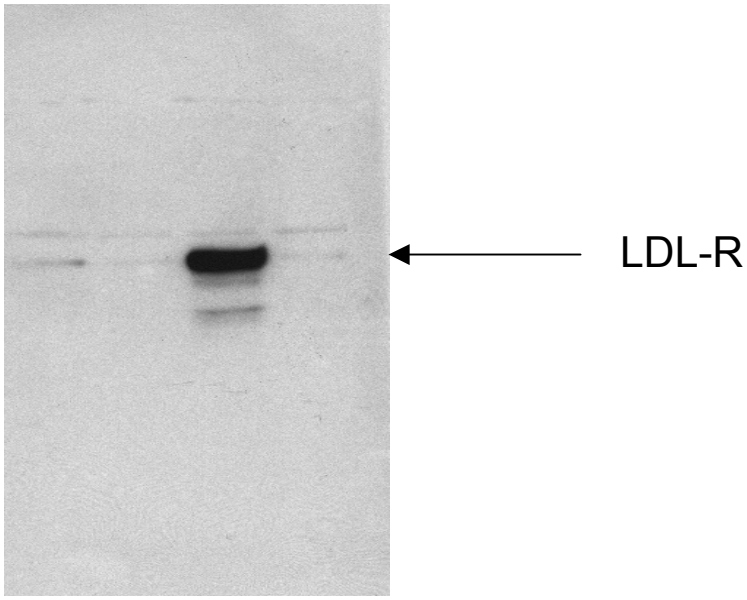


Abb. 7b: Detektion der Nitrocellulose-Membran mit dem polyklonalem α-LDL-R Antikörper 638 zeigt eine Überexpression des LDL-R in RSV-LDL-R transfizierten Zellen

Die Hepatomazellen (HuH7) wurden mit den Transgenen pHybVLDL-R (Spur 1), AlbLDL-R (Spur 2), RSVLDL-R (Spur 3) und β-Gal (Spur 4) transfiziert und sind nach 48 stündiger Inkubatioszeit bei 37°C mit Zellysispuffer lysiert worden. Jeweils 50µg der lysierten Zellen sind pro Bahn einer 7,5%igen SDS-Page unter reduzierten Bedingungen aufgetrennt worden. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran.

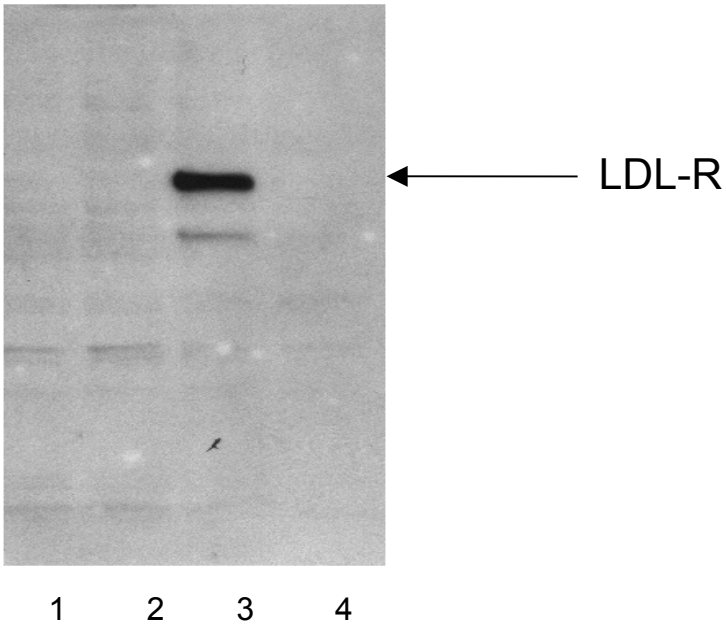


Abb.7c: Detektion der Nitrocellulose-Membran mit dem polyklonalem α-LDL-R Antikörper 5193 zeigt eine Überexpression des LDL-R in RSV-LDL-R transfizierten Zellen

Die Hepatomazellen (HuH7) wurden mit den Transgenen pHybVLDL-R (Spur 1), AlbLDL-R (Spur 2), RSVLDL-R (Spur 3) und β-Gal (Spur 4) transfiziert und sind nach 48 stündiger Inkuba-

tioszeit bei 37°C mit Zellysispuffer lysiert worden. Jeweils 50µg der lysierten Zellen sind pro Bahn einer 7,5%igen SDS-Page unter reduzierten Bedingungen aufgetrennt worden. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran.

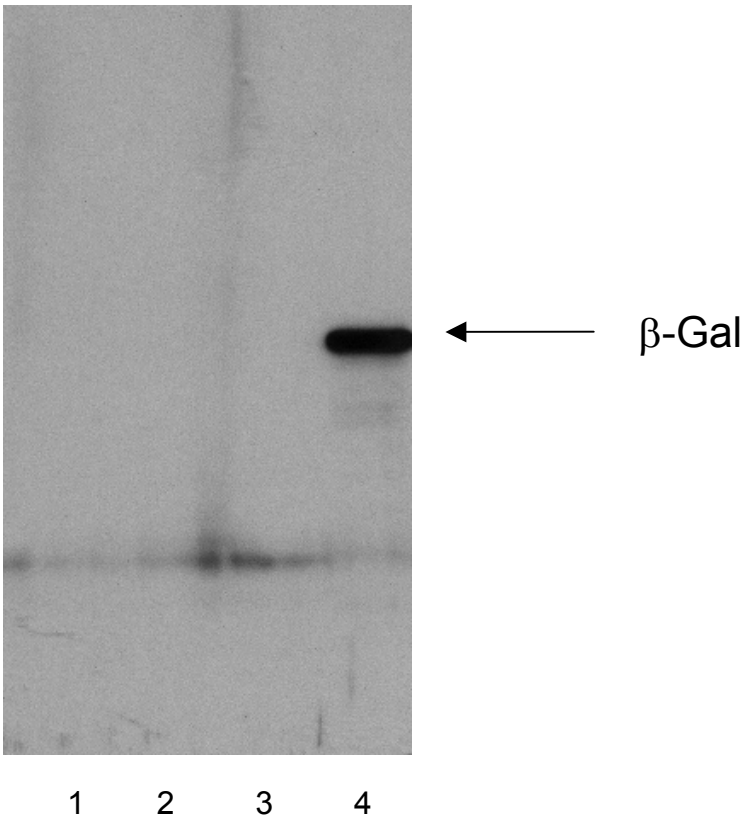


Abb. 7d: Detektion der Nitrocellulose-Membran mit dem polyklonalem α-β-Gal Antikörper zeigt eine Überexpression von ß-Gal

Die Hepatomazellen (HuH7) wurden mit den Transgenen pHybVLDL-R (Spur 1), AlbLDL-R (Spur 2), RSVLDL-R (Spur 3) und β-Gal (Spur 4) transfiziert und sind nach 48 stündiger Inkubatioszeit bei 37°C mit Zellysispuffer lysiert worden. Jeweils 50µg der lysierten Zellen sind pro Bahn einer 7,5%igen SDS-Page unter reduzierten Bedingungen aufgetrennt worden. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran.

Nachweis der Funktionalität der Vektoren in vitro

Es wurden bei den in vitro-Experimenten humane Hepatoma Zellen (HuH7) verwendet. Zunächst ist die Transfektionseffizienz von VLDL- bzw. LDL-Rezeptor-Konstrukten in diesen Zellen qualitativ nachgewiesen worden. Hierzu erfolgte eine Transfektion mit einem VLDL-Rezeptor- (Bild A und C) und einem LDL-Rezeptor-Konstrukt (Bild B und D). Die transduzierten Zellen wurden im

Anschluß mit einem Antikörper gegen den VLDL-Rezeptor (obere Reihe) und den LDL-Rezeptor (untere Reihe) immunmarkiert. Nach der Visualisierung mit einem fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper, konnte die Überexpression des VLDL-Rezeptors (Bild A) bzw. des LDL-Rezeptors (Bild D) auf zellulärer Ebene deutlich gezeigt werden. Es ist deutlich zu sehen, daß die benutzten Antikörper nicht kreuzreagieren (Bild B und C).

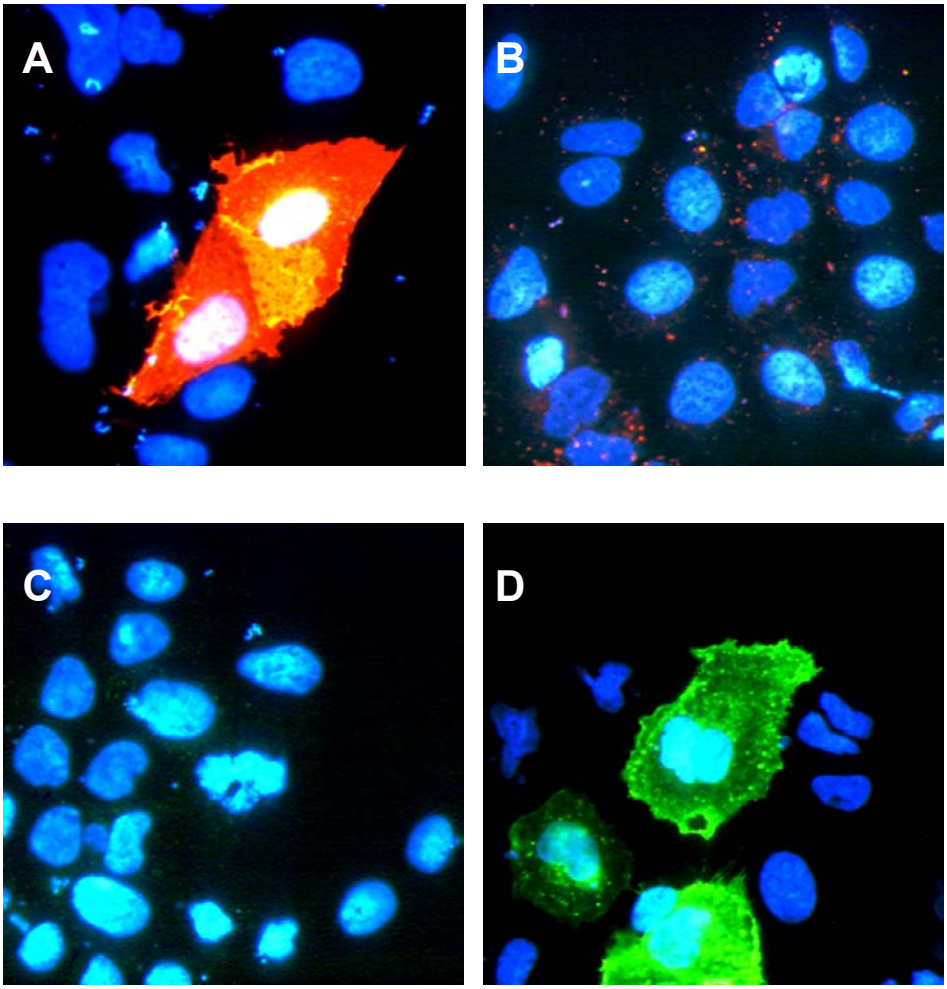


Abb. 8: Nachweis der Überexpression des VLDL- bzw. des LDL-Rezeptors in HuH7-Zellen mittels Immunfluoreszenz

HuH7 Zellen wurden auf Deckgläschen in DMEM unter Zusatz von 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin über 24 Stunden bis zur Subkonfluenz kultiviert. Die Zellen in Abb. A und C wurden mit einem VLDLR-Konstrukt bzw. in B und D mit einem LDLR-Konstrukt mittels Fugene transfiziert (siehe Material und Methoden). Die transduzierten Zellen wurden im Anschluß fixiert und mit einem Antikörper gegen den VLDLR (obere Reihe) bzw. mit einem AK gegen den LDLR (untere Reihe) detektiert. Die Expression der Rezeptoren wurden mit entsprechenden Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern und die Zellkerne mit DAPI visualisiert. Es ist für beide Rezeptoren (A=VLDLR; D=LDLR) die typische Plasmamembrananfärbung zu detektieren.

Nachdem im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, daß das LDL-Rezeptor-Konstrukt qualitativ zu einer Überexpression des LDL-Rezeptors führt, soll im folgenden Ergebnisteil auf den Nachweis der Funktionalität des LDL-Rezeptors eingegangen werden.

Es wurden Aufnahme-Experimente mit ^{125}I-markierter LDL (zur Verfügung gestellt von Dr. Jörg Heeren I.Med.Klinik, UKE Hamburg) an humanen Hepatoma-Zellen (HuH7) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zunächst mit pCMVhLDL-R, pRSV-LDL-R, pHybLDL-R Promotoren und einem Kontroll-Promotor (β-Gal) transfiziert. Die spezifische Aufnahme von ^{125}I-LDL in HuH7-Zellen wurde bei 37°C für 120 Minuten in cpm/mg Zellprotein bestimmt und im Verhältnis zu β-Gal dargestellt (β-Gal=1).

Ein relativer Anstieg der Aufnahme von LDL um das fast 3,5fache in pRSVhLDL-R transfizierten, um das fast 2,0fache in pCMVhLDL-R transfizierten und das annähernd 1,3fache in pHybLDL-R tranfizierten Zellen, wurde verzeichnet.

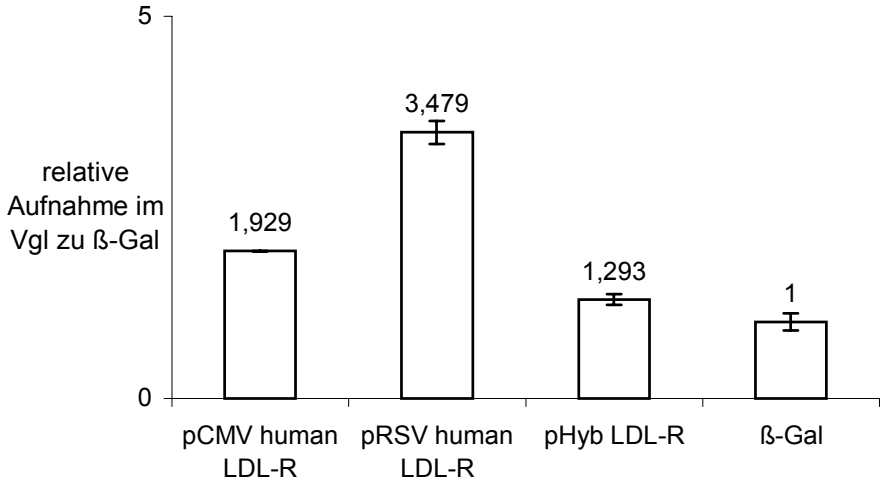


Abb. 9: Spezifische Aufnahme von ^{125}I-LDL im Vergleich vom pCMVhLDL-R, pRSVhLDL-R und pHybLDL-R Promotor in transfizierten HuH7-Zellen.

Die Hepatomazellinie HuH7 wurde mit der spezifischen Aktivität von 1-2µg/ml Protein des Lipoproteins LDL bei 37°C für 120 Minuten inkubiert. Die Aufnahme von LDL in β-Gal-transfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt und vergleichend der prozentualem Anstieg der Aufnahme von ^{125}I-LDL in pCMVhLDL-R (n=3), pRSVhLDL-R (n=3) und pHybLDL-R (n=3) Promotor transfizierten Zellen berechnet. Der absolute Wert von β-Gal betrug 68487 cpm/mg.

Da der qualitative Nachweis von VLDL-Rezeptoren nach Transfektion von HuH7-Zellen mit einem VLDL-R überexpremierenden Konstrukt gelang, sollte nun die Quantifizierung der Aufnahme von ^{125}I-markiertem LDL erfolgen. Zunächst wurden die HuH7-Zellen mit einem pHybVLDL-R-, einem RSVLDL-R- und einem Kontrollvektor (β-Gal) transfiziert . In der Abbildung 6a und 6b wurde die spezifische Aufnahme und die Bindung von ^{125}I-LDL an die transfizierten HuH7-Zellen bei 37°C für 90 Minuten in cpm/mg Zellprotein bestimmt. Für die spezifische Aufnahme von ^{125}I-LDL über RSVLDL-R wurde ein relativer Antieg um das 6,7fache verzeichnet, wohingegen die Aufnahme von ^{125}I-LDL über den VLDL-Rezeptor-Promotor pHybVLDL-R nur um das 1,1fache gesteigert war.

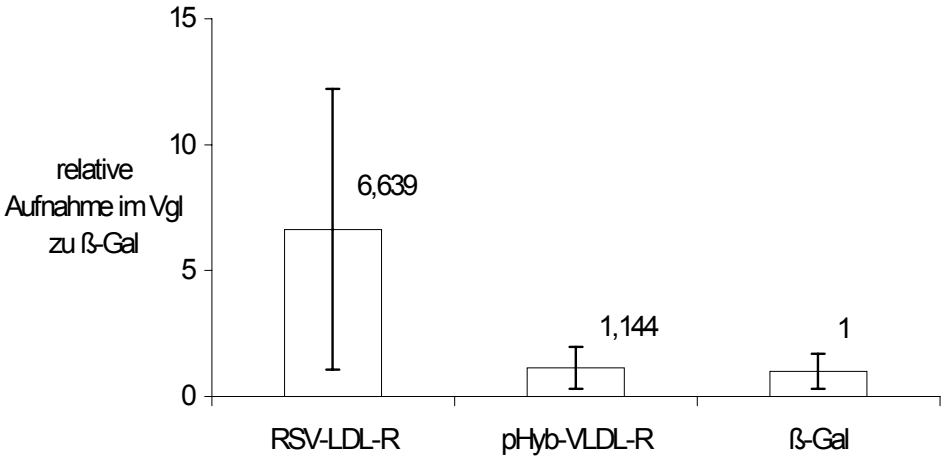


Abb. 10a: Spezifische Aufnahme von ^{125}I-LDL im Vergleich von RSV-LDL-R und pHybVLDL-R transfizierten HuH7-Zellen

Die Hepatomazellinie HuH7 wurde mit der spezifischen Aktivität von 1-2µg/ml Protein des Lipoproteins LDL bei 37°C für 90 Minuten inkubiert. Die Aufnahme von LDL in β-Gal-transfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt und vergleichend der prozentuale Anstieg der Aufnahme von ^{125}I-LDL in RSV-LDL-R (n=3) und pHybVLDL-R (n=3) Promotor transfizierten Zellen berechnet. Der absolute Wert für β-Gal betrug 33183 cpm/mg.

Für die Bindung von ^{125}I-LDL über RSV-LDL-R wurde ein relativer Anstieg um das fast 4,7fache verzeichnet. Der Wert für die unspezifische Bindung ist für

pHybVLDL-R und β-Gal nahezu unverändert. Der hohe Wert der Standartabweichung der unspezifischen Aufnahme von ^{125}I-LDL über RSV-LDL-R ergibt sich durch eine stark abweichende Aufnahme bei drei durchgeführten Testungen.

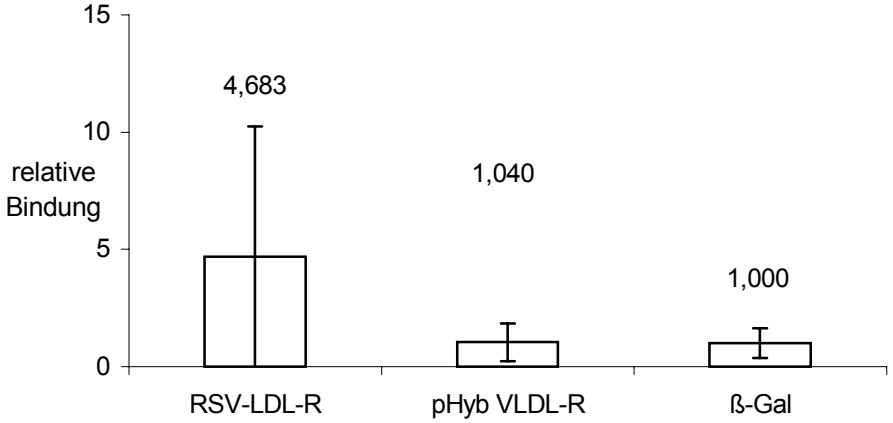


Abb. 10b: Bindung von ^{125}I-LDL an RSV-LDL-R und pHybVLDL-R transfizierten HuH7-Zellen

Die HuH7-Zellen wurden nach der Inkubatioszeit von 90 Minuten bei 37°C bei 4°C für 20 Minuten mit Heparin gewaschen. Das abgenommene Heparin gibt die unspezifische Bindung von ^{125}I-LDL in cpm/mg Zellprotein an. Die Bindung an β-Gal wurde gleich 1 gesetzt und vergleichend der prozentuale Anstieg der Bindung von ^{125}I-LDL an RSVLDL-R (n=3) und pHybVLDL-R (n=3) Promotor transfizierten Zellen berechnet. Der absolute Wert für β-Gal beträgt 2128 cpm/mg.

Aus den Abbildungen 10a und 10b ist zu ersehen, daß der pHybVLDL-R für die Funktionalität, gemessen an der spezifischen Aufnahme von ^{125}I-LDL, keine hohe Spezifität zeigt. Auf Grund der höheren Affinität zum VLDL-Rezeptor wurde im nächsten Versuch ^{125}I-markiertes Rap verwendet, um die Funktionalität des pHybVLDL-Promotors besser überprüfen zu können.

In den Abbildungen 11a und 11b wird die spezifische Aufnahme und die Bindung von ^{125}I-Rap an transfizierten HuH7-Zellen bei 37°C für 90 Minuten in cpm/mg Zellprotein gezeigt (β-Gal=1). Für die spezifische Aufnahme von ^{125}I-

Rap über pHybVLDL-R wurde ein relativer Anstieg um das 1,9fache und über den RSV-LDL-R ein 1,4facher Anstieg verzeichnet.

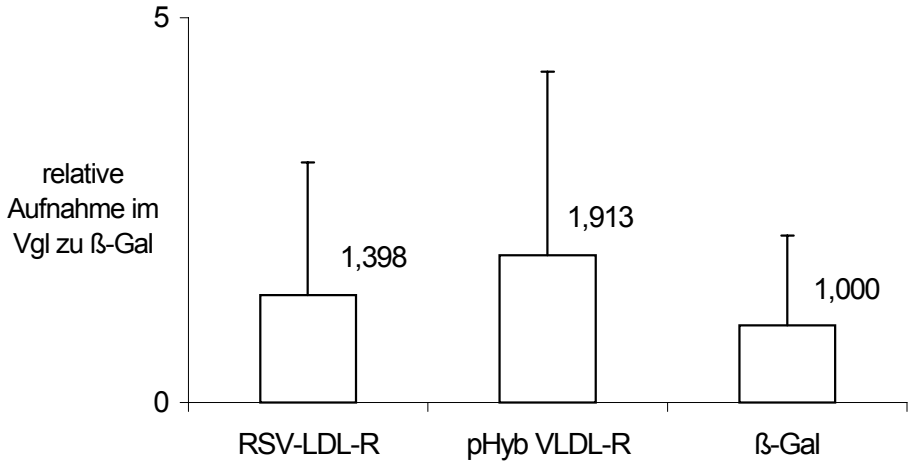


Abb. 11a: Spezifische Aufnahme von ^{125}I-Rap im Vergleich von RSV-LDL-R und pHybVLDL-R transfizierten HuH7-Zellen

Die Hepatomazellinie HuH7 wurde mit der spezifischen Aktivität von 1-2µg/ml Protein ^{125}I-Rap bei 37°C für 90 Minuten inkubiert. Die Aufnahme Rap in β-Gal transfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt und vergleichend der prozentuale Anstieg der Aufnahme von ^{125}I-Rap in RSVLDL-R (n=3) und pHybLDL-R (n=3) Promotor transfizierten Zellen berechnet. Der absolute Wert für β-Gal betrug 182631 cpm/mg.

Für die Bindung von ^{125}I-Rap an den transfizierten HuH7-Zellen wurde ein Anstieg um das 3,1fache beim pHybVLDL-R und ein nahezu 1,5facher Anstieg beim RSV-LDL-R Promotor beobachtet.

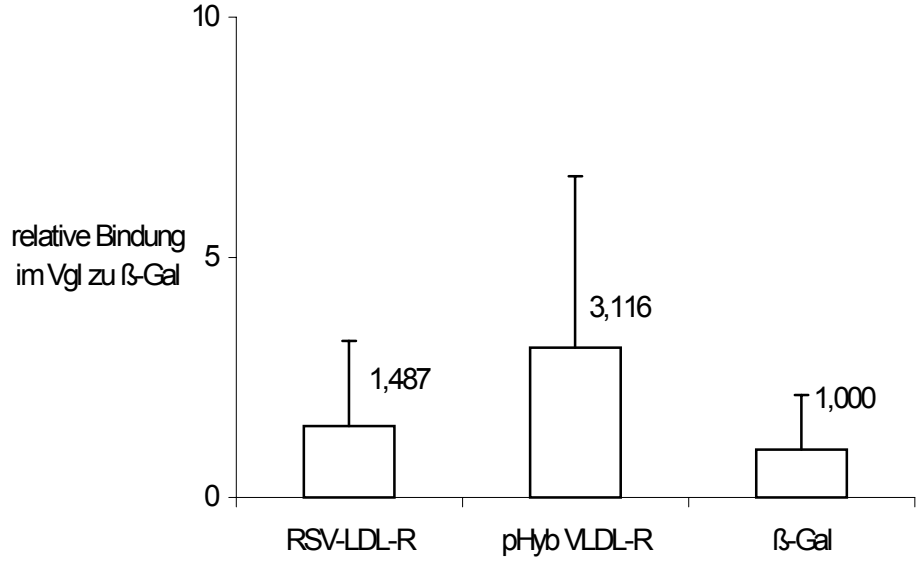


Abb. 11b: Bindung von ^{125}I-Rap an RSV-LDL-R und pHybVLDL-R transfizierten Zellen

Die Zellen wurden nach einer Inkubation bei 37°C über 90 Minuten bei 4°C 20 Minuten mit Heparin gewaschen. Das abgenommene Heparin gibt die Bindung von ^{125}I-Rap in cpm/mg Zellprotein an. Die Bindung an β-Gal wurde gleich 1 gesetzt und vergleichend wurde der prozentuale Anstieg der Bindung von ^{125}I-Rap an RSV-LDL-R (n=3) und pHybVLDL-R (n=3) Promotor transfizierten Zellen berechnet. Der absolute Wert von β-Gal beträgt 12055 cpm/mg.

Aus den Abbildungen 11a und 11b geht hervor, daß der pHybVLDL-Rezeptor-Promotor in den HuH7-Zellen eine Überexpression des VLDL-Rezeptors bewirkt, und dadurch auch eine gesteigerte Aufnahme und Bindung von Rap an die HuH7-Zellen erreicht wird. Der LDL-R bindet Rap mit wesentlich geringerer Affinität.

Im weiteren Verlauf der Versuche wurde nun untersucht, ob eine Senkung des Cholesterin-Spiegels dadurch erreicht werde, daß triglyzeridreiche Lipoproteine (Chylomikronen) über den LDL-Rezeptor bzw. VLDL-Rezeptor aufgenommen werden, und somit keine Lipoproteine der Klasse LDL entstehen.

Hierzu wurden HuH7-Zellen ausgesetzt und mit den in den Abbildungen 10 und 11 verwendeten Vektoren transfiziert. Als Ligand wurden nun ^{125}I-markierte Chylomikronen verwendet. Nach 90 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die spezifische Aufnahme und die unspezifische Bindung in cpm/mg Zellprotein bestimmt und über β-Gal induziert.

In der Abbildung 12a zeigt sich, daß die spezifische Aufnahme ^{125}I-markierten CM in pHybVLDL-R (1,17fach) und RSVLDL-R (1,13fach) transfizierten Zellen nicht höher war als in den mit einem Kontrollvektor (β-Gal=1) transfizierten Zellen.

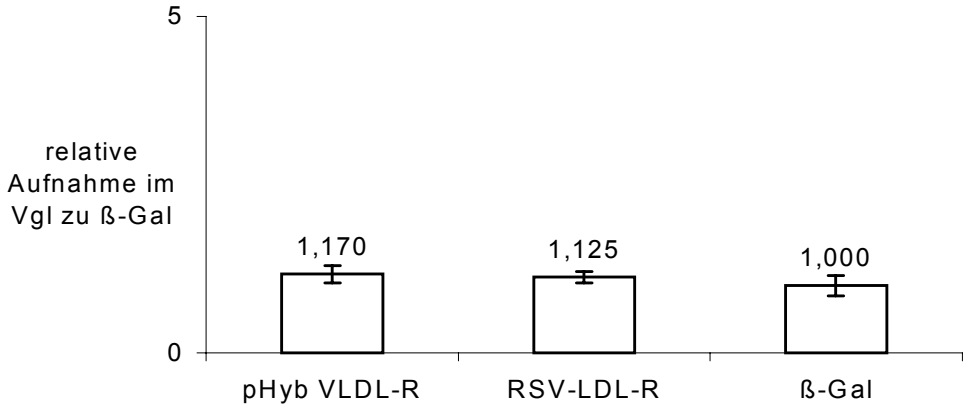


Abb. 12a: Spezifische Aufnahme von ^{125}I-markierten Chylomikronen in pHybVLDL-R

und RSVLDL-R transfizierten HuH7-Zellen

Die Inkubation der HuH7-Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Die Aufnahme von ^{125}I-CM in β-Gal transfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt und der prozentuale Anstieg der Aufnahme von^{125}I-CM in pHybVLDL-R (n=3) und RSVLDL-R (n=3) transfizierten HuH7-Zellen berechnet. Der absolute Wert von β-Gal betrug136657 cpm/mg.

Der Wert der Bindung lag noch unterhalb dem Wert des Kontrollvektors.

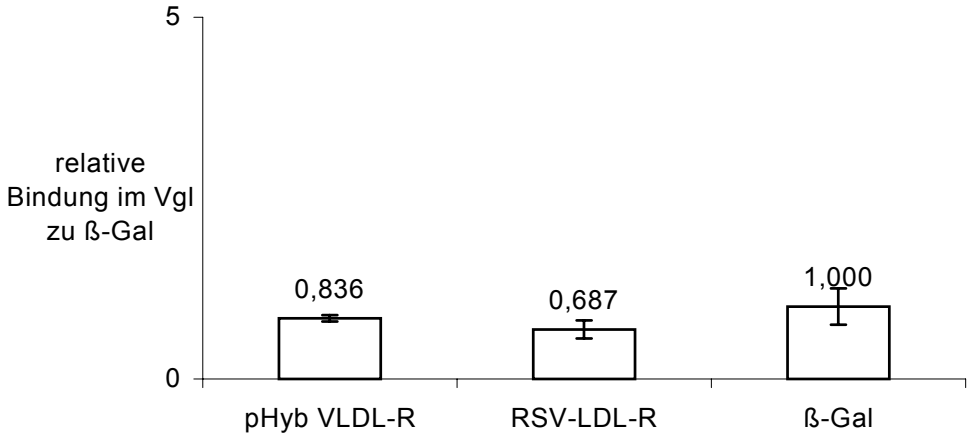


Abb. 12b: Bindung von ^{125}I-markierten Chylomikronen an pHybVLDL-R und RSVLDL-R transfizierten Zellen

Die Versuchsdurchführung wurde bereits oben beschrieben. Die Bindung von ^{125}I-CM an β-Gal transfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt, und der prozentuale Wert der Bindung von ^{125}I-CM an pHybVLDL-R (n=3) und RSVLDL-R (n=3) Vektor transfizierten Zellen berechnet. Der absolute Wert von β-Gal betrug 11490 cpm/mg.

Triglyzeridreiche Lipoproteine (Chylomikronen) binden über das Apolipoprotein E (ApoE) an den LDL- und VLDL-Rezeptor. Um den Bindungsgrad von Chylomikronen an die beiden Rezeptoren zu verstärken, wurde den ^{125}I-markierten CM, 2,5µg/ml ApoE zugesetzt.

Wiederum wurden HuH7-Zellen mit den oben beschriebenen Vektoren transfiziert und bei 37°C über 90 Minuten mit ^{125}I-CM und 17% ApoE-Zugabe inkubiert.

Die spezifische Aufnahme von ^{125}I-CM mit Zugabe von ApoE wurde in den mit β-Gal transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt und prozentual für die mit einem pHybVLDL-R- und einem RSV-LDL-R-Promotor transfizierten HuH7-Zellen berechnet. In den pHybVLDL-R transfizierten Zellen betrug der relative Anstieg

der Aufnahme das 1,5fache und in den RSV-LDL-R transfizierten Zellen das fast 2,4fache des β-Gal Wertes.

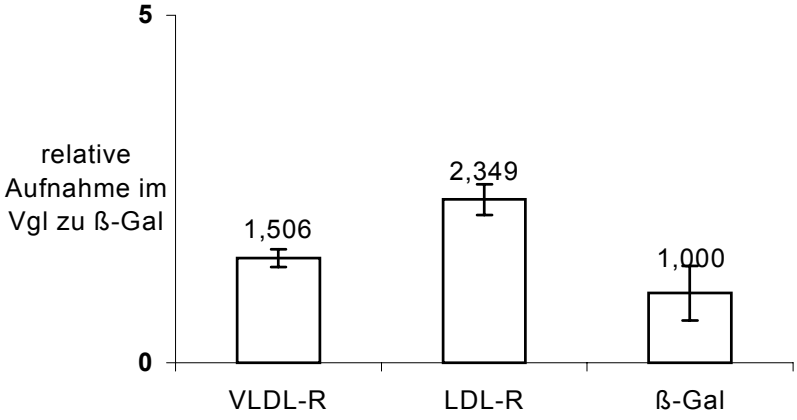


Abb. 13a: Spezifische Aufnahme von ^{125}I-markierten Chylomikronen unter Zugabe von 2,5µg/ml ApoE in mit pHybVLDL-R und RSVLDL-R Promotor transfizierten HuH7-Zellen

Die Durchführung des Versuches wurde bereits oben beschrieben. Die spezifische Aufnahme von 125I-markierten CM mit Zugabe von 2,5µg/ml ApoE in mit β-Gal transfizierten HuH7-Zellen wurde gleich 1 gesetzt, und der prozentuale Anstieg der Aufnahme in pHybVLDL-R (n=3) und RSVLDL-R (n=3) transfizierten HuH7-Zellen berechnet. Der absolute Wert für β-Gal betrug 6309 cpm/mg.

Im Vergleich mit den Werten der Bindung bei dem Experiment ohne Zugabe von ApoE stieg der Wert der Bindung von ^{125}I-markierten CM mit Zusatz von ApoE an HuH7-Zellen deutlich an. Nach der Inkubationszeit von 90 Minuten bei 37°C wurden die Zellen bei 4°C 20 Minuten mit Heparin gewaschen und der Wert von den Kontrollvektorzellen gleich 1 gesetzt. Die Werte von pHybVLDL-R und RSV-LDL-R transfizierten Zellen wurden über β-Gal induziert. Ein relativer Anstieg um das 1,9fache bei pHybVLDL-R (n=3) und um das 2,25fache bei RSV-LDL-R (n=3) Promotor transfizierten Zellen konnte beobachtet werden.

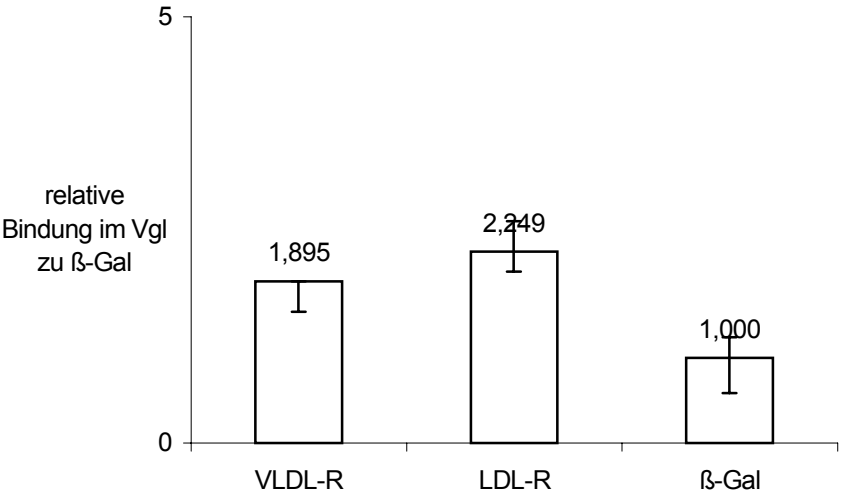


Abb. 13b: Bindung von ^{125}I-markierten CM unter Zugabe von 2,5µg/ml ApoE in mit pHybVLDL-R und RSV-LDL-R transfizierten HuH7-Zellen

Die Versuchsdurchführung wurde bereits oben beschrieben. Die Bindung von ^{125}I-markiertem CM mit Zugabe von 2,5µg/ml ApoE in mit β-Gal transfizierten HuH7-Zellen wurde gleich 1 gesetzt und der prozentuale Anstieg der Bindung in pHybVLDL-R (n=3) und RSVLDL-R (n=3) transfizierten Zellen berechnet. Der absolute Wert von β-Gal betrug 1042 cpm/mg.

Nachweis der Funktionalität der Vektoren in vivo

Die Herstellung der adenoviralen Vektoren für die in vivo-Experimente erfolgte in der Arbeitsgruppe Strauss an der „Humboldt Universität zu Berlin“.

Als Tiermodelle dienten die in der Einleitung beschriebenen LDL-R k/o-Mäuse und die WHHL-Kaninchen, die ebenso wie die LDL-R k/o-Mäuse keinen LDL-Rezeptor aufweisen und dementsprechend in der LDL-Rezeptor-Forschung die gängigen Tiermodelle darstellen.

Das LDL-R bzw. VLDL-R Transgen steht unter der Kontrolle verschiedener Promotoren, die als Kassetten in die adenoviralen Vektoren eingebracht werden. Die Injektion in die Schwanzvene wurden wie das gesamte tierexperimentelle Procedere in Berlin durchgeführt. Bevor die Infektion vorgenommen wurde, ist den Tieren ca. 200µl Blut entnommen worden. Nach Zentrifugation ist mit dem erhaltenen Serum weitergearbeitet worden. Dieses Serum wurde über eine

FPLC-Säule aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels eines kommerziellen enzymatischen Farbtests auf den Cholesterin- und Triglyzeridgehalt bestimmt. Somit entstanden zunächst die Profile für die Seren „vor Injektion". Am 6. Tag nach der Infektion wurde den LDL-R k/o-Mäusen erneut Blut entnommen, und nach Auftrennung über die FPLC-Säule wurde auch hier ein Cholesterin-und Triglycerid-Profil erstellt.

In Abbildung 14a-d ist exemplarisch das Cholesterin-und Triglyzerid-Profil von zwei LDL-R k/o-Mäusen dargestellt, die mit adenoviralem Vektor infiziert worden sind. Das Cholesterin-Profil zeigt drei Peaks, wobei der erste Peak (Fraktion 16-17) die VLDL, der zweite Peak (Fraktion 23-26) die LDL und der dritte Peak (Fraktion 30-31) die HDL darstellt. Da Triglyzeride im wesentlichen ein Bestandteil der Chylomikronen und der VLDL-Lipoproteine sind, zeigt sich im Triglyzerid-Profil ein Peak bei Fraktion 16-17 (VLDL). Ein weiterer Peak in der Fraktion 24-26 gibt den geringen Anteil von Triglyzeriden in den LDL-Lipoproteinen wieder.

In beiden Profilen zeigt sich keine Verschiebung der Fraktionen der zwei aufgetrennten LDL-R k/o-Maus-Seren, so daß die Profile der Kontrollvektoren als Vergleichswerte angesehen werden können.

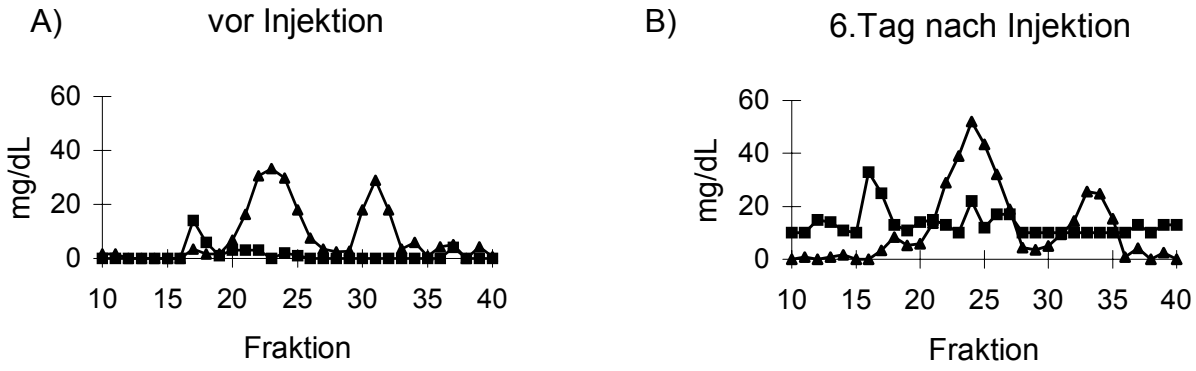


Abb. 14a-b: Exemplarische Darstellung der Cholesterin(▲—▲)- und Triglyzerid(■—■)-Profile ([mg/dl]) einer LDL-R k/o-Maus vor und nach Infektion mit einem adenoviralem Vektor (ß-Gal).

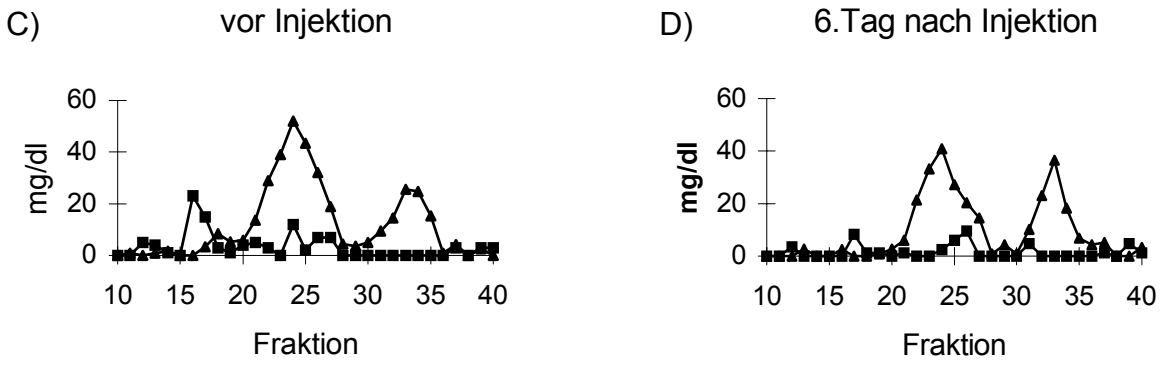


Abb. 14c-d: Exemplarische Darstellung der Cholesterin- und Triglyzerid-Profile ([mg/dl]) einer LDL-R k/o-Maus vor undnach Infektion mit einem adenoviralem Vektor (ß-Gal).

Die LDL-R k/o-Mäuse wurden mit einem β-Gal-Kontrollvektor infiziert. Die Cholesterin(▲—▲)- und Triglyzerid(■—■)-Profile wurden von den Seren der infizierten Mäuse erstellt. Die Abbildungen 14a und 14c geben das über eine FPLC-Säule aufgetrennte Serum vor der Infektion mit dem β-Gal Kontrollvektor an. Die Profile 14b und 14d zeigen die Cholesterin- und Triglyzeridwerte ([mg/dl]) in den fraktionierten Seren.
Im Cholesterin-Profil stellen sich die einzelnen Lipoprotein-Fraktionen als Peaks dar. In den Fraktion 16-17 finden sich die VLDL-Partikel, in den Fraktionen 23-26 die LDL- und in den Fraktionen 30-31 die HDL-Partikel. Auf Grund ihrer Verteilung im Lipoproteinmuster sind die Triglyzeride nur in der VLDL (Fraktion 16-17) und der LDL (Fraktion 24-26) deutlich nachweisbar und werden in der HDL nicht mehr sichtbar.

Nachdem sich die Profile der LDL-R k/o-Mäuse wie erwartet nicht verändert hatten, wurde weiteren LDL-R k/o-Mäusen ein adenoviraler RSV-LDL-R Vektor injeziert, um die Funktionalität dieser Konstrukte zu verifizieren. Auch in diesem Experiment wurde den Tieren vor der Infektion Blut entnommen und über die FPLC aufgetrennt (Abbildung 15a und 15c).

Die in den Abbildungen 15a und 15b gezeigte LDL-R k/o-Maus veränderte ihre Cholesterin- und Triglyzerid-Profile nach erfolgter Infektion nicht, so daß man davon ausgehen kann, daß die Infektion erfolglos war. Die Gründe hierfür könnten entweder sein, daß der Vektor nicht funktionsfähig war oder die Injekion des Vektors über die Schwanzvene nicht ordnungsgemäß durchgeführt wurde.

Die Injektion des RSVLDL-Rezeptor-Vektors der in Abbildung 15c bzw 15d dargestellten LDL-R k/o-Maus gelang. Das am 6.Tag nach Injektion entnommene Blut wurde mittels der FPLC aufgetrennt und analysiert. Die in den oben be-

schriebenen Fraktionen auftretenden Lipoproteine konnten in diesem Experiment nicht mehr nachgewiesen werden. Der RSVLDL-R-Vektor ist also über die Blutbahn in die Leber gelangt und hat dort zu einer Infektion des Lebergewebes mit gleichzeitiger Überexpression des LDL-Rezeptors geführt (Abb. 15d).

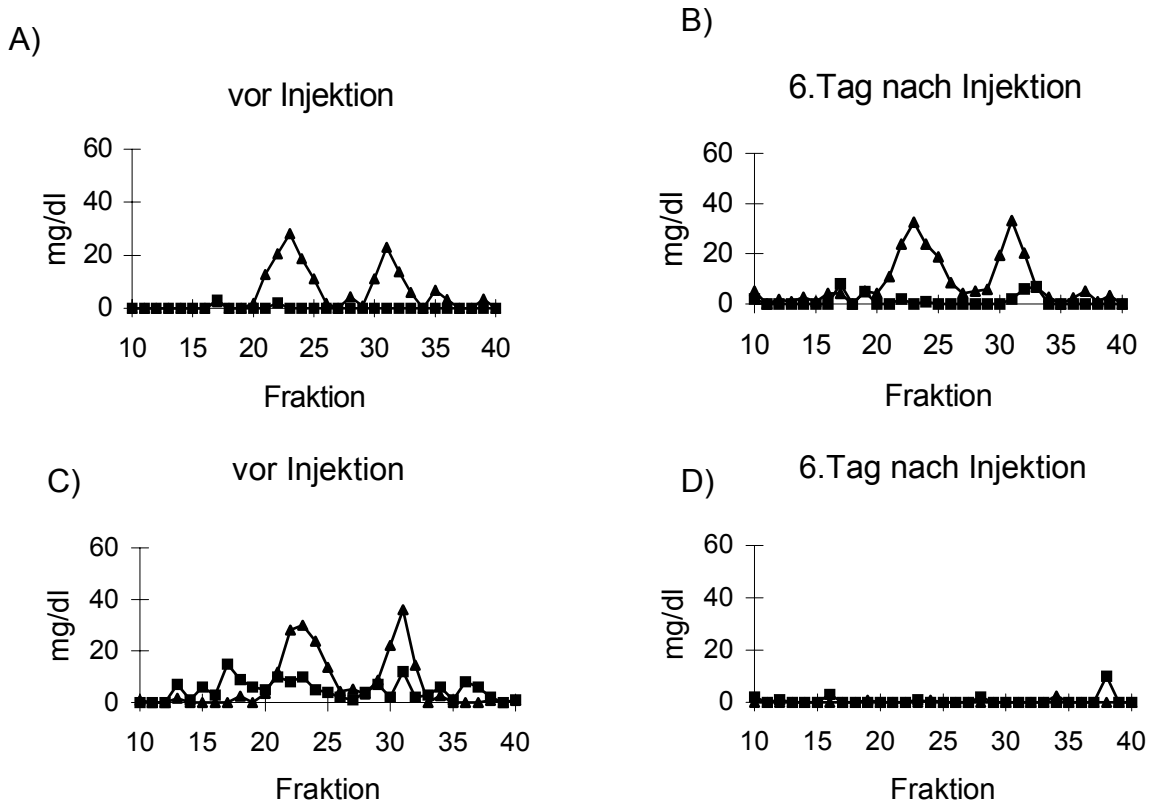


Abb. 15a-d: Exemplarische Darstellung der Cholesterin(▲—▲)- und Triglycerid(■—■)-Profile ([mg/dl]) zweier LDL-R k/o-Mäuse nach Infektion mit einem adenoviral assoziiertem RSVLDL-R-Konstrukt

Die LDL-R k/o-Mäuse wurden mit einem RSVLDL-R-Vektor infiziert. Die Abbildungen 15a und 15c geben das über eine FPLC-Säule aufgetrennte Serum vor der Infektion an. Die Cholesterin- und Triglyzerid-Profile ([mg/dl]) der Abbildungen der 15b und 15d stellen das Serum nach der Infektion dar.
Die Erläuterung der Peaks ist bereits in der Abbildung 14erfolgt.

Unter den in Experiment 14 und 15 beschriebenen Bedingungen wurde nun für die Infektion ein Autologer Promotor verwendet (AP 600). Das LDL-R Transgen steht unter der Kontrolle des Autologen Promotors, was zur Folge hat, daß dieses Konstrukt sterolreguliert wird, so daß er sich den Bedürfnissen des Organismus anpassend, die Expression des LDL-Rezeptors reguliert. Bei den beiden in Abbildung 16 exemplarisch gezeigten LDL-R k/o-Mäusen konnte die

Funktionsfähigkeit des AP600 nur schwach nachgewiesen werden. Es gelang mittels FPLC nur die geringgradige Erniedrigung des Cholesterin- und Triglyzerid-Wertes zu zeigen (deutlicher wird dieses in Abbildung 16d im Verleich zu 16c).

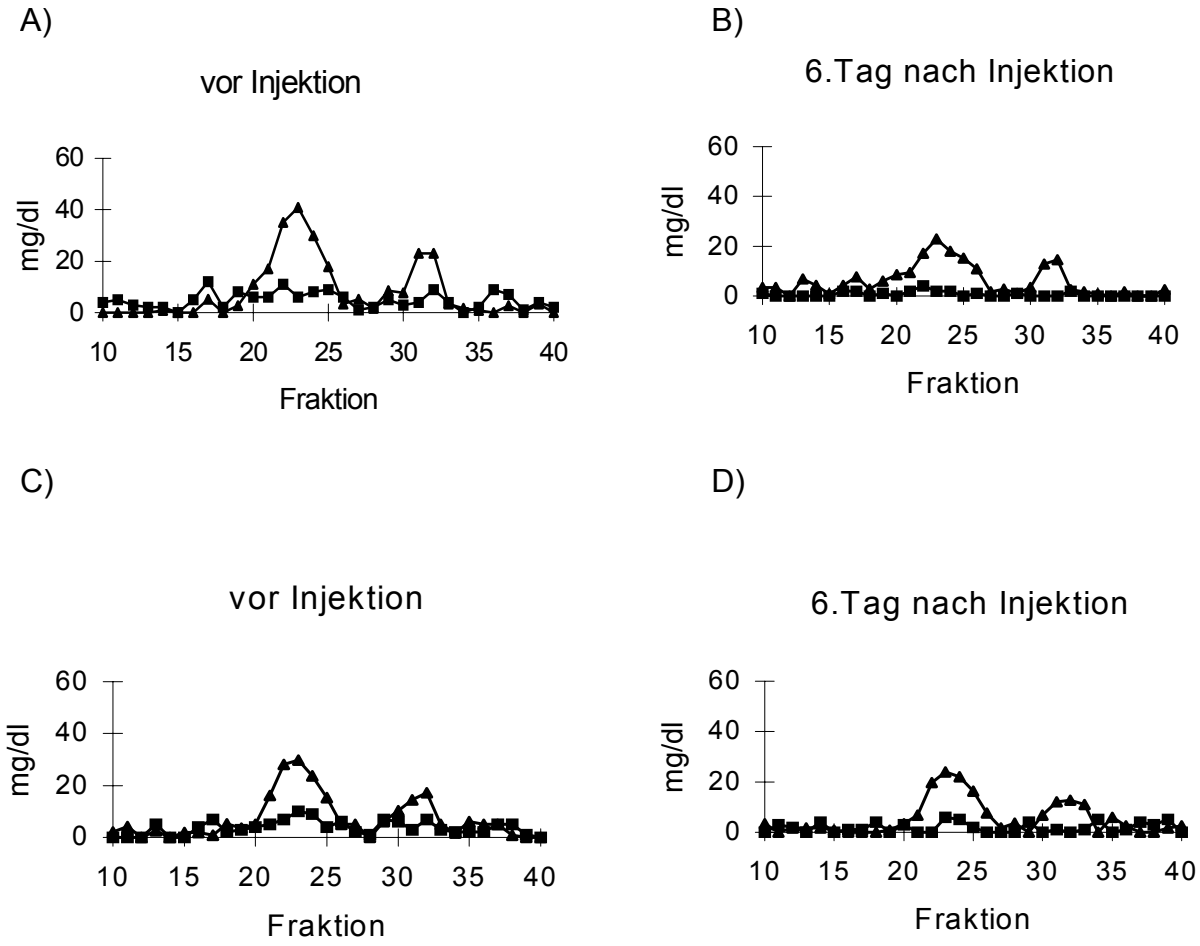


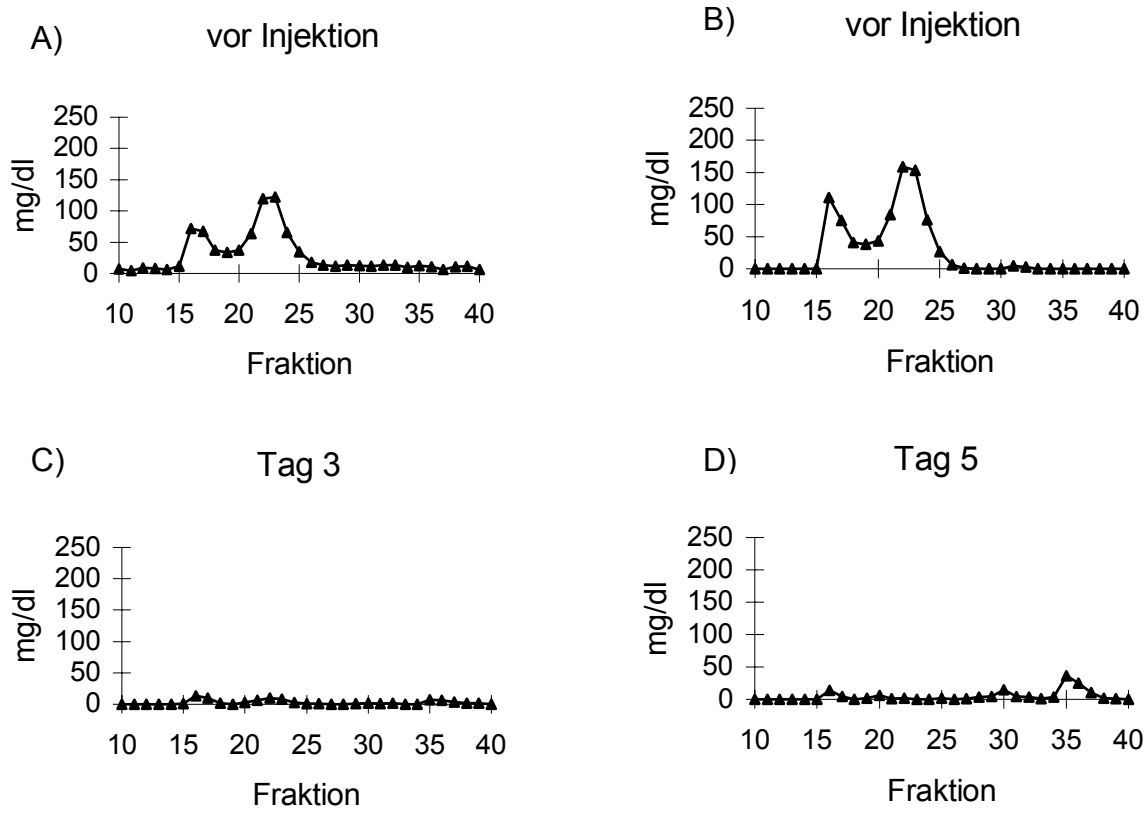
Abb. 16a-d: Exemplarische Darstellung des Cholesterin(▲—▲)- und Triglyzerid(■—■)-Profils ([mg/dl]) zweier LDL-R k/o-Mäuse nach Infektion mit einem LDL-R Transgen unter der Kontrolle eines Autologen Promotors(AP600).

Die LDL-R k/o-Mäuse wurden mit einem LDL-R Transgen unter der Kontrolle eines Autologen Promotor (AP600) infiziert. Die Abbildungen 16a und 16c geben das fraktionierte Serum vor der Injektion an. Die Cholesterin- und Triglyzerid-Profile ([mg/dl]) der Abbildungen 16b und 16d geben die Serumprofile 6 Tage nach der Injektion an.
Die Erläuterung der Peaks ist bereits in Abbildung 14 erfolgt.

Nachdem die Experimente an LDL-R k/o-Mäusen gezeigt haben, daß der RSV-LDL-R Vektor sowohl qualitativ als auch quantitativ funktionsfähig ist, wurden

die Versuche auf WHHL-Kaninchen ausgeweitet. Watanabe-Kaninchen besitzen ebenso wie die LDL-R k/o-Mäuse keinen funktionellen LDL-Rezeptor. Der Zweck der Versuchsreihe war nun nicht mehr der quantitative Nachweis, sondern es galt, die Qualität des RSV-LDL-R Vektors, bezogen auf den zeitlichen Verlauf, zu beurteilen.

Die systemische Infektion erfolgte mit $1x10^{12}$ infektiösen Partikeln pro Kilogramm Körpergewicht. Der Beobachtungszeitraum betrug 21 Tage, wobei dem Watanabe-Kaninchen vor der Injektion 2 mal Blut entnommen wurde, sogenannte prae injektionem-Werte. Das entnommene Blut wurde zentrifugiert und über die FPLC-Säule aufgetrennt. Es fiel auf, daß das Cholesterin-Profil bereits nach 3 Tagen nahe Null war und erst zwischen dem 12 und 14 Tag eine Erhöhung wieder sichtbar wurde. Im weiteren Verlauf kam es zu einem übermäßigen Anstieg vor allem in der VLDL-Fraktion (Fraktion 16-17), deren Wert noch über dem des Ausgangswertes lag (Abbildung 17a und b, vor Injektion). Auch ein Anstieg der LDL-Fraktionen konnte beobachtet werden, jedoch fiel dieser weitaus weniger stark auf als die VLDL-Erhöhung.



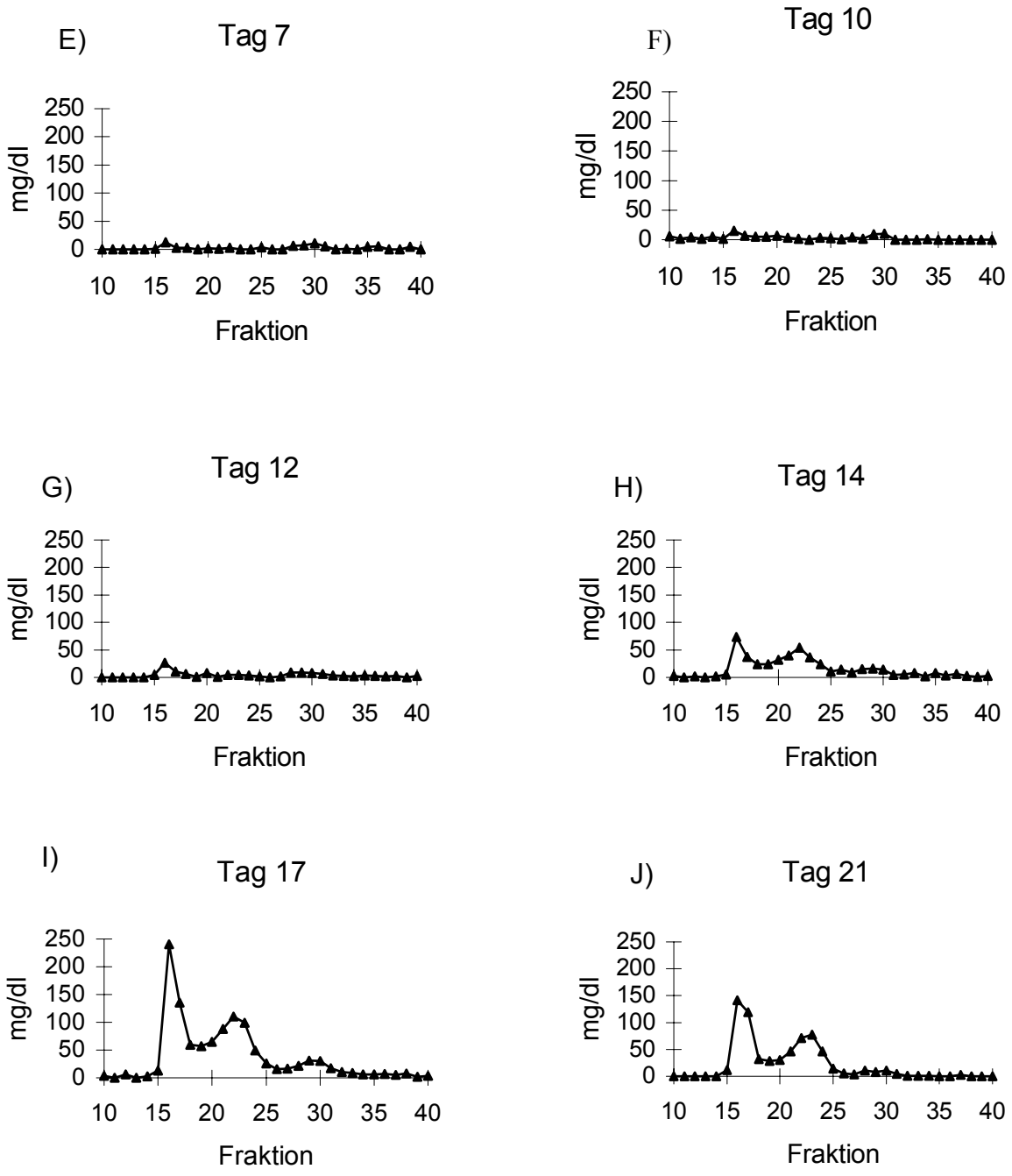
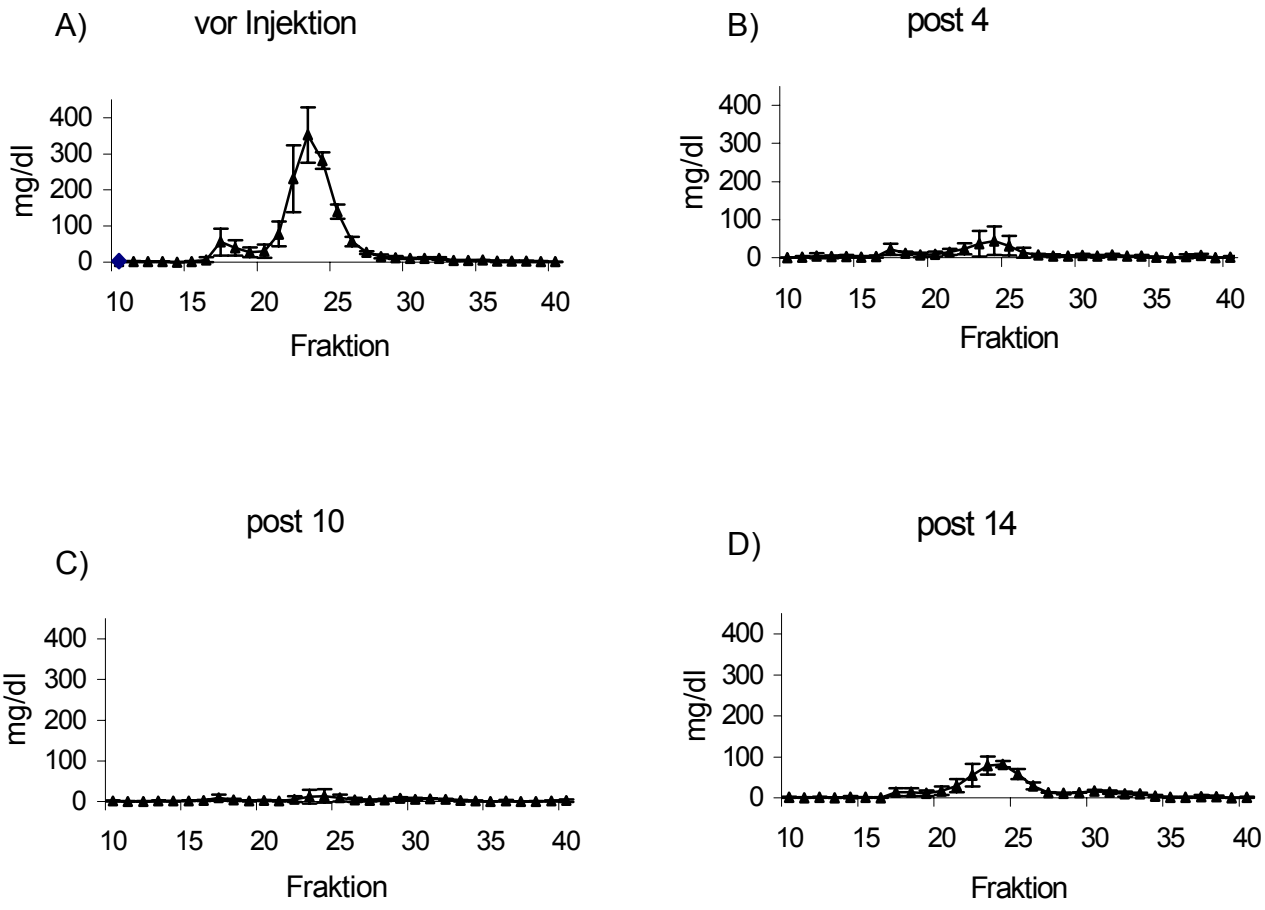


Abb. 17 a-j: Quantitave Veränderung des Cholesterinwertes ([mg/dl]) nach Injektion eines LDL-R überexpremierenden Konstruktes(RSV-LDL-R-Vektor) einem exemplarischen Versuch an einem WHHL-Kaninchen

Die WHHL-Kaninchen wurden mit $1x10^{12}$ infektiösen Partikeln pro Kilogramm Körpergewicht infiziert. Das entnommene Serum wurde mittels einer FPLC-Säule aufggetrennt und die Frakti-

onen mit einem kommerziellen enzymatischen Farbtest auf deren Cholesteringehaltes untersucht. Die Werte des Cholesterin-Spiegels sind in [mg/dl] angegeben.
Die VLDL findet sich bei Fraktion 16-17, die LDL bei Fraktion 22-26 und die HDL bei Fraktion 30-31.

In dem exemplarischen Versuch mit dem WHHL-Kaninchen fiel auf, daß vor allem die VLDL-Fraktion nach dem Nachlassen der Wirkung des RSV-LDL-Rezeptor- Konstruktes ansteigt. Zur weiteren Analyse wurden nun drei weitere WHHL-Kaninchen mit einem RSVLDL-R Promotor infiziert.
Wie auch im vorherigen Experiment fiel auch diesmal der Cholesterin-Wert ab. Auffällig war jedoch, daß dieser am 4.Tag zwar eine Annäherung an die Nullinie zeigte, es aber noch Peaks der VLDL und LDL gab. Am 10.Tag post injektionem konnten dann auch hier keine Peaks mehr nachgewiesen werden. Beginnend mit Tag 14 stieg der Cholesterin-Spiegel wieder an. Auch in diesem Experiment zeigte sich, daß besonders die VLDL anstieg. Sie überschritt auch hier ihren Ausgangswert deutlich (Vergleich 18 a zu 18 f).



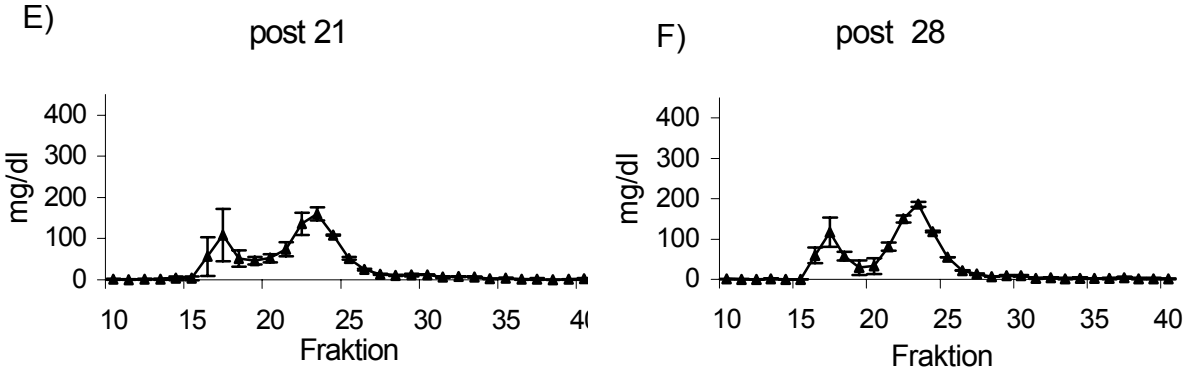
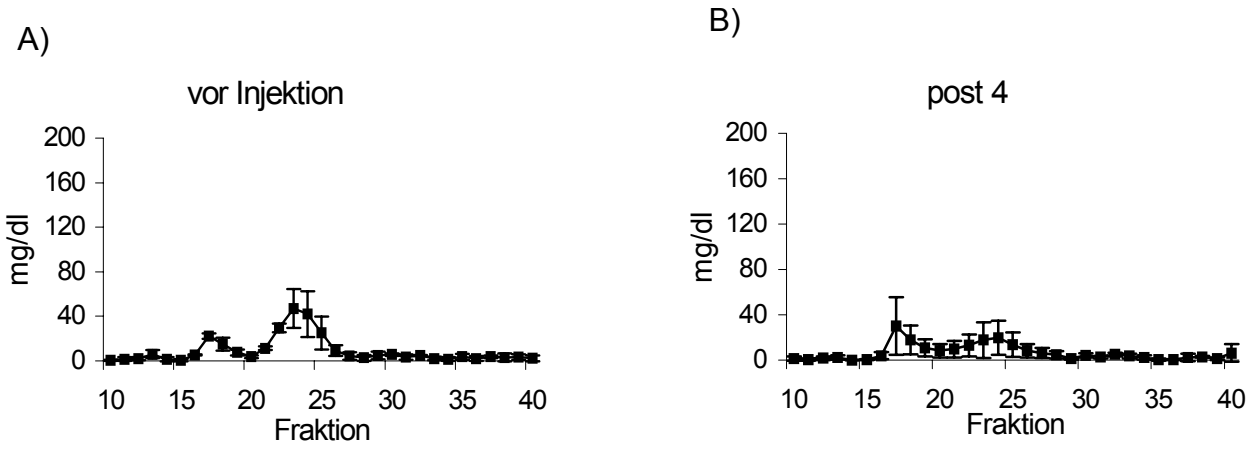


Abb. 18a-f: Cholesterin-Analyse der mit dem RSVLDL-R Vektor infizierten WHHL-Kaninchen (n=3)

Auftrennung des Serums mit RSVLDL-R Vektoren infizierter WHHL-Kaninchen (n=3) mittels der FPLC-Säule. Die Kaninchen wurden mit $1x10^{12}$ infektiösen Partikeln pro Kilogramm Körpergewicht infiziert. Mittels des enzymatschen Farbtests erfolgte die quantitative Bestimmung des Cholesteringehaltes der Fraktionen. Die Werte sind in [mg/dl] angegeben.

Im Gegensatz zum vorherigen Experiment wurde diesmal auch der Triglyzerid-Spiegel untersucht. Die Triglyzerid-Werte geben das unter Abbildung 18 dargestellte Ergebnis wieder. Die Werte erreichen ihren Tiefstwert am 10.Tag und steigen von nun an stetig. Ab dem 21.Tag ist vor allem die Zunahme der VLDL auffällig. Sie zeigt einen höheren Wert auf als vor Beginn des Versuches (Vergleich 19a und 19f).



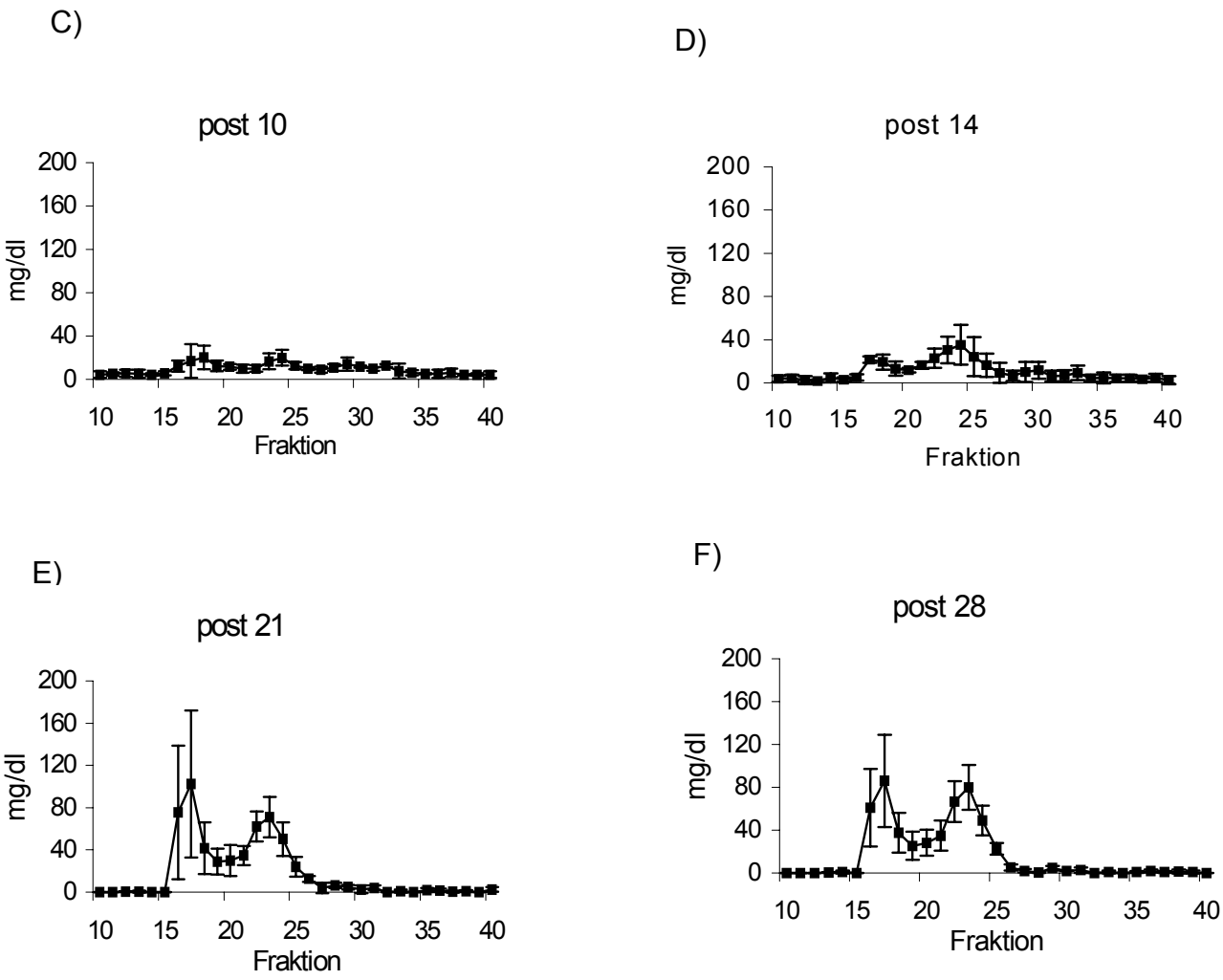


Abb. 19a-f: Triglyzerid-Analyse der mit dem RSVLDL-R Vekt or infizierter WHHL-Kaninchen (n=3)

Auftrennung des Serums mit RSVLDL-R Vektoren infizierter WHHL-Kaninchen (n=3) mittels der FPLC-Säule. Die Kaninchen wurden mit $1x10^{12}$ infektiösen Partikeln pro Kilogramm Körpergewicht infiziert. Mittels des enzymatschen Farbtests erfolgte die quantitative Bestimmung des Cholesteringehaltes der Fraktionen. Die Werte sind in [mg/dl] angegeben.

Diskussion

In dieser Doktorarbeit wurden Vektoren zur Behandlung der Familiären Hypercholesterinämie (FH) in der Gentherapie funktional untersucht. Die Arbeit ist ein Teil eines Gesamtprojektes einer präklinischen Studie zur gentherapeutischen Behandlung der FH. Als Transgene wurden Konstrukte von Kaninchen und Maus LDL-R-cDNA verwendet. Es wurden zunächst zellbiologische Experimente durchgeführt, um die Konstrukte funktional und qualitativ zu überprüfen.

Die FH ist eine monogenetisch vererbte Fettstoffwechselstörung mit einem funktionellem und/oder strukturellem Defekt des LDL-Rezeptors. Individuen, die an der FH erkranken, sind nicht in der Lage, vermehrt anfallendes LDL aus dem Blut zu entfernen. Die gentherapeutische Behandlung durch das Einbringen eines funktionalen LDL-Rezeptor-cDNA mittels eines adenoviralem Transfervektors in den betroffen Organismus bildet einen therapeutischen Ansatz.

Bevor zellbiologische Experimente durchgeführt werden konnten, ist zunächst die Transfektionseffizienz der LDL-R-Konstrukte nachgewiesen worden. Durch Immunfluoreszenz konnte der erfolgreiche Nachweis der Überexpression in HuH7-Zellen visualisiert werden (Abb. 8B und 8D). Im folgenden wurde die quantitative Überprüfung der Überexpression durchgeführt.

Vor den aufwendigen in vivo Versuchen an LDL-R k/o-Mäusen und WHHL-Kaninchen mußte die physiologische Funktionalität der überexpremierenden Rezeptoren in vitro nachgewiesen werden. Angewendet wurde hier ein Rezeptorfunktionsassay, mit dem über die Quantifizierung aufgenommenen ^{125}I-markierten LDL direkt die Rezeptoraffinität einer ganzen Zellpopulation erfaßt werden kann. Der quantitative Nachweis der überexpremierenden Rezeptoren fand wegen ihrer guten Tranfizierbarkeit und ihres hepatischen Ursprunges an HuH7-Zellen statt. Die Zellen sind mit drei verschiedenen viralen Konstrukten mit verschiedenen Promotoren (pCMVhLDL-R, pRSV-LDL-R, pHybLDL-R) transfiziert worden, um die Effizienz der einzelnen Promotoren miteinander vergleichen zu können. Hierbei zeigte der pRSV-LDL-R mit einem relativen Anstieg der spezifischen Aufnahme radioaktiver LDL-Partikel pro Milligramm Zellprotein um den Faktor 3,5 im Vergleich zum Kontroll-Promotor (Abb.9) die höchste Effizienz der verwendeten Promotoren. Ebenfalls kommt es in den HuH7-Zellen, die mit pCMVhLDL-R- und pHybLDL-R-Promotoren transfiziert worden sind zu einem relativen Anstieg der spezifischen Aufnahme radioaktiver LDL-Partikel.

Dieser war weniger signifikant, zeigte aber insgesamt, daß die Transfektion mit LDL-R-cDNA enthaltenen viralen Vektoren in den HuH7-Zellen zur Bildung physiologischer funktionsfähiger LDL-R führt.

Der LDL-R-Gentransfer korrigiert jedoch nur vorübergehend eine Dyslipidämie (Kozarsky et al., 1996). Es kommt mit dem Einbringen des adenoviralen Transfervektors zu einer mit ihm verbundenen humoralen und zellulären Immunantwort. Beim Einbringen des Transfervektors stellt sowohl der adenovirale Transfervektor als auch der der LDL-R k/o-Maus nicht bekannte LDL-R ein Antigen dar, auf die das spezifische Abwehrsystem mit der Produktion von Antikörpern reagiert. Bei einem wiederholten Kontakt mit dem adenoviralen Transfervektor kommt es zu einer prompten Sekundärantwort. Die Folge ist, daß der Transfervektor mit dem gentherapeutischem Konstrukt nicht mehr seine Zielzelle erreicht und somit wirkungslos bleibt. Die Immunantwort begrenzt somit die Dauer der Transgenexpression.

Der nächste Schritt in dieser Arbeit ist die Testung und der Einsatz von VLDL-R Konstrukten. Die physiologische Rolle des VLDL-R im normalen Lipoproteinmetabolismus ist noch nicht hinreichend geklärt. Frykman et al. ,1995, zeigten, daß Mäuse mit einem Defekt des VLDL-R-Gens einen normalen Serumlipidspiegel aufweisen. Der VLDL-R wird überwiegend nicht in der Leber, dem Hauptsyntheseort der LDL-R, sondern in peripheren Geweben expremiert (Herz, Skelettmuskel, Fettgewebe, Niere und Gehirn). LDL-R k/o-Mäusen, die 0,2% cholesterin-haltiger Diät gefüttert wurden, zeigten eine signifikante Hypercholesterinämie mit ausgeprägten IDL- und LDL-Peaks in der Serumanalyse. Kobayashi et al., 1995, überexpremierten in der Leber dieser Mäuse adenoviralvermittelt den VLDL-R. Ihre Beobachtungen waren eine erhöhte hepatische Expression von VLDL-R und eine Umkehr der Hypercholesterinämie in den LDL-R k/o-Mäusen. Diese Überexpression scheint also zu einer großen Steigerung der Fähigkeit dieser Tiere zu führen, IDL zu klären und damit den Vorläufer der LDL aus der Blutbahn zu eliminieren. Weiterhin führt der Gentransfer von VLDL-R, die der Maus bekannt sind, zu einer Umgehung der Immunantwort (Kozarsky et al., 1996).

Durch Immunfluoreszenz konnte in dieser Arbeit die erfolgreiche qualitative Überexpression des VLDL-R in HuH7-Zellen gezeigt werden (Abb. 8A und 8C).

Die Rezeptoraktivität der überexpremierenden Rezeptoren wurde vergleichend für VLDL-R und LDL-R durchgeführt. HuH7-Zellen wurden mit dem effizienten pRSV-LDL-R- und einem leberspezifischen pHybVLDL-R-Konstrukt transfiziert und mit ^{125}I-LDL inkubiert. Wie in der Literatur beschrieben, ist auf der Lipoproteinoberfläche des LDL kein ApoE vorhanden. Der VLDL-R erkennt jedoch das ApoE als seinen Liganden (Beisiegel, 1995). Um eine Kreuzreaktivität auszuschließen wurden sowohl HuH7-Zellen mit einem pRSV-LDL-R-Promotor als auch mit einem pHybVLDL-R-Promotor transfiziert und mit ^{125}I-LDL inkubiert. Auf Grund der unterschiedlichen Erkennung der Rezeptoren auf ihre Liganden konnte festgestellt werden, daß keine Kreuzreaktivität des VLDL-R gegenüber dem LDL vorliegt. Das zeigt sich in einer zum Kontrollvektor identischen spezifischen Aufnahme und Bindung. Im Vergleich steigt die Aufnahme von ^{125}I-LDL in pRSV-LDL-R transfizierten HuH7-Zellen um den Faktor 6,7 (Abb 10a und 10b).
Um die Funktionalität des transfizierten pHybVLDL-R-Promotors überprüfen zu können, wurde an Stelle des im vorherigen Versuchs verwendeten ^{125}I-LDL das ^{125}I-markierte Rezeptor-assoziierte-Protein (Rap) verwendet. Dieses hat eine hohe Spezifität zur Bindung an den VLDL-R. Die spezifische Aufnahme stieg um den Faktor 1,9 und die unspezifische Bindung um den Faktor 3,1 im Vergleich zum Kontrollvektor (ß-Gal) (Abb.11a und 11b). Somit konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem verwendeten Promotor um einen funktionsfähigen Vektor, der bei in vitro Versuchen zu einer Reduktion freien VLDL führen wird. Die diskreten Anstiege der pRSV-LDL-R transfizierten HuH7-Zellen sowohl bei der Aufnahme als auch bei der Bindung von ^{125}I-markierten Rap ist auf eine schwache Erkennung des Rap durch den LDL-R zurückzuführen.
Durch die Überlegung, daß LDL-R defiziente Individuen mit einer Immunreaktion auf den Transfer dieser Proteine antworten, muß versucht werden, die Entstehung von LDL zu unterbinden. Hierfür wurden zunächst Aufnahme- und Bindungsexperimente mit triglyzeridreichen Lipoproteinen, den Chylomikronen (CM), durchgeführt. Als Ligand fungiert das auf der Oberfläche der CM befindliche ApoE, daß über die VLDL-R und LDL-R erkannt und aufgenommen werden kann. Durch die Aufnahme der triglyzeridreichen Lipoproteine entstehen dann kein endogenes LDL.
Die Aufnahme- und Bindungsversuche in HuH7-Zellen mit den vorher auf ihre Funktionalität getesteten pRSVLDL-R- und pHybVLDL-R-Konstrukte zeigten

jedoch keine Veränderungen (Abb. 12a und 12b). Dieses beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, daß die Bindungskapazität der transfizierten Zellen zu gering ist oder die Expression der Rezeptoren nicht in dem gewünschten Umfang stattgefunden hat.
Um den Bindungs- und Aufnahmegrad in den den Zellen zu verstärken, sind den ^{125}I-markierten CM mit ApoE angereichert worden (Abb. 13a und 13b). Der Zusatz des ApoE führte über den VLDL-R zu einem 1,5 fachen und über den LDL-R zu einem 2,3 fachen Anstieg der spezifischen Aufnahme. Auch war bei der unspezifischen Bindung bei beiden Rezeptoren ein Anstieg zu verzeichnen (VLDL-R: Faktor 1,9; LDL-R: Faktor 2,2). Die Unterschiede lassen sich durch die differente Effizienz der Transfektion am besten erklären. So ist auch schon in den vorherigen Experimenten zu beobachten, daß der pRSV-LDL-R wesentlich effizientere Transfektionsergebnisse liefert als der pHybVLDL-R. Unterschiedliche Affinitäten der beiden Kaninchen-Rezeptoren zu den humanen Lipoproteinen können allenfalls ein Grund sein, warum der LDL-R eine bessere Bindung aufweist.

Nachdem die in vivo-Experimente an HuH7-Zellen die Funktionalität der tranfizierten LDL-R und VLDL-R aufgezeigt haben, sind die überexpremierten Rezeptorproteine nun mittels SDS-Page und Western-blot nachgewiesen worden. Zunächst wurden mit Hilfe der Firma Abimed Antikörper gegen humane und Kaninchen LDL-R hergestellt. Die Prüfung der Funktionalität erfolgte an gesundem, präpariertem Lebergewebe. Der aufgereinigte Antikörper 5193 erkennt spezifisch den LDL-R in allen untersuchten Geweben (Mensch, Maus, Kaninchen, Ratte). Der aufgereinigte Antikörper 5194 ist monoklonal gegen Kaninchen LDL-R wirksam (Abb. 6a und 6b). Es gelang somit die Entwicklung funktionfähiger LDL-R Antikörper. Mit dem Wissen um den eingestzten Antikörper und das dem Rezeptor eigene Migrationverhalten bei gelelektrophoretischen Analysen (LDL-R-Bande erscheint auf der Höhe von 160 kD) kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei den detektierten Banden um das LDL-R-Protein handelt.
HuH7-Zellen sind mit den oben beschriebenen pHybVLDL-R-, AlbLDL-R-, pRSVLDL-R- und einem Kontrollvektor transfiziert worden. Die Detektion mit den Antikörpern ergab eine Bande für die zu untersuchenden Konstrukte beim

pHybVLDL-R-, pRSVLDL-R- und dem Kontrollvektor. Der Nachweis des AlbLDL-R-Konstruktes gelang nicht. Es ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht klar, ob es an der mangelnden Transfektionseffizienz lag oder der Fehler bei der Entwicklung des Vektors aufgetreten ist. Für die anderen drei Konstrukte zeigte sich, daß sie in vitro funktional sind und ihre Aufgabe, die Aufnahme von Lipoproteinen erfüllen. Vielleicht fehlen der eingestzten Zellinie jedoch auch wichtige Faktoren, um diesen speziellen Promotor zu aktivieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit ist die Funktionalität von LDL-R Gentransfer in LDL-R-defizienten Tiermodellen untersucht worden. Alle Experimente mit adenoviralen Vektoren in vivo sind an der „Humboldt Universität zu Berlin“ durchgeführt worden. Zunächst wurden die Studien an LDL-R k/o-Mäusen durchgeführt, einem der gängigen Tiermodelle in der Gentherapie der FH. Die Tier-Experimente wurden ohne cholesterin-reiche Diät-Fütterung durchgeführt und es wurden ihnen vor und 6 Tage nach der Injektion Blut entnommen. Dieses ist über eine FPLC-Säule aufgetrennt worden.
Die Abbildungen 14 a-d zeigen die exemplarische Darstellung der Cholesterin- und Trigyzerid-Profile zweier LDL-R k/o-Mäuse nach der Infektion mit einem adenoviralem Kontrollvektor (Transgen: ß-Galaktosidase). Es ergaben sich für charakteristische Profile mit drei Peaks, die die drei Klassen der Lipoproteine (VLDL, LDL und HDL) wiedergeben. Die Analyse des Serums nach der Infektion ergab keine Veränderungen im Profil, so daß die Tiere mit der injezierten ß-Galaktosidase eine Kontrolle darstellen.
Zwei weiteren LDL-R k/o-Mäusen wurde ein humanes LDL-R-Transgen unter der Kontrolle eines RSV-Promotors injeziert. Die Ergebnisse zeigen in der ersten Maus keine signifikanten Veränderungen des Serum-Lipoproteinprofils (Abb 15a und 15b). Daraus läßt sich vermuten, daß in diesem Fall die Injektion nicht ordnungsgemäß durchgeführt wurde.
Anders verhält es sich bei der zweiten Maus: hier läßt sich ein signifikanter Abfall der Lipoproteinkonzentration im Serum erkennen. Am 6.Tag nach der Injektion ist sowohl im Cholesterin- als im Triglyzerid-Profil eine deutliche Senkung der Komponenten sichtbar (Abb 15c und 15d). Das Erzielen eines physiologischen Effektes nach dem Gentransfer, in diesem Fall also die deutliche Senkung des Plasmacholesterinspiegels nach dem LDL-R-Transfer, erlaubt keine

Information über die Verteilung der Stoffwechselbelastung innerhalb der Gesamtpopulation aller Hepatozyten. Der Transfer einer LDL-R Expressionskassette unter Kontrolle eines starken viralen Promotors wie dem RSV führt, wie die Versuche belegt haben, zu einer starken Überexpression von Rezeptorproteinen. Die Folge ist, daß die LDL-R überexpremierenden Zellen ein unphysiologisch große Menge LDL aufnehmen und metabolisch umsetzen müssen. Der Nachteil, der sich mit dem adenoviralem Transfervektor ergibt, ist des Fehlen einer Regulation der Rezeptorsynthese und somit zu einer vermehrten Expresson des LDL-R. Die gesteigerte Aufnahme führt zu einer intrazellulären Akkumulation von LDL und/oder LDL abgeleiteten Komponenten, die nicht suffizient metabolisiert werden können (Heeren et al., 1999). Es kommt zu einer Anhäufung von freiem Cholesterol und Cholesterin-Estern, die als Cholesterin-Kristalle in der Zelle ausfällen und letztendlich zum Tod der Zelle führen. Diese Kristalle sind nicht mehr für enzymatische Prozesse zugänglich. Außerdem scheint die vermehrte LDL Aufnahme, die Verarbeitung über den spezifischen Weg zu erschöpfen. Hinzu kommt die eigentliche Zytotoxizität, die die Kristalle hervorrufen (Brown and Goldstein, 1997). So wurden sie in sogenannten Schaumzellen gefunden, die in atheriosklerotisch veränderten Gefäßendothelien auftreten (Tangirala et al., 1994). Wie in der Literatur beschrieben zeigen Zellen, die mit einem irrelevanten Kontrollgen infiziert wurden, keine Kristallbildung (Heeren et al., 1999).

Bei dem pRSV enthaltenem Promotor ist die Regulation des Transgens vernachlässigt worden. Daher wurde in Zusammenarbeit mit der Humboldt Universität zu Berlin ein adenoviraler Vektor unter der Kontrolle eines autologen Promotors konstruiert. Hierbei wird ein Fragment aus dem humanen LDL-R-Bereich ca. 600 Basenpaare vor das ATG-Startcodon der cDNA gesetzt. Er beinhaltet alle Cholesterin-regulierenden Sequenzen und reguliert den intrazellulären Bedarf Cholesterin-abhängig. Somit wird erwartet, daß bei hoher intrazellulärer Cholesterin-Konzentration die Aktivität des autologen Promotors gering ist und es dadurch nicht zu einer Überladung der Zelle mit Cholesterin kommt und damit eine Kristallbildung verhindert wird. Die physiologische Antwort der Zelle wäre eine Reduktion der LDL-R-Entstehung und der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, die über das „sterol-regulated-element“ (SRE) im Promotor der Gene reguliert wird.

Die im Rahmen der Arbeit vorgenommenen Versuche mit dem autologen Promotor (AP600) zeigten alllerdings nicht den gewünschten Erfolg. Bei den zwei abgebildeten FPLC-Analysen (Abb 16a bis 16d) war in beiden Profilen, kein signifikanter Rückgang der Cholesterin- und Triglyzerid-Werte zu verzeichnen. Die Funktionsfähigkeit des autologen Promotors konnte somit nicht nachgewiesen werden. Es stellt sich auch hier die Frage, ob die Injektion ordnungsgemäß durchgeführt wurde, da mittlerweile geklärt worden ist, daß dieses Konstrukt sterolabhängig den LDL-R expremiert.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß sich im Plasma der LDL-R k/o-Mäuse eine deutliche Senkung der Cholesterin- und Triglyzerid-Werte am 6.Tag nach ihrer Infektion mit dem adenoviralen Vektoren mit dem LDL-R als Transgen unter der Kontrolle des pRSV darstellt, wurden die Versuche ausgedehnt. Der Gentransfer erfolgte auf LDL-R-defiziente Kaninchen (WHHL). Der Vorteil liegt in der längeren Lebensdauer und dem damit verbundenen größerem Beobachtungszeitraum dieser Tiere. Ebenso haben Kaninchen ein dem Menschen ähnliches Lipoproteinprofil und sind somit ein besseres Tiermodell für die FH. Zunächst wurde das Transgen auf ein Tier übertragen (Abb 17a-j). Die Plasmen dieses Tieres wurde mittels FPLC analysiert. Die massiv erhöhte LDL-Fraktion (158 mg/dl) war bereits am 3.Tag nach der Injektion signifikant abgefallen (7 mg/dl). Zwischen dem 12. und 14.Tag kommt es zu einem Anstieg der VLDL-Fraktion, die am 17.Tag ihr Maximum erreicht (240 mg/dl). Auch in der LDL-Fraktion kommt es zu einem deutlichen Anstieg am 17.Tag nach der Infektion (110 mg/dl). Die deutliche Erhöhung der VLDL-Fraktion gegenüber dem Ausgangswert ist ein überraschender Befund. Physiologisch wird das aufgenommene LDL intrazellulär zu Cholesterin abgebaut und über die Galle ausgeschieden. Es muß nun geklärt werden, ob die Leber durch die gesteigerte VLDL-Synthese versucht, das überschüssige Cholesterin abzugeben. Dieses wurde in weiteren Experimenten bestätigt.
Es wurden dazu drei WHHL-Kaninchen untersucht, denen ebenfalls ein adenoviraler Vektor mit dem LDL-R als Transgen unter der Kontrolle eines pRSV-Promotors injeziert worden ist. Die massiv erhöhte LDL-Fraktion ist 4-10 Tage nach dem Transfer des LDL-Rezeptors fast vollständig verschwunden (von ca. 350 mg/dl auf 13 mg/dl). Nach 28 Tagen war die LDL erst auf 186 mg/dl ange-

stiegen. Zu diesem Zeitpunkt war auch in diesem Experiment eine deutliche Erhöhung der VLDL gegenüber ihrem Ausgangswert zu beobachten (vor der Injektion: 22 mg/dl; Tag 28 nach der Injektion: 86 mg/dl). Diese Veränderungen sind sowohl auf der Cholesterin- als auch auf dem Triglyzerid-Profil erkennbar. Es ist somit zu klären, ob die erhöhte Expression des LDL-R in der Leber wirklich zu einer vermehrten Cholesterinabgabe in die Galle führt und letztendlich somit zu einer Reduktion der Artheriosklerose führt.

Der Effekt des adenoviralen LDL-R Gentransfers ist in seiner Dauer begrenzt. Nach 4 Wochen sind die Ausgangswerte noch nicht wieder erreicht, steigen jedoch wieder massiv an. Man kann somit von einer limitierten Wirkung des Transgenproduktes ausgehen. Eine erneute Injektion des Transgens wird eine Immunantwort hervorufen, da der LDL-R sowohl LDL-R k/o-Mäusen als auch den WHHL-Kaninchen unbekannt ist. Die weiteren Überlegungen gehen dahin den VLDL-Rezeptor als alternatives Transgen zu benutzen. Der VLDL-R, der in vivo in Muskel und Fettgewebe expremiert wird , ist in der Lage, VLDL als Vorstufe der LDL zu binden und die Aufnahme zu vemitteln. Es wurde bereits gezeigt, daß in vivo Transfer von VLDL-R in LDL-R k/o-Mäuse zu einem effektivem Rückgang der Hypercholesterinämie in diesen Tieren führt (Kobayashi et al., 1996; Kozarsky et al.,1996; Chan et al. 2000). Die Überlegenheit vom VLDL-R gegenüber dem LDL-R ist die Tatsache, daß der LDL-R als ein Neo-Antigen erkannt wird und es dadurch zu einer zellulären und humoralen Immunantwort kommt. Der VLDL-R hingegen induziert diese Immunantwort nicht (Kozarsky et al., 1996). Aus diesem Grund könnte der VLDL-R zu einer guten Alternative der Gentherapie bei der FH werden. Zu umgehen sind auch die Entzündungsreaktion der Leber und die Immunantwort gegen den Adenovirus selbst. Hier sind in den letzten Jahren Adenoviren neuerer Generation, bei denen die Viralen Codon-Regionen entfernt wurden und sogenannnte Rezeptor-Gene (α1-Antitrypsin) entwickelt worden. Diese zeigten bei der in vivo Anwendung in Mäusen (Schiedner et al., 1998; Morral et a., 1998) langanhaltene Transgenexpressionserfolge. Chan et al. fanden heraus, daß mit diesen Transfektionsvektoren eine Korrektur der Hypercholesterinämie für den Zeitraum eines Jahres und eine Prävention der aortalen Atheriosklerose möglich sei. Da auch bei dem Einsatz der neueren Adenoviren eine Neutralisation durch Anti-

körper gegeben ist, könnte dieses durch den Einsatz anderer adenoviraler Serotypen umgangen werden (Parks et al., 1999).

Ein weiterer Faktor, der bei der Gentherapie beachtet werden muß, ist das Spektrum der unerwünschten Wirkungen. Beim Menschen verursacht die Infektion mit einem Adenovirus unspezifische Erkrankungen der oberen Luftwege und des Gastrointestinaltraktes. Diese Symptome werden bei einem adenoviralen Gentransfer ebenfalls beobachtet. Weiterhin kommt es hierbei zu einer starken inflammatorischen Reaktion (Cichon et al., 1999). Die Virus-Gabe induziert ebenfalls eine starke, aber transiente Erythroblastose. Die dritte zu beobachtende Nebenwirkung ist eine normochrome Anämie mit einem Hämoglobinabfall unter 40%, der jedoch auch vollständig remissiert. Von der Höhe der viralen Dosis ist eine daraus abzuleitende Thrombozytopenie beobachtet worden. Es bestehen aber keine Unterschiede, ob es sich bei dem Transfer um eine lokale, über die Portalvene oder systemische Infektion handelt. Auch eine Infektion mit viralen Vektoren über die Portalvene schütz nicht vor der systemischen Ausbreitung und ihren Effekten (Torres et al., 1996). Um jedoch eine quantitativ wirksame zu erreichen, muß eine hohe Dosis an viralen Partikeln den Probanden injeziert werden. Daher sollte die klinische Anwendung nur unter dem strengen Monitoring hämatologischer und rheologischer Parameter erfolgen. Die Gefahren, die die Gentherapie auch für den Menschen darstellt, zeigten sich an dem Beispiel des 18 Jahre alten Jesse Gelsinger. Im Rahmen einer gentherapeutischen Behandlung eines Gendefektes (Defekt der Ornithintranscarbemylase) wurde ihm ein adenovirales Transfergen injeziert. Es kam zu schwerwiegenden Komplikationen, die über akutem Leberversagen, in einem Multiorganversagen und schließlich dem Tod des Patienten endeten.

In Betracht auf die FH müssen klinische Studien zeigen, in welchem Umfang die in WHHL-Kaninchen gewonnenen Daten auf den Menschen übertragen werden können. Zu vertreten wäre der Einsatz der Gentherapie vor allem bei homozygoten FH-Patienten mit schlechter Prognose, da in diesen Fällen neben der Lebertransplantation die Plasmaapharese die einzig bisher wirksame Methode zur Senkung der LDL-Konzentration ist. Im Vordergrund sollte auch die Verbesserung der Vektortypen stehen, um eine verantwortungsvolle Anwendung der Gentherapie zu gewährleisten. Hierzu müßte dann ein nicht-toxischer leberspezifischer Vektor gefunden werden.

Zusammenfassung

Die Familiäre Hypercholesterinämie ist als monogene Erkrankung ein sehr gutes Modell der Entwicklung leberspezifischer Gentherapie, für die von vielen Arbeitsgruppen adenovirale Vektorsysteme favorisiert werden. In meiner Arbeit wurde zunächst *in vitro* die Funktion des adenoviral unter verschiedenen Promotoren exprimierten LDLR bzw. des VLDLR analysiert sowie die Effekte des Gentransfers in Tiermodellen untersucht.

Bei bisherigen gentherapeutischen Ansätzen wurde die Regulation des Transgens weitestgehend vernachlässigt, was gerade bei der unphysiologischen Überexpression des LDL-Rezeptors zu einer negativen Selektion führen kann. Aus diesem Grunde wurde von Dr. Frank Schnieders (IMBM, Hamburg) ein adenoviraler Vektor konstruiert, der unter der Kontrolle des endogenen Promoters steht. In den von mir durchgeführten Experimenten wurde die Tauglichkeit dieses Vektors für den LDLR Gentransfer *in vitro* untersucht. Die Expression des LDLR wurde mit etablierten Adenoviren verglichen, die das Transgen durch den starken viralen RSV Promoter regulieren. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Zugabe von Sterolen ausschließlich die Expression des LDL-Rezeptors unter der Kontrolle des endogenen Promoters inhibiert und nicht die des RSV regulierten Transgens. Die Funktionalität wurde außerdem in Aufnahmeexperimenten mit radioaktiv und Fluoreszenz markierter LDL nachgewiesen. Der VLDLR, der normalerweise in Muskel und Fettgewebe exprimiert wird, ist in der Lage, VLDL als Vorstufe der LDL zu binden und die Aufnahme zu vermitteln. Dieser Ansatz ist geeignet, bei völlig fehlendem LDLR Protein oder großen Deletionen eine mögliche Immunreaktion gegen das Transgen *in vivo* zu vermeiden. Es wurde daher das Kaninchen VLDLR-Gen als Transgen in einen adenoviralen Vektor eingesetzt (von Dr. Günther Cichon, MDC Berlin) und Bindungs- und Aufnahmestudien im Vergleich zum LDLR an Zellen durchgeführt. Es konnte eine hohe Expression des VLDLR erreicht werden, ohne jedoch die LDL-Aufnahme zu erhöhen. Die Funktionalität des VLDLR wurde nachgewiesen, da RAP und Chylomikronen Remnants in infizierte Zellen vermehrt aufgenommen wurden.

In Tierexperimenten wurde die hepatische Expression und Funktionalität der adenoviralen Vektoren überprüft. Zu diesem Zweck wurden adenovirale

Vektoren mit dem LDLR als Transgen unter der Kontrolle des RSV und des endogenen Promotor in Mäuse verglichen. In diesen Tieren konnte die Rezeptorexpression mittels Westernblot in den Lebern nachgewiesen werden, wobei keine ausreichenden Mengen zu einer signifikanten Senkung der LDL exprimiert wurden. In WHHL-Kaninchen wurde ebenfalls die Funktionalität der adenoviralen Vektoren analysiert. Die massiv erhöhte LDL-Konzentration war 7-10 Tage nach dem Gentransfer des LDLR vollständig verschwunden, wobei 24 Tage nach Gentransfer die LDL-Konzentration wieder auf den Ausgangswert angestiegen war. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt eine 4-5fache Erhöhung der VLDL gegenüber dem Ausgangswert zu beobachten, was auf eine gesteigerte VLDL-Synthese hindeutete. Unabhängig von der Optimierung des Vektors ist die im Kaninchenmodell beobachtete erhöhte VLDL Synthese ein weiteres Problem, das geklärt werden muss, bevor an eine Gentherapie am Patienten gedacht werden kann. Ob der VLDLR mit seiner deutlich vom LDLR unterschiedlichen Ligandenspezifität ein gutes alternatives Transgen in der Gentherapie der Familiären Hypercholesterinämie sein wird, muss auch erst in weiteren tierexperimentellen Versuchen geklärt werden.

Literaturverzeichnis

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor (see comments). Science 271, 518-520.
- Aggerbeck, L.P., Wetterau, J.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., and Agard, D.A. (1988) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the amino-terminal (receptor-binding) domain of human apolipoprotein E3 from serum very low density lipoproteins. J.Mol.Biol. 202, 179-181.
- Anderson, R.G., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1976) Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 2434-2438.
- Aron, L., Jones, S., and Fielding C.J., (1978): Human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. Characterization of cofactor-dependent phospholipase activity. J.Biol.Chem., 253, 7220
- Aulinskas, T.H., van der Westhuyzen, D.R., Bierman, E.L., Gevers, W., and Coetzee, G.A. (1981) Retro-endocytosis of low density lipoprotein by cultured bovine aortic smooth muscle cells. Biochim.Biophys.Acta 664, 255-265.
- Beisiegel, U. (1992) Apolipoproteins as Ligands for Lipoprotein Receptors. In: *Structure and Funktion of Apolipoproteins*, 269-294. Edited by Rosseneu, M., Boca Raton, USA, CRC Press.
- Beisiegel, U. (1995) Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. Curr.Opin.Lipidol. 6, 117-122.
- Beisiegel, U. and Heeren, J. (1997) Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. Proc.Nutr.Soc. 56, 731-737.
- Beisiegel, U., (1995): Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoproteinmetabolism., Curr. Opin. In Lipidol., 6,117
- Beisiegel, U., Krapp, A., Weber, W., Mann, A., Gliemann, J., Nykjaer, A., Olivecrona, G., Hayden, M., (1995): Role of lipases and LDL receptor-related protein in human chylimicron remnant metabolism., Elsevier Sc., Atheriosklerosis X : 175
- Beisiegel, U., Weber, W., Heeren, J., and Hilpert, J. (1995) Intracellular Consequences of Chylomicron Uptake. Circulation 92, 691
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J., and Stanley, K.K. (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E- binding protein. Nature 341, 162-164.
- Beisiegel,U., Schneider, W.J., Brown, M.S, and Goldstein, J.L. (1982) Immunoblot analysis of low density lipoprotein receptors in fibroblasts from subjects with familial hypercholesterolemia. J.Biol.Chem. 257, 13150-13156.
- Belelcazar, M. and Chan, L., (1999): somatic gene therapy for dyslipidemias. J. Lab. Clin. Med. 134: 194-214
- Bradley, W.A. and Gianturco, S.H. (1986) ApoE is necessary and sufficient for the binding of large triglyceride-rich lipoproteins to the LDL receptor; apoB is unnecessary. J.Lipid Res. 27, 40-48.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1974) Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. Science 185, 61-63.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232, 34-47.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell 89, 331-340.
- Brown, M.S., Anderson, R.G., and Goldstein, J.L. (1983) Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. Cell 32, 663-667.
- Camato, R., Marcel, J., Milne, R.W., Lussier-Cacan, S., and Weech, P.K., (1989): Protein polymorphism of a human plasma apolipoprotein D antigenic epitope., J. Lipid Res., 30, 865
- Chen , W. J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalzation of the low density lipoprotein receptor. J.Biol.Chem. 265, 31116-31123. 1990.

- Chen, C.M., al-Haideri, M., Presley, J.F., and Maxfield, F.R. (1995) Apoprotein E on Model Triglyceride-rich Particles, in Comparison to Apoprotein B on LDL, Remains relatively Intact after Cell Uptake. Circulation 92, 691
- Cichon, G., Strauss, M., (1999): Intravenous administration of recombinant adenoviruses causes thrombocytopenia, anaemia and erythroblastosis in rabbits. J. Gene Med., 1: 360-371
- Cooper, A.D. (1998) Hepatic uptake of chylomicron remnants. J.Lipid Res. 38, 2173-2192.
- Debanne, M.T., Evans, W.H., Flint, N., and Regoeczi, E. (1982) Receptor-rich intracellular membrane vesicles transporting asialotransferrin and insulin in liver. Nature 298, 398-400.
- Dolphin, P.J. (1992) Lipolytic enzymes and the role of apolipoproteins in the regulation of their activity. In: *Structure and function of apolipoproteins*, 1 Ed., 296-362. Edited by Rosseneu, M., Boca Raton, CRC Press.
- Dunn, W.A. and Hubbard, A.L. (1984) Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics. J.Cell 98, 2148-2159.
- Felts, J.M., Itakura, H., and Crane, R.T. (1975) The mechanism of assimilation of constituents of chylomicrons, very low density lipoproteins and remnants - a new theory. Biochem.Biophys.Res.Commun. 66, 1467-1475.
- Feng, Y., Press, B., and Wandinger-Ness, A. (1995) Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. J.Cell Biol. 131, t-52
- Fernandez-Borja, M., Bellido, D., Vilella, E., Olivecrona, G., and Vilaro, S. (1996) Lipoprotein lipase-mediated uptake of lipoprotein in human fibroblasts: evidence for an LDL receptor-independent internalization pathway. J.Lipid Res. 37, 464-481.
- Fielding, C. J., Shore, V. G., and Fielding, P. E. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. Biochem.Biophys.Res.Commun. 46, 1943-1949. 1972.
- Fraser, R., Dobbs, B.R., and Rogers, G.W. (1995) Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. Hepatology 21, 863-874.
- Frykman, P.K., Brown, M.S., Yamamoto, T., Goldstein, J.L., and Herz, J. (1995) Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92, 8453-8457.
- Goldberg, I.J., Kandel, J.J., Blum, C.B., and Ginsberg, H.N. (1986) Association of plasma lipoproteins with postheparin lipase activities. J.Clin.Invest. 78, 1523-1528.
- Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1974) Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. J.Biol.Chem. 249, 5153-5162.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W., and Schneider, W.J. (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. Annu.Rev.Cell 1, 1-39.
- Goldstein, M, and Brown, S., (1986) Rezeptor mediated pathway for cholesterol homeostasis., Science, 232, 34
- Gotto, A.M.J., Pownall, H.J., and Havel, R.J. (1986) Introduction to the plasma lipoproteins. Method.Enzymol. 128, 3-41
- Gotto, A.M.J., Pownall, H.J., and Havel, R.J. (1986) Introduction to the plasma lipoproteins. Method.Enzymol. 128, 3-41.
- Griffin, B.A. and Packard, C.J. (1994) Metabolism of VLDL and LDL subclasses. Curr.Opin.Lipidol. 5, 200-206.
- Hamosh, M., Klaeveman, H.L., Wolf, R.O., and Scow, R.O. (1975) Pharyngeal lipase and digestion of dietary triglyceride in man. J.Clin.Invest. 55, 908-913.
- Havel, R.J. (1984) The formation of LDL: mechanisms and regulation. J.Lipid Res. 25, 1570-1576.
- Havel, R.J. and Hamilton, R.L. (1988) Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. Hepatology 8, 1689-1704.

- Havel, R.J., ,J.L., and Brown, M.S. (1980): Lipoproteins and lipid transport., Metabolic Control and desease, 8th ed., Bondy, P.K. and Rosenberg, B.E., Eds., Saunders publishing, Philadelphia
- Havel, R.J., Chao, Y., Windler, E.E., Kotite, L., and Guo, L.S. (1980) Isoprotein specificity in the hepatic uptake of apolipoprotein E and the pathogenesis of familial dysbetalipoproteinemia. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77, 4349-4353.
- Havel, R.J., Eder, H.A., and Bragdon, J.H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugallyseperated lipoproteinsin human serum. J. Clin. Invest. 1345
- Heeren,J., Steinwaerder, D.S., Schnieders, F., Cichon, G., Strauss, M., Beisiegel, U., (1999): Nonphysiological overexpression of LDL-receptors causes patological intracellular accumulation and the formation of cholesterol and cholesteryl ester crystals in vitro. J.Mol. Med. 77: 735-743
- Herz, J., Goldstein, J.L., Strickland, D.K., Ho, Y.K., and Brown, M.S. (1991) 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. J.Biol.Chem. 266, 21232-21238.
- Herz, J., Kowal, R.C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990) Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. EMBO J. 9, 1769-1776.
- Heuser, J. (1980) Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. J.Cell Biol. 84, 560-583.
- Hicke, L. and Riezman, H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. Cell 84, 277-287.
- Hide, W.A., Chan, L., and Li, W.H. (1992) Structure and evolution of the lipase superfamily. J.Lipid Res. 33, 167-178.
- Hobbs, H.H., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1992) Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum.Mutat. 1, 445-466.
- Hofer, F., Gruenberger, M., Kowalski, H., Machat, H., Huettinger, M., Kuechler, E., and Blass, D. (1994) Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91, 1839-1842.
- Hopkins, C.R., Miller, K., and Beardmore, J.M. (1985) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and epidermal growth factor receptors: a comparison of constitutive and ligand-induced uptake. Journal.Of.Cell Science.Supplement. 3, 173-186.
- Hospattankar, A.V., Law, S.W., Lackner, K., and Brewer, H.B.J. (1986) Identification of low density lipoprotein receptor binding domains of human apolipoprotein B-100: a proposed consensus LDL receptor binding sequence of apoB-100. Biochem.Biophys.Res.Commun. 139, 1078-1085.
- Hussain, M.M., Kancha, R.K., Zhou, Z., Luchoomun, J., Zu, H., and Bakillah, A. (1996) Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. Biochim.Biophys.Acta 1300, 151-170.
- Innerarity, T.L. and Mahley, R.W. (1978) Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E- containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. Biochemistry 17, 1440-1447.
- Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E., and Herz, J. (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. J.Clin.Invest. 92, 883-893.
- Ishibashi, S., Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1994) The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91, 4431-4435.
- Ishibashi, S., Perrey, S., Chen, Z., Osuga, J., Shimada, M., Ohashi, K., Harada, K., Yazaki, Y., and Yamada, N. (1996) Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. J.Biol.Chem. 271, 22422-22427.
- Jaeckle, S., Rinninger, F., Greeve, J., Greten, H., and Windler, E. (1992) Regulation of the hepatic removal of chylomicron remnants and beta-very low density lipoproteins in the rat. J.Lipid Res. 33, 419-429.

- Ji, Z.S., Lauer, S.J., Fazio, S., Bensadoun, A., Taylor, J.M., and Mahley, R.W. (1994c) Enhanced binding and uptake of remnant lipoproteins by hepatic lipase-secreting hepatoma cells in culture. J.Biol.Chem. 269, 13429-13436.
- Jong, M.C., Dahlmans, V.E., van Gorp, P.J., van Dijk, K.W., Breuer, M.L., Hofker, M.H., and Havekes, L.M. (1996) In the absence of the low density lipoprotein receptor, human apolipoprotein C1 overexpression in transgenic mice inhibits the hepatic uptake of very low density lipoproteins via a receptor- associated protein-sensitive pathway. J.Clin.Invest. 98, 2259-2267.
- Kane, J.P. (1996) Structure and Function of the Plasma Lipoproteins and Their Receptors. In: *Atherosclerosis and Coronary Disease*, 89-103. Edited by Fuster, V., Ross, R., and Topol, E.J., Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.
- Kim, D.H., Iijima, H., Goto, K., Sakai, J., Ishii, H., Kim, H.J., Suzuki, H., Kondo, H., Saeki, S., and Yamamoto, T. (1996) Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. J.Biol.Chem. 271, 8373-8380.
- Kinnunen, P.K., Jackson, R.L., Smith, L.C., Gotto,A.M.,Jr. and Sparrow, J.T., (1977): Activation of lipoprotein lipase by native and synthtic fragments of human plasma apolipoprotein C-II., Proc.Natl.Acad.Sci.,USA, 79, 5693
- Kita, T., Brown, M.S., Watanabe, Y., and Goldstein, J.L. (1981) Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78, 2268-2272.
- Kita, T., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Watanabe, Y., Hornick, C.A., and Havel, R.J. (1982) Hepatic uptake of chylomicron remnants in WHHL rabbits: a mechanism genetically distinct from the low density lipoprotein receptor. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 3623-3627.
- Kobayashi, K., Oka, K., Forte, T., Teng, B., Ishimura-Oka, K., Nakamuta, M., and Chan, L., (1996): Reversal of hypercholesterolmia in LDL-receptor knock-out mice by adeno-virus-mediated gene transfer of the VLDL-receptor. J.Biol. Chem. 271: 6852-6860
- Kozarsky, K.F., Jooss, K., Donahee, M., Strauss, J.F., and Wilson, J.M., (1996): Effective treatment of familia hypercholesterolaemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL-receptor gene. Nat. Genet. 13: 54-62
- Krapp, A., Ahle, S., Kersting, S., Hua, Y., Kneser, K., Nielsen, M., Gliemann, J., and Beisiegel, U. (1996) Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor-related protein (LRP). J.Lipid Res. 37, 926-936.
- Krapp, A., Zhang, H., Ginzinger, D., Liu, M.S., Lindberg, A., Olivecrona, G., Hayden, M.R., and Beisiegel, U. (1995) Structural features in lipoprotein lipase necessary for the mediation of lipoprotein uptake into cells. J.Lipid Res. 36, 2362-2373.
- Krieger, M. and Herz, J. (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). Annu.Rev.Biochem. 63, 601-637.
- Kristensen, T., Moestrup, S.K., Gliemann, J., Bendtsen, L., Sand, O., and Sottrup-Jensen, L. (1990) Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor. Febs.Lett. 276, 151-155.
- Mahley, R.W. (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science 240, 622-630.
- Mahley, R.W. and Hussain, M.M. (1991) Chylomicron and chylomicron remnant catabolism. Curr.Opin.Lipidol. -176
- Mahley, R.W., Innerarity, T.L., and Weisgraber, K.H. (1980) Alterations in metabolic activity of plasma lipoproteins following selective chemical modification of the apoproteins. Ann.NY Acad.Sci. 348, 265-280.
- Mahley, R.W., Inneraty, T.L., Rall, S.C., Jr., and Weisgraber, K.H., (1984) : Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. (review), J. Lipid Research, 25, 1277
- Masucci-Magoulas, L., Goldberg, I.J., Bisgaier, C.L., Serajuddin, H., Francone, O.L., Breslow, J.L., and Tall, A.R. (1997) A mouse model with features of familial combined hyperlipidemia. Science 275, 391-394.
- McConathy, W. J. and Wang, C. S. Inhibition of lipoprotein lipase by the receptor binding domain of apolipoprotein E. FEBS Lett. 251, 250-252. 1989.

- Medh, J.D., Bowen, S.L., Fry, G.L., Ruben, S., Andracki, M., Inoue, I., Lalouel, J.M., Strickland, D.K., and Chappell, D.A. (1996) Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins in vitro. J.Biol.Chem. 271, 17073-17080.
- Miller, K.W. and Small, D.M. (1987) Structure of triglyceride-rich lipoproteins: An analysis of core and surface phases. In: *Plasma Lipoproteins: New Comprehensive Biochemistry*, Edited by Gotto, A.M.J., Amsterdam, Elsevier Scienec.
- Milne, R., Theolis, R.J., Maurice, R., Pease, R.J., Weech, P.K., Rassart, E., Fruchart, J.C., Scott, J., and Marcel, Y.L. (1989) The use of monoclonal antibodies to localize the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B. J.Biol.Chem. 264, 19754-19760.
- Mulder, M., Lombardi, P., Jansen, H., van Berkel, T.J., Frants, R.R., and Havekes, L.M. (1992) Heparan sulphate proteoglycans are involved in the lipoprotein lipase-mediated enhancement of the cellular binding of very low density and low density lipoproteins. Biochem.Biophys.Res.Commun. 185, 582-587.
- Neville, D.M.J. (1971) Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. J.Biol.Chem.246, 6328-6334.
- Niemeier, A., Gafvels, M., Heeren, J., Meyer, N., Angelin, B., and Beisiegel, U. (1996) VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. J.Lipid Res. 37, 1733-1742.
- Nykjaer, A., Bengtsson-Olivecrona, G., Lookene, A., Moestrup, S.K., Petersen, C.M., Weber, W., Beisiegel, U., and Gliemann, J. (1993) The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta- migrating very low density lipoprotein associated with the lipase. J.Biol.Chem. 268, 15048-15055.
- Olivecrona, T. and Bengtsson-Olivecrona, G. (1993) Lipoprotein lipase and hepatic lipase. Curr.Opin.Lipidol. -196
- Pearse, B.M. (1988) Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits. EMBO J. 7, 3331-3336.
- Rall, S.C.J., Weisgraber, K.H., and Mahley, R.W. (1982) Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. J.Biol.Chem. 257, 4171-4178.
- Robinson, M.S. (1994) The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. Curr.Opin.Cell 6, 538-544.
- Rothman, J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. Nature 372, 55-63.
- Rothman, J.E. and Schmid, S.L. (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. Cell 46, 5-9.
- Rubinsztein, D.C., Cohen, J.C., Berger, G.M., van der Westhuyzen, D.R., Coetzee, G.A., and Gevers, W. (1990) Chylomicron remnant clearance from the plasma is normal in familial hypercholesterolemic homozygotes with defined receptor defects. J.Clin.Invest. 86, 1306-1312.
- Rumsey, S.C., Obunike, J.C., Arad, Y., Deckelbaum, R.J., and Goldberg, I.J. (1992) Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblasts and macrophages. J.Clin.Invest. 90, 1504-1512.
- Sakai, J., Hoshino, A., Takahashi, S., Miura, Y., Ishii, H., Suzuki, H., Kawarabayasi, Y., and Yamamoto, T. (1994) Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. J.Biol.Chem. 269, 2173-2182.
- Salinelli, S., Lo, J.Y., Mims, M.P., Zsigmond, E., Smith, L.C., and Chan, L. (1996) Structure-function relationship of lipoprotein lipase-mediated enhancement of very low density lipoprotein binding and catabolism by the low density lipoprotein receptor. Functional importance of a properly folded surface loop covering the catalytic center. J.Biol.Chem. 271, 21906-21913.
- Saxena, A., Klein, M. G., and Goldberg, I. J. Identification and Characterization of the Endothelial Cell Surface Lipoprotein Lipase Receptor. J.Biol.Chem. 266, 17516-17521. 1991.
- Scanu, A.M., Lawn, R.M., and Berg, K., (1991): Lipoprotein (a) and atherosklerosis: Davis conference., Ann. intern. Med., 115, 209
- Schaefer, E.J., Gregg, R.E., Ghiselli, G., Forte, T.M., Ordovas, J.M., Zech, L.A., and Brewer, H.B.J. (1986) Familial apolipoprotein E deficiency. J.Clin.Invest. 78, 1206-1219.

- Schekman, R. and Orci, L. (1996) Coat proteins and vesicle budding. Science 271, 1526-1533.
- Schiedner, G., Morral, N., Parks, R.J., et al., (1998): Genomic DNA transfer with a high-capacity adenvirus vector results in imrpoved in vivo gene expression and decreased toxicity. Nat. Genet. 18: 180-183
- Schmid, S.L. and Carter, L.L. (1990) ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells. J.Cell Biol. 111, t-18
- Schumaker, V.N., Phillips, M.L., and Chatterton, J.E. (1994) Apolipoprotein B and low-density lipoprotein structure: implications for biosynthesis of triglyceride-rich lipoproteins. Adv.Protein Chem. 45, 205-248.
- Semenkovich, C. F., Chen, S. H., Wims, M., Luio, C. C., Li, W. H., and Chan, L. Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution. J.Lipid Res. 30, 423-431. 1989.
- Shore, V. G. and Shore, B. Heterogenity of human plasma very low density lipoproteins. Separation od species differing in protein components. Biochemistry 12, 502-507. 1973.
- Smith, L.C., Voyta, J.C., Catapano, A.L., Kinnunen, P.K., Gotto, A.M., Jr, and Sparrow, J.T., (1980): Activation of lipoproteinlipase by synthetic fragments of human plasma apolipoprotein C-II., Ann.N.Y.Acad.Sc., 348, 213
- Stefansson, S., Chappell, D.A., Argraves, K.M., Strickland, D.K., and Argraves, W.S. (1995a) Glycoprotein 330/low density lipoprotein receptor-related protein-2 mediates endocytosis of low density lipoproteins via interaction with apolipoprotein B100. J.Biol.Chem. 270, 19417-19421.
- Steinmetz, A., and Utermann, G., (1985): Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein A-IV., J.Biol.Chem., 260, 2258
- Stoorvogel, W., Strous, G.J., Geuze, H.J., Oorschot, V., and Schwartz, A.L. (1991) Late endosomes derive from early endosomes by maturation. Cell 65, 417-427.
- Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Nakai, T., Sakai, J., and Yamamoto, T. (1992) Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89, 9252-9256.
- Takahashi, S., Suzuki, J., Kohno, M., Oida, K., Tamai, T., Miyabo, S., Yamamoto, T., and 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.
- Torres, J.M., Alonso, C., Ortega, A., Mittal, S. Graham, F. Enjuanes, L., (1996): Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus. J. Virol. 70: 3770-3780
- van Meer, G., Gumbiner, B., and Simons, K. The tight junction does not allow lipid molecules to diffuse from one epithelial cell to the next. Nature 322, 639-641. 1986.
- Watanabe, Y., Inaba, T., Shimano, H., Gotoda, T., Yamamoto, K., Mokuno, H., Sato, H., Yazaki, Y., and Yamada, N. (1994) Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages. Possible involvement in the atherosclerotic process. Arterioscler.Thromb. 14, 1000-1006.
- Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., Harder, K.J., Mahley, R.W., Milne, R.W., Marcel, Y.L., and Sparrow, J.T. (1983) The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Monoclonal antibody inhibition of binding. J.Biol.Chem. 258, 12348-12354.
- Wileman, T., Harding, C., and Stahl, P. (1985) Receptor-mediated endocytosis. Biochem.J. 232, 1-14.
- Williams, S.E., Inoue, I., Tran, H., Fry, G.L., Pladet, M.W., Iverius, P.H., Lalouel, J.M., Chappell, D.A., and Strickland, D.K. (1994) The carboxyl-terminal domain of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2- macroglobulin receptor (LRP) and mediates binding of normal very low density lipoproteins to LRP. J.Biol.Chem. 269, 8653-8658.
- Willnow, T.E., Armstrong, S.A., Hammer, R.E., and Herz, J. (1995) Functional expression of low density lipoprotein receptor- related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92, 4537-4541.

- Willnow, T.E., Rohlmann, A., Horton, J., Otani, H., Braun, J.R., Hammer, R.E., and Herz, J. (1996c) RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. EMBO J. 15, 2632-2639.
- Windler, E., Chao, Y.S., Havel, R.J., (1980): Determinence of hepatic uptake of triglyceridrich lipoproteins and their remnants in the rat., J.Biol. Chem., 255, 5475
- Winkler, F.K., D'Arcy, A., and Hunziker, W. (1990) Structure of human pancreatic lipase. Nature 343, 771-774.
- Yamada, N., Shames, D.M., Takahashi, K., and Havel, R.J. (1988) Metabolism of apolipoprotein B-100 in large very low density lipoproteins of blood plasma. Kinetic studies in normal and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. J.Clin.Invest. 82, 2106-2113.
- Yamamoto, T., Hoshino, A., Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Iijima, H., and Sakai, J. (1995) The role of the very low density lipoprotein receptor in the metabolism of plasma lipoproteins containing ApoE. Ann.NY Acad.Sci. 748, 217-224.
- Yen, F.T., Mann, C.J., Guermani, L.M., Hannouche, N.F., Hubert, N., Hornick, C.A., Bordeau, V.N., Agnani, G., and Bihain, B.E. (1994) Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. Biochemistry 33, 1172-1180.
- Ylae-Herttuala, S., Lipton, B.A., Rosenfeld, M.E., Goldberg, I.J., Steinberg, D., and Witztum, J.L. (1991) Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and rabbit atherosclerotic lesions. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88, 10143-10147.
- Zannis, V. I., McPherson, J., Goldberger, G., Krathanasis, S. K., and Breslow, J. L. Synthesis, intracellular processing, and signal peptide of human apolipoprotein E. J.Biol.Chem. 259, 5495-5499. 1984.
- Zannis, V.I., Breslow, J.L., Utermann, G., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Havel, R.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Schonfeld, G., Hazzard, W.R., and Blum, C. (1982) Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. J.Lipid Res. 23, 911-914.
- Zorich, N., Jonas, A., Pownall, H.J., Activation of lecithin-cholesterol acyltranferase by human apolipoprotein E in discoidal complexes with lipids., J.Biol.Chem.,260, 8831

Danksagung

Nachfolgend möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen:

Frau Professor Dr. rer. physiol. Dr. hc. U. Beisiegel für die Möglichkeit, in dem unter ihrer Leitung stehendem Institut für Medizinische Biochemie und Molekulrbiologie Abteilung für Molekulare Zellbiologie des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf im Rahmen der vorliegenden Dissertation zu arbeiten;

Herrn Dr. rer. nat. J.Heeren für die großzügige und intensive wissenschaftliche und persönliche Betreuung sowie die stets motivierenden und konstruktiven Ideen, und die kritische Durchsicht und Kommentierung des Manuskripts;

Den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Institutes für die großzügige und intensive wissenschaftliche Betreuung.

Lebenslauf

Name:	Ole Dannenberg	
Geburtsdatum:	15.November 1970	
Geburtsort:	Hamburg	
Schulbildung:	1977-1981	Grundschule Sethweg in Hamburg
	1981-1990	Gymnasium Hartsprung in Hamburg
	1990	Abitur, Gymnasium Hartsprung in Hamburg
Bundeswehr:	07.1990-1992	Bundeswehr mit der Ausbildung zum Offizier des Sanitätsdienstes der Reserve
Studium:	07.1993-05.2001	Medizinstudium an der Universität Hamburg
Famulaturen:	09.1996	Paracelsus Klinik Henstedt/ Ulzburg, ChirurgischeAbteilung
	09.1997	Pathologie im UK Eppendorf in Hamburg
	02.1998	Bundeswehr Krankenhaus, Orthopädie
	03.1998	im Institut für Rechtsmedizin im UK Eppendorf in Hamburg
	07.1998	Kardiologischen Intensivstation im Allgemeinen Regional-Krankenhaus Bozen, S.E.Mitte-Süd, Südtirol,Italien
	02.1999	Bundeswehr Krankenhaus Orthopädie
Stipendium:	12.1998-05.1999	„Graduierten Kolleg“ der Universität Hamburg
Praktisches Jahr:	04.2000-08.2000	II.Medizinische Abteilung des Klinikums Nord Betriebsteil Heidberg in Hamburg
	08.2000-12.2000	Abteilung für Chirurgie des AK Altona in Hamburg
	12.2000-03.2001	Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin des AK Altona in Hamburg
Berufstätigkeit:	seit 07.2001	Arzt im Praktikum, III. Chirurgische Abteilung des AK Altona, Hamburg

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig 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, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ole Dannenberg