

Proteolyse von Apolipoprotein A-I

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biochemikerin Regina Haas
geboren am 18. Juni 1968 in Hanau

1999

Referat: PD Dr. Wolfgang Müller
Abteilung Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Koreferat: Prof. Dr. Michael Manns
Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 09.02.1999

Zusammenfassung

Apolipoprotein A-I (ApoA-I) ist das Hauptstrukturprotein der *High Density Lipoproteins* (HDL). Dieses Lipoproteinpartikel ist wesentlich am reversen Cholesterintransport beteiligt und spielt daher als antiatherogener Faktor eine besondere physiologische Rolle. Ein niedriger HDL-Spiegel scheint mit einer erhöhten katabolen Rate des ApoA-I verknüpft zu sein, der Abbaumechanismus des Apolipoproteins verbleibt jedoch unbekannt.

Für proteolytische Untersuchungen wurde humanes, reifes ApoA-I und ein ApoA-I-Fusionsprotein mit einem FLAG-Oktapeptid am carboxyterminalen Ende in der Insektenzelllinie Sf9 mit Hilfe des Baculovirussystems rekombinant exprimiert. Stoffwechselkinetische Untersuchungen im Kaninchenmodell bestätigten, daß sich die rekombinanten Proteine physiologisch wie natives ApoA-I verhielten, unabhängig von der durch das Expressionssystem bedingten aminoterminalen Addition eines Methionins. Beide rekombinant exprimierten Proteine zeigten die erwarteten Molekulargewichte, isoelektrischen Punkte und Immunreaktivitäten mit spezifischen Antikörpern. Auch eine Assoziation der beiden rekombinanten Proteine mit der HDL-Fraktion konnte belegt werden.

Untersuchungen der *in vitro*-Degradation der rekombinanten Proteine ergaben eine Bestätigung der carboxyterminalen Spaltung des Proteins. Dabei konnte die Degradation der Proteine nach Expression durch Zugabe einer Proteaseinhibitorenmischung von Phenylmethylsulfonylfluorid, Aprotinin und Leupeptin reduziert werden. Auch bei Ausschluß zellulärer Proteasen wurde eine Degradation des Proteins in Abhängigkeit vom Lösungsmittel beobachtet. Als stabilisierend wirkte 50%iges Glycerin, ebenfalls stabilisierende Wirkung zeigten 50% Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure und PBS. Eine Proteolyse der rekombinanten Proteine bei Inkubation in Humanserum wurde nicht beobachtet. Die Kontamination einer angereicherten Proteinprobe mit immundetektierbaren Fragmenten führte zu einer deutlich beschleunigten Radioaktivitätsabklingkurve bei *in vivo*-Kinetiken im Kaninchenmodell. Die Massenbestimmung eines der regelmäßig auftretenden Fragmente ergab 14700 Dalton für beide rekombinant exprimierten Proteine, was einer aminoterminalen Sequenz von Aminosäure 1-124 entspricht.

Eine stoffwechselkinetische Charakterisierung von transgenen Kaninchen, die humanes ApoA-I überexprimieren, ergab interessanterweise Unterschiede im Abbau von Kaninchen-ApoA-I und humanem ApoA-I. Kaninchen-ApoA-I war, verglichen mit humanem ApoA-I, offensichtlich mit einer kleineren und dichteren Subfraktion der HDL assoziiert und zeigte kinetisch initial einen schnelleren, später jedoch eine verlangsamten Katabolismus. Dies deutet auf eine unterschiedliche Verstoffwechselung der verschiedenen HDL-Subfraktionen und der mit ihnen assoziierten Proteine hin. Gefrierschnitte verschiedener Organe wurden bezüglich des Vorkommens von ApoA-I-Fragmenten untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine spezifische Reaktion des monoklonalen Antikörpers mit humanem ApoA-I, jedoch war eine Lokalisation von Proteinfragmenten noch nicht möglich.

Diese Ergebnisse reflektieren die Degradationsneigung von ApoA-I im lipidfreien Status. Der eigentlich zugrundeliegende Mechanismus verbleibt weiterhin ungeklärt. Dennoch scheint derzeit infolge der in verschiedenen Expressionssystemen reproduzierbar ähnlich detektierbaren Fragmente eine spezifische Protease als unwahrscheinlich. Prozesse wie Autoproteolyse und mechanische Instabilität sind deshalb in diesem Zusammenhang zu diskutieren. Die rekombinanten Proteine und die transgenen Kaninchen bieten geeignete Modelle für weiterführende Untersuchungen.

Stichworte:

Apolipoprotein A-I
High Density Lipoproteins (HDL)
Proteolyse

Abstract

Apolipoprotein A-I (apoA-I) is the main structural protein of the *High Density Lipoproteins* (HDL). This lipoprotein particle is involved in the reverse cholesterol transport from peripheral cells to the liver and therefore plays an important role as an antiatherogenic factor. Low HDL levels seem to result from a higher catabolic rate of apoA-I but still the exact catabolic fate of this apolipoprotein is unknown.

Here we describe the expression of mature apoA-I and of an apoA-I fusion protein with the addition of a carboxyterminal FLAG octapeptide with the baculovirus system using the insect cell line Sf9. Metabolic studies in rabbits confirmed the physiological integrity of the proteins in spite of the aminoterminal addition of a methionine. The molecular weights, isoelectric points and the immunoreactivity of the proteins with specific antibodies were as predicted. Furthermore, the correct association with the HDL fraction was validated.

The investigation of the *in vitro* degradation of the recombinant proteins confirmed the carboxyterminal cleavage of the proteins. Degradation was reduced by addition of a protease inhibitor cocktail with phenylmethylsulfonylfluoride, aprotinin and leupeptin. Even if cellular proteases were excluded solvent dependend degradation of the protein was observed. 50% glycerol as well as 50% acetonitril/0,1% trifluoroacetic acid and PBS showed stabilizing effects on the protein. Proteolysis of the recombinant proteins was not observed when incubated in human serum. A purified apoA-I sample contaminated with immunodetectable fragments showed a rapid *in vivo*-metabolism in rabbits compared to a highly purified sample. The mass spectroscopy of frequent occurring aminoterminal fragments revealed a mass of 14700 dalton corresponding to the aminoterminal amino acid sequence 1-124.

Metabolic studies of apoA-I in transgenic rabbits overexpressing human apoA-I showed interesting differences in the catabolism of rabbit apoA-I and human apoA-I. Rabbit apoA-I was associated with a smaller and denser subfraction of HDL compared to human apoA-I and showed initially a faster, in the later part of the study a slower catabolism in relation to human apoA-I. This points to a different metabolism of the HDL subfractions and their associated proteins. Immunohistochemical investigation of frozen sections of different organs did not yet reveal a specific location of apoA-I fragments.

These results demonstrate the sensitivity of apoA-I to degradation especially if not associated with lipoproteins. The underlying mechanisms of degradation remain unknown. Currently, due to the observation of similar proteolytic fragments occurring even in different expression system a specific protease activity seems unlikely. In this context autoproteolysis and mechanical instability of the protein have to be discussed. The recombinant proteins and the transgenic animals represent interesting models for future investigations.

Keywords

Apolipoprotein A-I
High Density Lipoproteins (HDL)
Proteolysis

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schmidt HH-J, Genschel J, Haas R, Büttner C, Manns MP. 1997. Expression and Purification of recombinant human apolipoprotein A-I in Chinese Hamster Ovary cells. *Protein Expres. Purif.* 10:226-236.

Schmidt HH-J, Haas R, Remaley A, Genschel J, Strassburg CP, Büttner C, Manns MP. 1997. The very aminoterminal domain does not alter the in vivo catabolism of human apolipoprotein A-I: Comparing three different expression systems. *Clin. Chim. Acta* 268:41-60.

Schmidt HH-J, Genschel J, Haas R, Manns MP. 1997. Preparative Electrophoresis: An improved method for the isolation of human recombinant apolipoprotein A-I. *BioTechniques* 5:778-780.

Genschel J, Haas R, Pröpsting M, Schmidt HH-J. 1998. Apolipoprotein A-I induced amyloidosis. *FEBS Letters* 430:145-149.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	10
1.1 ÜBERBLICK	10
1.2 REVERSER CHOLESTERIN-TRANSPORT	14
1.2.1 Cholesterin-Efflux	14
1.2.2 Hepatische Cholesterin-Aufnahme und Exkretion	17
1.2.3 Wichtige Enzyme im Lipoproteinstoffwechsel	18
1.3 APOLIPOPROTEIN A-I (APOA-I)	20
1.4 AUFGABENSTELLUNG	23
2 METHODEN	24
2.1 ZELLKULTUR DER INSEKTENZELLINIE SF9	24
2.1.1 Kultur der Zellen	24
2.1.2 Bestimmung der Zellzahl	24
2.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen	25
2.1.4 Titerbestimmung und Amplifikation des rekombinanten Baculovirus	25
2.1.5 Infektion der Zellen mit dem rekombinanten Baculovirus und Proteinernte ...	26
2.2 QUANTITATIVE METHODEN	26
2.2.1 Proteinbestimmung nach Lowry	26
2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford	28
2.2.3 Nephelometrische Quantifizierung von Proteinen	29
2.3 ELEKTROPHORETISCHE METHODEN	32
2.3.1 Acetonfällung	32
2.3.2 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAAGE)	33
2.3.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	34
2.3.4 Färbung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau	35
2.3.5 Färbung der Proteinbanden mit der Silberfärbung	35
2.3.6 Westernblot und Immunfärbung	36
2.3.7 Elektroelution	37
2.3.8 Affinitätschromatographie	38
2.3.9 Reversed Phase Chromatographie	39
2.4 ISOLATION VON HUMANEM APOLIPOPROTEIN A-I AUS SERUM	39

2.5 STOFFWECHSELKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	40
2.5.1 Kaninchen	40
2.5.2 Kaninchenhaltung.....	41
2.5.3 Radioiodmarkierung von Apolipoprotein A-I.....	41
2.5.4 Isolation der HDL-Fraktion.....	42
2.5.5 Stoffwechselkinetische Untersuchungen.....	43
2.5.6 FPLC-Analyse	43
2.5.7 Dichtegradienten-Ultrazentrifugations-Analyse	43
2.5.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAAGE).....	44
2.6 BESTIMMUNG DER N-TERMINALEN PROTEINSEQUENZ	44
2.7 MASSENSPEKTROSKOPISCHE ANALYSEN	45
2.8 PROTEASEINHIBITOREN.....	45
2.9 TRANSGENE KANINCHEN.....	45
2.10 IMMUNHISTOCHEMIE.....	46
2.10.1 Einbetten der Organe und Anfertigen der Gefrierschnitte	46
2.10.2 Immunhistochemische Färbung der Gefrierschnitte	46
2.10.3 Dokumentation der Gefrierschnittergebnisse	47
3 ERGEBNISSE	48
3.1 EXPRESSION VON REKOMBINANTEM APOA-I IN DER INSEKTENZELLINIE SF9 MITTELS BACULOVIRUS.....	48
3.1.1 Charakterisierung der exprimierten Proteine in SDS-Gel, Immunoblot und isoelektrischer Fokussierung.....	49
3.1.2 Bestimmung der Proteinsequenz	52
3.1.3 In vitro-Assoziation der Proteine: Analyse mittels FPLC und Dichtegradienten- Ultrazentrifugation	52
3.1.4 Anreicherung und in vivo Charakterisierung der rekombinanten Proteine	56
3.2 DEGRADATION VON APOA-I.....	66
3.2.1 Wirkung von Proteaseinhibitoren auf die Degradation	66
3.2.2 in vitro Stabilität von ApoA-I	70
3.2.3 Inkubation rekombinanten Proteins in Humanserum: Untersuchungen zur	
Degradation.....	73
3.2.4 Einfluß von ApoA-I-Fragmenten auf die funktionellen Eigenschaften von ApoA-I	74

3.2.5 <i>Charakterisierung eines Fragmentes aus der RPC mittels Massenspektrum</i>	79
3.3 TRANSGEN EXPRIMIERTES APOA-I IN KANINCHEN	83
3.3.1 <i>In vivo Charakterisierung humanen und Kaninchen-ApoA-I</i>	83
3.3.2 <i>Immunhistochemische Untersuchung</i>	88
4 DISKUSSION	91
4.1 APOLIPOPROTEIN A-I	91
4.2 REKOMBINANTES APOA-I: EXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG	92
4.3 DEGRADATION VON APOA-I	98
4.4 TRANSGENE KANINCHEN	105
5 ZUSAMMENFASSUNG	109
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	111
7 LITERATURVERZEICHNIS	113

1 Einleitung

1.1 Überblick

Lipoproteine gewährleisten im Blut den Transport von Lipiden, die als hydrophobe Substanzen nicht in gelöster Form transportiert werden können. Dabei kann man die Lipoproteine gemäß ihrer Dichte bei ultrazentrifugeller Auftrennung in unterschiedliche Klassen unterteilen: „Chylomikronen“, „*Very Low Density Lipoproteins*“, „*Low Density Lipoproteins*“, „*Intermediate Density Lipoproteins*“, „*High Density Lipoproteins*“ und „*Very High Density Lipoproteins*“ (CM, VLDL, IDL, LDL, HDL und VHDL). Die Dichtebereiche der verschiedenen Lipoproteine sind in Tabelle 1 angegeben.

Dichteklasse	Subklasse	Dichte (g/ml)	Partikelgröße (nm)
CM		<0,95	80-1200
VLDL		0,95-1,006	20-80
IDL		1,006-1,019	25-30
LDL		1,019-1,063	19-25
HDL		1,063-1,21	8-11
	HDL ₂	1,063-1,125	
	HDL _{2a}	1,100-1,125	
	HDL _{2b}	1,063-1,100	
	HDL ₃	1,125-1,21	
VHDL		1,21-1,25	7

Tabelle 1: Dichteklassen und Größen der Lipoproteine [1, 2].

Zentrale Organe des Lipoproteinstoffwechsels stellen die Leber und das Intestinum dar. Sie repräsentieren die Hauptsyntheseorte der Lipoproteine. Gleichzeitig fungiert die Leber auch als primärer Abbauort der Lipoproteine. Insbesondere die Leberfunktion hat damit infolge ihrer Bedeutung für die Synthese und den Katabolismus von Lipoproteinen einen entscheidenden Einfluß auf deren Konzentration. Die Lipoproteine selber sind Komplexe aus Lipiden (Triglyzeride, Cholesterin, Cholesterinester, Phospholipide) und Proteinen (Apolipoproteine). Sie bestehen aus einem hydrophoben Kern (Triglyzeride, Cholesterinester) und einem hydrophilen Mantel

(Apolipoproteine, Cholesterin, Phospholipide). In dieser Form werden Lipide im hydrophilen Blut transportiert.

Der Stoffwechsel der Lipoproteine ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Mechanismen und Proteine, die die Aufnahme der Lipoproteine in die Organe oder den Austausch verschiedener Komponenten in die und zwischen den Lipoproteinen ermöglichen. Dabei ist der Übergang der Lipoproteinklassen, die außer durch die jeweilige Dichte auch durch die ganz spezielle Apolipoproteinzusammensetzung charakterisiert sind, ineinander fließend. Eine Auswahl der wichtigsten Apolipoproteine und ihre Verteilung ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Einen Überblick über den gesamten Stoffwechsel der Lipoproteine gibt Abbildung 1. Wie aus dieser Abbildung ersichtlich, kann man den Stoffwechsel der Lipoprotein in verschiedene Bereiche unterteilen: Den exogenen Weg und den endogenen Weg, wobei letzterer noch einmal in die Bereiche des Transportes zu den peripheren Körperzellen und zurück zur Leber als dem zentralen Organ des Lipoproteinstoffwechsels unterteilt werden kann.

Im exogenen Weg werden Cholesterin und Triglyzeride aus der Nahrung mittels Chylomikronen solubilisiert und zum Muskel- und Fettgewebe transportiert. Die nach Spaltung und Abgabe der Triglyzeride zurückbleibenden cholesterinreichen Chylomikronen-Remnants (CM-R) werden von der Leber über spezifische Rezeptoren aufgenommen.

Im endogenen Weg werden VLDL von der Leber synthetisiert und in die Lebervenen sezerniert. Sie sind angereichert mit Triglyzeriden, die in den Kapillaren durch spezifische Lipasen (Lipoprotein-Lipasen, LPL) hydrolytisch in Fettsäuren und Monoglyzeride gespalten werden, die wiederum ins angrenzende Gewebe diffundieren können. Die VLDL reduzieren durch diesen Prozeß ihren Gehalt an Triglyzeriden, ihre Dichte nimmt zu. So entstehen aus den VLDL die mit Cholesterin angereicherten LDL.

Apolipoprotein	Dichteklasse	Masse (kDa)	Funktion
A-I	HDL	28	Strukturprotein, Aktivierung der LCAT, Bindung an HDL-Rezeptor
A-II	HDL	17	Strukturprotein, moduliert Aktivierung der hepatischen Lipase und LCAT, Bindung an HDL-Rezeptor
A-IV	CM, HDL	46	Triglyzeridstoffwechsel, Aktivierung der LCAT, moduliert LPL-Aktivität und HDL-Interkonversion
B100	VLDL, LDL	550	Sekretion von Triglyzeriden und Cholesterin aus Leber und Dünndarm, Strukturprotein, Bindung an B/E-Rezeptoren, Aktivierung der Lysolecithin-Acyltransferase
B48	CM, VLDL	265	Resorption von Lipiden und lipidlöslichen Vitaminen aus der Nahrung
C-I	CM, VLDL	6,5	Unterdrückung der Bindung naszierender Lipoproteine an den B/E-Rezeptor und an LRP, Aktivierung der LCAT und LPL; inhibiert Phospholipase A2; inhibiert Bindung von β -VLDL an LRP
C-II	CM, VLDL	8,8	Aktivierung der Lipoproteinlipase (obligater Faktor) und LCAT
C-III	CM, VLDL	8,9	Inhibierung der Lipoproteinlipase und Interferenz mit Lipoproteinen an Leberrezeptoren; moduliert LCAT-Aktivität
D (A-III)	HDL ₃	29	Aktivierung und Stabilisierung der LCAT
E	CM, VLDL	34	Ligand für den B/E- sowie E-Rezeptor, Ausschleusung von Cholesterin aus peripheren Zellen (reverser Cholesterintransport); Lipidtransport im Gewebe

Tabelle 2: Vorkommen und Funktion der wichtigsten Apolipoproteine [2, 3].

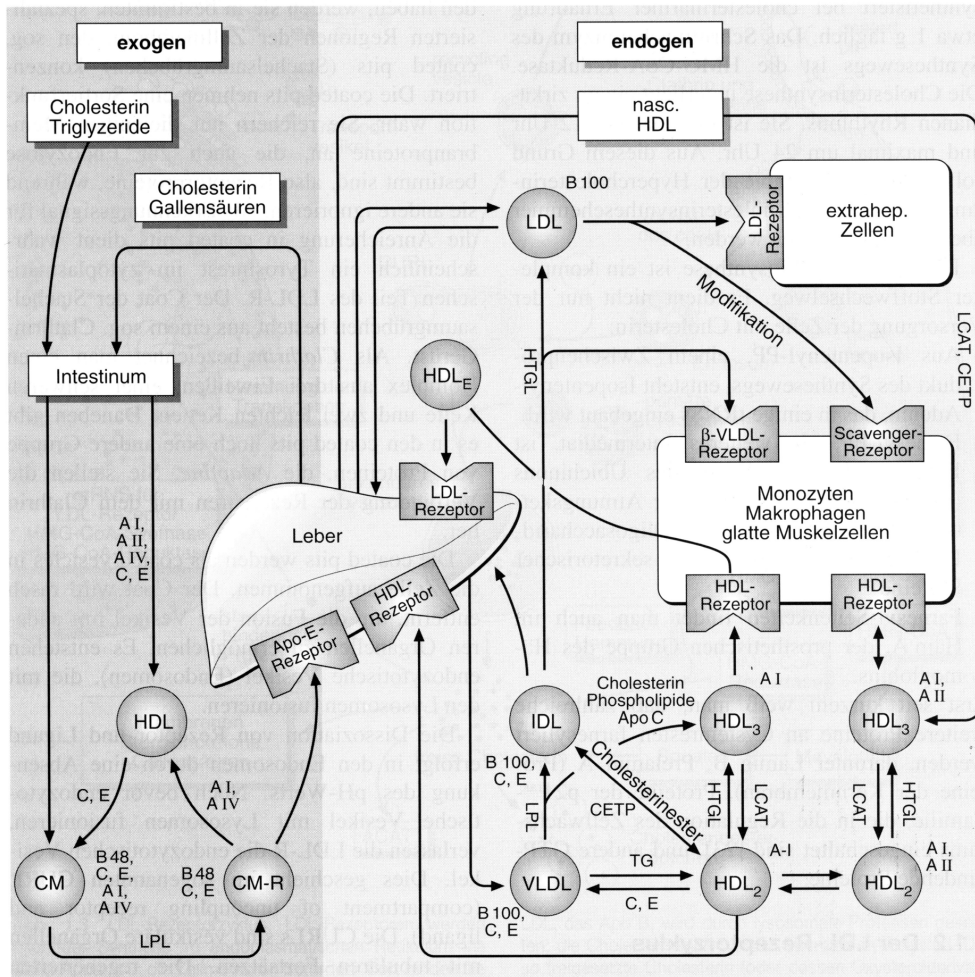


Abbildung 1: Stoffwechsel der Lipoproteine [2].

Die LDL und damit das Cholesterin werden über Rezeptoren in die peripheren Zellen und in die Leber aufgenommen. Das Cholesterin stellt einen wichtigen Bestandteil der Zellmembranen dar. Hierdurch beeinflusst es die Fluidität und Diffusionskapazität der Zellmembran. Weiterhin ist Cholesterin wichtig als Vorstufe für die Steroidhormonsynthese und die Bildung der Gallensäuren. Als Cholesterinester kann Cholesterin intrazellulär gespeichert werden. Zur Gewährleistung der Cholesterin-Homöostase kann das über die LDL in die Zellen aufgenommene Cholesterin wieder mittels der HDL zurück zur Leber transportiert werden [4]. Die Leber nimmt vermutlich über spezifische Rezeptoren die mit Cholesterin und hauptsächlich Cholesterinester angereicherten HDL auf. Dieser Prozeß wird als reverser Cholesterin-Transport bezeichnet. Die Leber ist das einzige Organ, das größere Mengen Cholesterin aus dem Körper entfernen kann (Faeces). Dieses geschieht durch die Galle sowohl in Form des freien, d.h. nicht veresterten Cholesterins, als auch in Form von Gallensäuren.

Die Begriffe HDL-Stoffwechsel und reverser Cholesterin-Transport sind eng miteinander verbunden. Zum besseren Verständnis des reversen Cholesterin-Transportes sollen einzelne Teilprozesse wie Cholesterin-Efflux, die Cholesterinaufnahme in der Leber, die hepatische Cholesterin-Exkretion und wichtige, bei diesen Prozessen beteiligte Enzyme näher beleuchtet werden.

1.2 Reverser Cholesterin-Transport

1.2.1 Cholesterin-Efflux

Cholesterin ist wichtiger Bestandteil der Plasmamembranen bei den Eukaryonten, indem es die Fluidität derselben beeinflusst. Der innere Anteil der Plasmamembran besitzt einen höheren Gehalt an Cholesterin. Sowohl Phospholipide als auch Fettsäuren haben Einfluß auf die regionale Verteilung und die Konzentration des Cholesterins innerhalb der Plasmamembran [5]. Berechnungen der komplexen Kinetiken des membrangebundenen Cholesterin-Transportes lassen Areale vermuten, die angereichert mit Cholesterin sind [6]. Des weiteren beeinflussen intrazelluläre Lipidtransport-Proteine die Verteilung des Cholesterins innerhalb der Plasmamembran [7, 8].

Für die Abgabe von Cholesterin aus den Zellen existieren unterschiedliche Modelle. Dabei ist allerdings noch offen, ob der Cholesterinakzeptor nur von der Zellmembran Cholesterin aufnimmt, ob eine Endozytose/Exozytose mit Aufnahme intrazellulären Cholesterins stattfindet oder ob die Zelle Cholesterin sezernieren kann, das im Extrazellularraum von dem Akzeptor aufgenommen wird. Wahrscheinlich schließen sich diese verschiedenen Formen der Cholesterinabgabe nicht gegenseitig aus, sondern sind *in vivo* alle relevant [3].

Bei dem Modell der passiven Diffusion nähern sich die HDL als Cholesterinakzeptor der Plasmamembran. Infolge eines Konzentrationsgradienten diffundiert das Cholesterin von der Plasmamembran zu den HDL [9-11]. Dabei muß das Cholesterin beim Wechsel von der Membran zu den HDL kurzfristig in der wäßrigen Phase (Blut) gelöst sein, was vermutlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieses Cholesterin-Effluxes darstellt [12, 13]. Über diesen Prozeß können allerdings nur geringe Mengen Cholesterin aus der Zelle mobilisiert werden [9]. Eine

rezeptorvermittelte Cholesterinaufnahme würde die Effizienz wesentlich steigern. Es gab schon früh Hinweise, daß HDL bzw. die mit dem Partikel assoziierten Apolipoproteine mit einem Rezeptor auf der Oberfläche der Zellmembran interagieren und so einen Austausch von Cholesterin und Cholesterinestern ermöglichen [14, 15]. Kürzlich konnte ein muriner HDL-Rezeptor als Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) identifiziert werden [16-19]. Der Rezeptor vermittelt die selektive Aufnahme von Cholesterin in die HDL. Dabei kommt den Apolipoproteinen eine besondere Rolle bei der Bindung der HDL zu: Sowohl ApoA-I, ApoA-II und ApoC-III konnten eine selektive Bindung zu SR-BI vermitteln. Funktionell scheint von ApoA-I das C-terminale Ende für die Bindung verantwortlich zu sein [15, 20, 21]. Die Homologie der C-terminalen Aminosäuresequenz von ApoA-I und ApoA-II könnte auch für die spezifische Bindung von ApoA-II an den Rezeptor verantwortlich sein [22]. Der Rezeptor wird verstärkt in der Leber und steroidsynthetisierenden Geweben exprimiert [18]. Im Menschen zeigt der humane „CD36 and LIMPII analogous-1“-Rezeptor (CLA-1) eine hohe Sequenzhomologie zu SR-B1 und weist auch funktionell ähnliche Eigenschaften in Bezug auf eine HDL-Bindung auf [23]. Weiterhin konnten für das mit SR-B1 und CLA-1 verwandte Glykoprotein CD36 Bindungseigenschaften für HDL, LDL und VLDL nachgewiesen werden [24]. Der Cholesterinefflux aus intrazellulären Kompartimenten zur Membran hin könnte über eine HDL-initiierte Stimulation der Proteinkinase C mit anschließender Phosphorylierung weiterer Proteine und entsprechendem intrazellulären Signalweg zusätzlich mediiert werden [25]. Ebenfalls sprechen Befunde für eine Beteiligung von cAMP am Cholesterinefflux [26, 27].

Weitere experimentelle Daten belegen, daß HDL nach der Bindung an einen Oberflächenrezeptor auch internalisiert werden können. Im Gegensatz zu LDL wird HDL jedoch nicht in ein lysosomales Kompartiment geführt, sondern nimmt intrazellulär Cholesterin und eventuell ApoE auf und wird anschließend wieder sezerniert [28-31]. Neben der Mobilisierung von Cholesterin und Cholesterinestern durch HDL aus der Zelle gibt es auch noch Hinweise auf eine direkte Sekretion von Lipiden durch die Zelle über „lamellar bodies“. Diese cholesterin- und phospholipidreichen Partikel können direkt mit der Zellmembran verschmelzen und ihre Lipide an den Extrazellularraum abgeben, wo sie mit einem Akzeptor (HDL) assoziieren [3].

HDL-Partikel können in ihrer Form, Größe, Dichte und Lipoproteinzusammensetzung in Subformen unterschieden werden. Prinzipiell kann

man heutzutage die HDL in drei Lipoproteinkomplexe unterteilen. Die Kenntnis dieser Unterformen ermöglicht ein besseres Verständnis über den HDL-Stoffwechsel und damit über den Cholesterin-Efflux. Dabei unterscheidet man kleine lipidarme HDL (2-5%), flache scheibenförmige HDL mit polaren Lipiden (Cholesterin, Phospholipide) (2-3%) und sphärische HDL mit polaren und nicht polaren Lipidanteilen (Triglyzeride, Cholesterinester) (90-95%). Die lipidarme HDL-Subfraktion (auch prä β -1 HDL genannt) nimmt das Cholesterin von der Zellmembran auf [10, 11, 32]. Diese mit Phospholipiden angereicherte HDL-Subfraktion hat ein Molekulargewicht von 60-70 kDa mit einem berechneten Durchmesser von 5-6 nm. Als einziges Protein liegt ein Molekül ApoA-I pro Partikel vor. Höhere Konzentrationen dieser HDL-Partikel wurden in Lymphgefäßen und in der Intima der Aorta gefunden [33-35]. Das Verhältnis von Lecithin zu Sphingomyelin der lipidarmen HDL ähnelt dem der äußeren Zellmembran [36]. Nach Aufnahme des Cholesterins in die lipidarme HDL-Subfraktion ändern sich die Partikel über bisher nicht ausreichend bekannte Mechanismen über die flachen, scheibenförmigen HDL (auch prä β -2 HDL genannt) zu den sphärischen HDL (auch α -HDL genannt). Die scheibenförmigen HDL beinhalten drei Moleküle ApoA-I pro HDL-Partikel [10, 11, 32]. Auch diese HDL-Subfraktion ist in höheren Konzentrationen in Lymphgefäßen nachweisbar [33, 34]. Der überwiegende Anteil der HDL liegt als sphärische Partikel vor, die eine α -Mobilität im Agarosegel aufweisen (Durchmesser 9-12 nm). Mittels Ultrazentrifuge kann man die α -HDL infolge zunehmender Größe und Lipidanteile in HDL₃ und HDL₂ fraktionieren. Die HDL-Partikel können dabei ApoA-I oder ApoA-I und ApoA-II beinhalten [21, 37, 38]. Entsprechend spricht man von LpA-I und LpA-I,A-II Partikel. ApoA-I erscheint innerhalb der α -HDL weniger geordnet vorzuliegen im Vergleich zu prä β -1 und prä β -2 HDL. Die Übergänge dieser zahlreichen verschiedenen HDL-Formen sind fließend. So ändern sich diese Partikel mehrfach in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung und damit in ihrer Größe während der ca. 2-3 Tage, die sie im Blut zirkulieren (Abbildung 2) [39, 40].

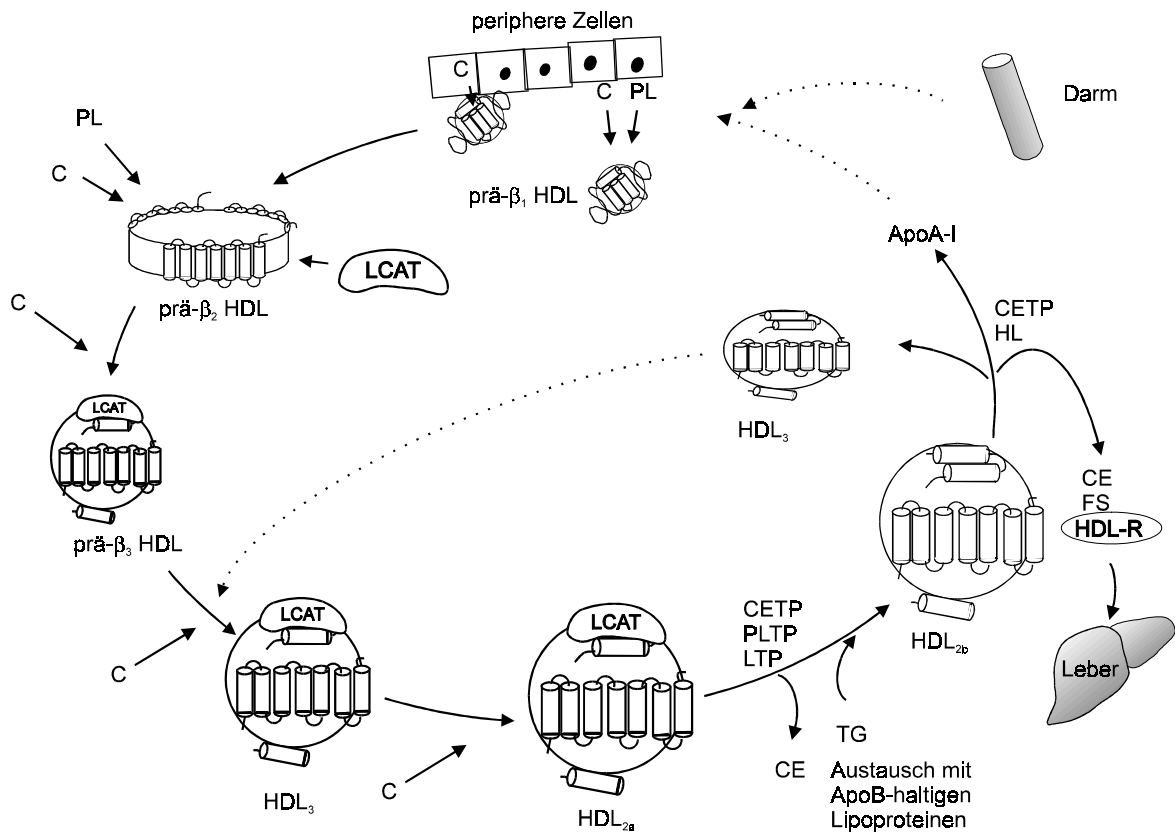


Abbildung 2: Verschiedene Zustandsformen der HDL und des ApoA-I. C: Cholesterin; PL: Phospholipide; TG: Triglyceride; FS: Fettsäuren; CE: Cholesterinester; CETP: Cholesterinester-Transfer-Protein; LCAT: Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase; PLTP: Phospholipid-Transfer-Protein; LTP: Lipid-Transferprotein; HL: Hepatische Lipase; HDL-R: HDL-Remnants [41, 42].

1.2.2 Hepatische Cholesterin-Aufnahme und Exkretion

Die Aufnahme von Cholesterin und Cholesterinestern in die Leber stellt einen weiteren Schritt im reversen Cholesterin-Transport dar. Verschiedene Mechanismen zur Erklärung dieses Vorganges wurden bisher vorgeschlagen: 1. Aufnahme von freiem Cholesterin von Lipoproteinen durch Diffusion [9, 43], 2. selektive Aufnahme von Cholesterinestern durch HDL-Partikel [44, 45] 3. Aufnahme von Cholesterin und Cholesterinestern mittels ApoB-haltiger Lipoproteine durch Interaktion mit dem LDL-Rezeptor [46], 4. Aufnahme ApoE-angereicherter HDL durch den LDL-Rezeptor [47] und 5. endozytotische Aufnahme der HDL, insbesondere der HDL₃, über Clathrin-coated vesicles nach Wechselwirkung mit einem spezifischen HDL-Rezeptor [48]. Vermutlich werden Cholesterin und Cholesterinester parallel mittels verschiedener hier angeführter Mechanismen in die Leber aufgenommen. Stoffwechselkinetische Untersuchungen im Menschen zeigten, daß Cholesterin primär über die Endozytose

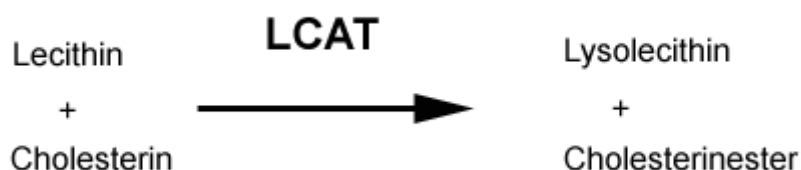
ApoB-haltiger Lipoproteine und die direkte Aufnahme von HDL in die Leber gelangten [49].

Den letzten Schritt im reversen Cholesterin-Transport stellt die hepatische Ausscheidung des Cholesterins dar. Dieses geschieht sowohl durch direkte Sekretion von Cholesterin in die Galle als auch indirekt durch Sekretion von Gallensäuren, deren Vorstufe das Cholesterin ist [12]. Infolge der geringen Hydrophilie des Cholesterins wird es mit Phospholipiden und Gallensäuren in Form von Micellen oder Vesikeln sezerniert [50]. Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Umwandlung des Cholesterins in Gallensäuren ist die Hydroxylierung des Moleküls mittels der 7- α -Hydroxylase [51]. Die Enzymaktivität wird auf transkriptioneller Ebene durch Cholesterin hochreguliert und durch Gallensäuren, insbesondere lipophile Gallensäuren, herunterreguliert [51, 52]. Der Anteil des Cholesterins und der Gallensäuren, der nicht intestinal als Galle zurückresorbiert wird, geht über den Stuhl verloren.

Dieser Vorgang ist der einzige Weg, durch den Cholesterin, endogen synthetisiert oder exogen zugeführt, wieder ausgeschieden werden kann.

1.2.3 Wichtige Enzyme im Lipoproteinstoffwechsel

Eine wichtige Rolle im Lipoproteinstoffwechsel, insbesondere im Zusammenhang mit dem reversen Cholesterintransport, kommt dem Enzym Lecithin-Cholesterin Acyltransferase (LCAT) zu. Das Enzym katalysiert folgende Reaktion:



Glomset *et al.* konnten erstmals 1966 die Veresterung des Cholesterins durch LCAT belegen [53]. Es handelt sich bei dem Enzym um ein 44 kDa Glykoprotein, das von der Leber synthetisiert und sezerniert wird [4]. LCAT assoziiert im Blut mit den Lipoproteinen, hauptsächlich der α -HDL. ApoA-I ist Kofaktor für die LCAT-Aktivität [54, 55]. Die in den HDL durch die Einwirkung von LCAT entstehenden Cholesterinester werden im hydrophoben inneren Anteils des HDL-Partikels angesammelt. Aus HDL₃

entsteht so die weniger dichte HDL₂-Fraktion. Die stetige Veresterung des Cholesterins ermöglicht das Aufrechterhalten eines Konzentrationsgradienten von Cholesterin von der peripheren Zelle hin zum HDL-Partikel. Die Bedeutung der LCAT-Aktivität für den HDL-Stoffwechsel wurde evident durch die Charakterisierung der Patienten mit familiärer LCAT-Defizienz [56, 57]. Diese Patienten zeichnen sich durch deutlich erniedrigte HDL-Serumkonzentrationen aus. Die inverse Korrelation der Konzentration des HDL-Cholesterins (im Gegensatz zum LDL-Cholesterin) mit dem Auftreten der Koronarsklerose bekam hierdurch erstmals eine biochemische Grundlage [58-61].

Ein weiteres wichtiges Protein im Lipidstoffwechsel ist das 74 kDa schwere Cholesterinester-Transferprotein (CETP). Es ermöglicht den Austausch der von der LCAT gebildeten Cholesterinester von HDL zu LDL und VLDL [46]. Während freies Cholesterin spontan zwischen den verschiedenen Lipoprotein-Partikeln wechseln kann [62], ist dieser Wechsel der Cholesterinester ohne CETP nicht möglich. Im Austausch zu den Cholesterinestern erhalten HDL Triglyzeride von LDL und VLDL, was einem Nettotransfer der Lipide gleichkommt. Interessanterweise weisen andere Säugetiere wie Ratte, Maus oder Schwein keine CETP-Aktivitäten auf, während hingegen das Kaninchen eine deutlich höhere Enzymaktivität als der Mensch besitzt [2].

Die durch den CETP-vermittelten Transfer mit Cholesterinester beladene LDL werden von der Leber aufgenommen. CETP ist hauptsächlich mit der HDL₃-Subfraktion assoziiert, die ApoA-I und LCAT, jedoch nicht ApoA-II beinhaltet [63]. Zusammen mit der LCAT ist somit CETP bei dem Prozeß der Umwandlung der HDL₃ in HDL₂ beteiligt. Der Anteil der Triglyzeride und Phospholipide der HDL₂ kann wiederum mittels der Hepatischen Lipase hydrolytisch gespalten werden. Aus HDL₂ kann somit wieder HDL₃ entstehen. Die Signifikanz von CETP im reversen Cholesterin-Transport ist belegt durch Tierexperimente [64] und Patienten mit einer homozygoten Ausprägung einer CETP-Defizienz [65]. Diese Patienten besitzen hohe Konzentrationen mit Cholesterinester angereicherter HDL.

Als weitere Proteine im Lipidstoffwechsel sind noch die Lipoproteinlipase (LPL), die hepatische Triglyzeridlipase (HTGL) das Phospholipidtransferprotein (PLTP), das Lipidtransferprotein (LTP), das Lipidtransferinhibitorprotein (LTIP) und das Serumamyloid A (SAA) von Bedeutung. Die LPL ist ein 54 kDa Glykoprotein und vermittelt durch seine Lokalisation insbesondere im Fettgewebe und in der Muskulatur die Spaltung von Triglyzeriden in den Chylomikronen. Dabei benötigt es zur Aktivierung

Apolipoprotein CII [66]. Die HTGL ist in der Leber lokalisiert und spaltet Triglyzeride vor allem aus den IDL und HDL₂. Dabei benötigt das Enzym für seine Aktivität keinen Kofaktor, jedoch wurde über eine Aktivitätssteigerung durch Apolipoproteine berichtet [2]. Das PLTP wurde kürzlich identifiziert. Es spielt im Rahmen des Phospholipidtransfers zwischen den Lipoproteinen eine Rolle und weist in der Proteinsequenz eine 25%ige Homologie zu CETP auf [67]. Das LTP vermittelt den Austausch von Cholesterinestern und insbesondere Triglyzeriden zwischen den Lipoproteinen [68]. Das LTIP fungiert im Lipoproteinstoffwechsel als Antagonist zum CETP und inhibiert den CETP-vermittelten Lipidtransfer [69]. Das SAA ist eigentlich ein Akutphaseprotein, dessen Funktion noch nicht ganz geklärt ist. Es ist jedoch an der Modulation der LCAT-Aktivität beteiligt [3].

1.3 Apolipoprotein A-I (ApoA-I)

ApoA-I ist das primäre Strukturprotein der HDL. Die Synthese und der Abbau von ApoA-I bestimmen die Serumkonzentration der antiarterogen wirksamen HDL [70]. ApoA-I bindet und transportiert Plasma-Lipide in den HDL, dient als Kofaktor für LCAT, fördert den Cholesterin-Efflux und vermittelt als Ligand die Interaktion der HDL mit der Zellmembran [19, 71-74]. Diese Eigenschaften sind notwendig für den reversen Cholesterintransport, der wiederum die Grundlage für den protektiven Effekt der HDL bezüglich Arteriogenese darstellt.

Durch Blockierung mit verschiedenen Antikörpern konnten einige Epitope des ApoA-I hinsichtlich ihrer Funktion identifiziert werden. Abbildung 3 zeigt eine Auswahl der Antikörper, durch deren Einsatz die Epitope identifiziert wurden.

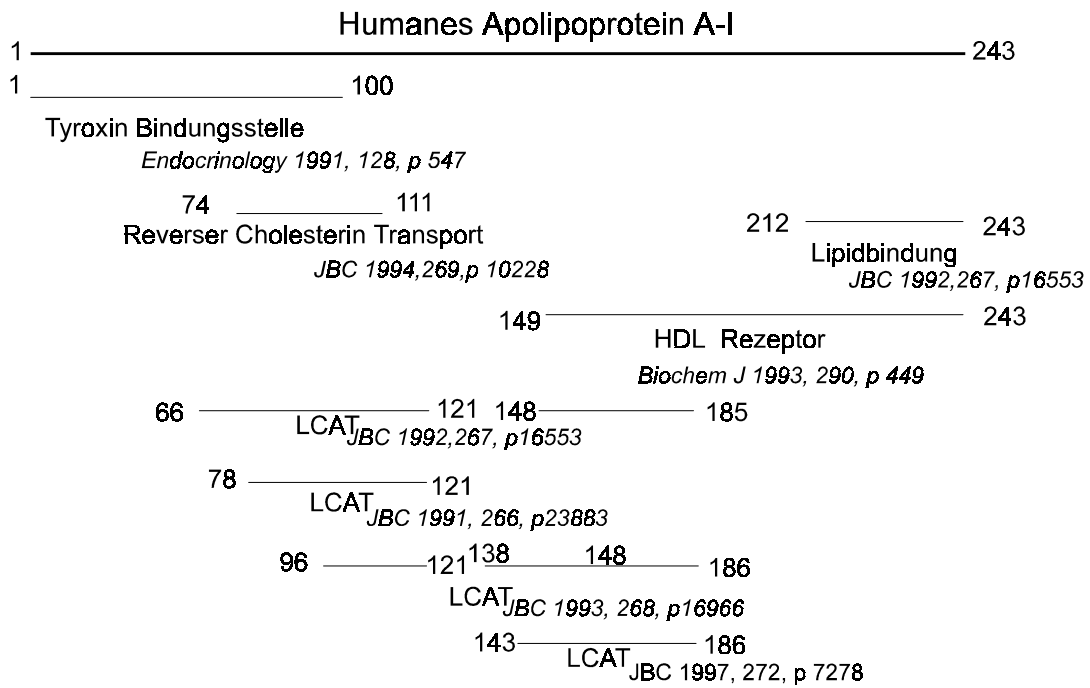


Abbildung 3: Charakterisierung verschiedener Epitope von ApoA-I.

In Abbildung 4 sind diese funktionellen Bereiche anhand der postulierten Sekundärstruktur lipidassozierten ApoA-I dargestellt. Es wird jedoch vermutet, daß sich lipidfreies und lipidgebundenes ApoA-I in ihrer Sekundärstruktur unterscheiden [75].

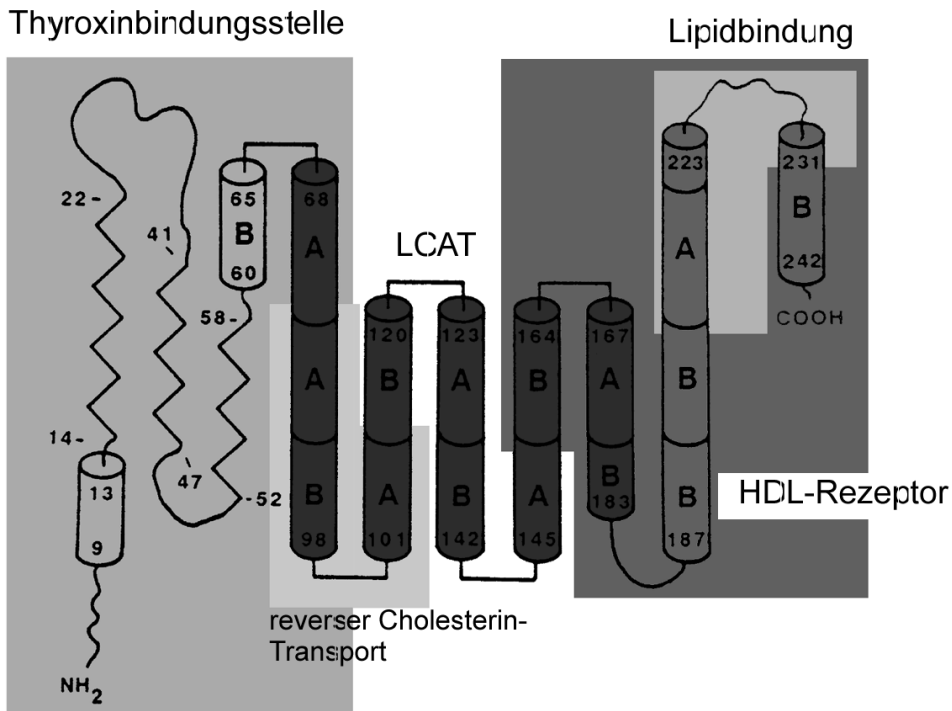


Abbildung 4: Darstellung der Sekundärstruktur von lipidgebundenem ApoA-I mit funktionellen Domänen.

ApoA-I wird von Hepatozyten und Zellen der Dünndarmmukosa als Präpropeptid synthetisiert, cotranslational zu ProapoA-I gespalten, nachfolgend sezerniert und im Plasma zum intakten ApoA-I mit 243 Aminosäuren umgeformt [76]. Die primäre Aminosäuresequenz beinhaltet vermutlich hoch-konservierte Wiederholungen von elf Aminosäuren, die jeweils amphiphatische α -Helices formen, die wiederum verantwortlich für die Interaktion mit der lipophilen Oberfläche der Lipoprotein-Partikel sind [75, 77-81]. Strukturanalytische Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung der carboxyterminalen Region von ApoA-I bezüglich Lipidbindung und Interaktion mit Zellmembranen [20, 21, 72, 82].

Stoffwechselkinetische Untersuchungen in Patienten mit erniedrigten HDL-Serumkonzentrationen ergaben einen beschleunigten Katabolismus von ApoA-I als Ursache der erniedrigten HDL-Fraktion [83-86]. Die eigentliche Ursache hierfür verbleibt ungeklärt. Die Proteolyse ist bekannt für die Regulation zahlreicher Plasma-Proteine [87-90]. Die aminoterminal endoproteolytische Spaltung des Propeptids erscheint nicht bedeutsam für eine veränderte bzw. beschleunigte Plasma-Clearance von ApoA-I [91]. Eine limitierte aminoterminal Proteolyse des intakten ApoA-I konnte nachgewiesen werden [92]. Im Gegensatz dazu jedoch erscheint die carboxyterminale Region von ApoA-I viel sensitiver bezüglich Proteolyse [20, 93-96]. Diese *in vitro* Untersuchungen lassen eine carboxyterminale Proteolyse von ApoA-I als Schrittmacher des *in vivo* ApoA-I Katabolismus vermuten. Vorläufige Ergebnisse eines 26 kDa Fragmentes von humanem ApoA-I mit intakter aminoterminaler Domäne ergaben einen beschleunigten *in vivo* Katabolismus [97]. Kunitake *et al.* berichteten über das Auftreten eines 26 kDa und eines 14 kDa Fragmentes isoliert aus humaner prä β -HDL [93]. Die Fragmentation konnte mittels Protease-Inhibitoren limitiert werden. Die aminoterminal Sequenz der beiden isolierten Fragmente war intakt. Diese Beobachtungen weisen auf eine carboxyterminale *in vivo* Proteolyse von ApoA-I hin.

1.4 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, ApoA-I als reifes Wildtypprotein und als Mutante mit einer aminoterminalen FLAG-Sequenz rekombinant in Sf9-Zellen mittels des Baculovirussystem zu exprimieren. Nach Anreicherung und Charakterisierung der exprimierten Proteine sollten Versuche zur Proteolyse von ApoA-I *in vitro* und, wenn möglich, *in vivo* folgen. Dabei sollen entstehende Proteinfragmente isoliert und in Bezug auf Masse und Proteinsequenz untersucht werden. Parallel zu den Versuchen mit exprimiertem Protein sollten transgene, humanes ApoA-I exprimierende Kaninchen hinsichtlich des Degradationsortes von ApoA-I untersucht werden.

2 Methoden

2.1 Zellkultur der Insektenzelllinie Sf9

nach [98].

2.1.1 Kultur der Zellen

1977 berichteten Vaughn *et al.* über die Etablierung zweier Insekten-Zelllinien aus Ovariengewebe der Larven von *Spodoptera frugiperda*. Diese gehören zur Ordnung der Lepidoptera (Schuppenflügler) [99]. Heute werden meistens zwei für die Baculovirusinfektion sehr empfängliche Zelllinien verwendet, die Linien Sf9 und Sf21.

Sf9-Zellen wurden in einem Kulturschrank bei 27°C ohne Zusatz von CO₂ oder einer wassergesättigten Atmosphäre kultiviert. Dem Kulturmedium (Grace's Insektenmedium, Gibco BRL Life Technologies, Berlin, Deutschland) wurde 10% FCS (Gibco BRL Life Technologies, Berlin, Deutschland) zugesetzt. Alternativ konnten die Zellen in FCS-freiem Medium (SF900II, Gibco BRL Life Technologies, Berlin, Deutschland) ohne weiteren Zusatz von FCS kultiviert werden, dabei zeigen sie jedoch ein langsames Wachstum. Als Antibiotika wurden 100 µg/ml Streptomycin und 100U/ml Penicillin (Gibco BRL Life Technologies, Berlin, Deutschland) zugesetzt. Die Verdopplungszeit vitaler Zellen betrug 18-24 Stunden. Die Passagierung der Zellen erfolgte nach Erreichen der Konfluenz. Dabei wurden die Zellen durch mehrfaches Überspülen mit Medium vom Boden der Kulturflasche gelöst und, ohne weitere Trypsinierung, 5 ml der Zellsuspension in 20 ml neuem Kulturmedium in 100 ml Kulturflaschen ausgesät.

Um Zellen zu pelletieren, wurde die Zellsuspension 2 Minuten bei 1.000xg zentrifugiert und in dem gewünschten Volumen resuspendiert.

2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension wurden die Zellen nach Trypan-Blau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop (Olympus CK2, Hamburg, Deutschland) ausgezählt.

Ansatz:

80 µl Zellsuspension
20 µl Trypanblau
mischen und in Zählkammer geben

Trypan-Blau-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland):

0,4% Trypan-Blau
in 0,81% NaCl und 0,06% K₂HPO₄

Jeweils 4 der äußeren großen Quadrate wurden ausgezählt und der Mittelwert bestimmt.

Berechnung:

1 Quadrat einer Zählkammer enthält ein Volumen von 0,1 μ l
⇒ Zellzahl in 0,1 μ l
x Verdünnung 1,25
x 10.000 ⇒ Zellzahl /ml

2.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Einfrieren

Die Zellen wurden bei 1.000xg sedimentiert und das Pellet auf Eis in der Einfrierlösung (90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert. Die Zelldichte sollte mindestens $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml betragen. Die Suspension wurde in vorgekühlte Kryoröhrchen übertragen und langsam bei -20°C für eine Stunde eingefroren und dann bei -70°C tiefgefroren. Anschließend wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen:

Die gefrorenen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C rasch aufgetaut und nach Zugabe von 20 ml Kulturmedium 10 Minuten bei 600xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Grace's-Insektenmedium/10% FCS resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

2.1.4 Titerbestimmung und Amplifikation des rekombinanten Baculovirus

Baculoviren gehören zu einer Gruppe von großen, doppelsträngigen DNA-Viren, die viele unterschiedliche Insekten als natürliche Wirte infizieren. Der am intensivsten untersuchte Baculovirus-Stamm ist der *Autographa californica* nuclear Polyhedrosis virus (AcNPV). Infektiöse Virus-Partikel gelangen über vereinfachte Endozytose oder Fusion in die Insektenzelle und die virale DNA wird in den Zellkern transportiert, wo die DNA-Replikation startet.

2.1.4.1 Plaque-Assay

In Petrischalen (10 cm) wurden $7 \cdot 10^6$ Sf9-Zellen ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen wurden die Zellen mit 100 μ l einer Virusverdünnung (10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5}) infiziert. Nach einer Infektionszeit von 1 Stunde bei 27°C wurden die Zellen mit SeaKem-Agarose in einer finalen Konzentration von 0,8-1% überschichtet. Dazu wurde eine 2%ige Agarose-Lösung hergestellt, auf 45°C abkühlen lassen und mit dem gleichen Volumen vorgewärmten Grace's-Medium/10% FCS gemischt. Der Überstand der infizierten Zellen wurde entfernt und die Zellen mit 10 ml der Agaroselösung überschichtet. Die Platten wurden 6 Tage bei 27°C inkubiert und dann unter dem Mikroskop auf Plaques untersucht. Durch Auszählen der Plaques konnte der Titer des Virus bestimmt werden. Anschließend wurde das rekombinante Virus je nach Titer amplifiziert.

2.1.4.2 Endpunktverdünnungsassay

In eine 12-Lochplatte wurden $2 \cdot 10^4$ Sf9-Zellen ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen an die Platte wurden die Zellen mit 100 μ l, 10 μ l, 1 μ l und 0 μ l des zu untersuchenden Virus-Überstandes infiziert und 3 Tage bei 27°C inkubiert. Wenn nur die Zellen der 100 μ l- und der 10 μ l-Probe Anzeichen einer Infektion zeigten, war der Titer der Virus-Lösung gering und das Virus mußte weiter amplifiziert werden, bevor es für Protein-Expression genutzt werden konnte.

2.1.4.3 Virus-Amplifikation

In einer Zellkulturflasche wurden $2 \cdot 10^7$ Zellen ausgesät. Die Zellen wurden anschließend mit dem rekombinanten Virus infiziert, so daß das Verhältnis Viruspartikel zu Zellen kleiner als 1 war. Nach 3 Tagen Inkubationszeit wurde der Überstand nach Zentrifugation geerntet und im Dunkeln bei 4°C gelagert. Um einen hohen Virus-Titer ($3 \cdot 10^8$) zu erhalten, wurde die Amplifikation 2 bis 3 mal wiederholt.

2.1.5 Infektion der Zellen mit dem rekombinanten Baculovirus und Proteinernte

Die Zellen wurden in einer Dichte von $7 \cdot 10^5$ Zellen/ml in frischem Kulturmedium ausgesät und mit dem rekombinanten Baculovirus infiziert. Dabei wurden so viele Viruspartikel eines High-Titer-Stocks zugegeben, daß das Verhältnis Viruspartikel zu Zellzahl zwischen 5 und 10 lag.

Die Zellen wurden 64 Stunden bei 27°C inkubiert, bevor das Protein geerntet werden konnte. Dazu wurden die Zellen in der Kühlzentrifuge (Rotor GH 3.8, Beckmann, München) bei 2.500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde zwei mal mit PBS gewaschen, um Verunreinigungen des rekombinanten Proteins durch das im FCS vorhandene Apolipoprotein A-I zu verhindern.

Um die Zellen zu lysieren, wurde das Zellpellet bei -20°C eingefroren. Gegebenenfalls wurde, je nach Verwendungszweck, Proteaseinhibitor zugegeben. Das entstehende Zell-Lysat konnte direkt für analytische und präparative Zwecke genutzt oder bei -80°C gelagert werden.

2.2 Quantitative Methoden

2.2.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Gesamtproteinmenge wurde mit einer modifizierten Methode nach Lowry, mit BSA als Standard, bestimmt [100].

Lösung 1:

2% Na_2CO_3 in 0,1M NaOH
(500 ml 0,1M NaOH + 10g Na_2CO_3)

Lösung 2:

0,5 % CuSO₄ in 0,1 % Na-tatrat
 (Lösung muß vor Gebrauch frisch hergestellt werden.
 Dazu 1% CuSO₄ und 0,2% Na-tatrat 1:1 mischen.)

Lösung 3:

Lösung 1 + 2 50/1 mischen

Lösung 4:

Folin-Ciocalteu-Reagenz (gebrauchsfertig)
 Reagenz 0,1% NaOH dH₂O
 50 : 50 : 6

Lösung 5:

BSA -Standard Lösung 1mg/ml

	Std.1 0µg	Std.2 50µg	Std.3 100µg	Std.4 200µg	Std.5 300µg	Std.6 400µg	Proben
BSA	0 µl	50 µl	100 µl	200µl	300 µl	400 µl	50-200 µl
Triton 1%	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
SDS 10%	800 µl	750 µl	700 µl	600 µl	500µl	400 µl	600-750 µl
Lösung 3	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
		gut mischen, 10 min		inkubieren			
Folin-Reagenz	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
		gut mischen, 30 min		inkubieren			

Die Messung der Proben erfolgte bei 545 nm am Photometer (U-2000 Spectrophotometer, Hitachi, Düsseldorf, Deutschland). Von allen Proben und Standards wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

(Protein-Assay der Firma BioRad, München, Deutschland)

Standard Assay (20-140 µg Protein oder Proteinlösung mit 200-1400 µg/ml)

Standardkurve:

Verdünnungsreihe von 0,2 -1,4 mg/ml Protein

BSA-Stammlösung: 4 mg/ml

Verdünnung	BSA-Konzentration in mg/ml	Ansatz
1:20	0,2	50µl + 950µl
1:10	0,4	100µl + 900µl
1:6,6	0,6	150µl + 850µl
1:5	0,8	200µl + 800µl
1:4	1,0	250µl + 750µl
1:3,3	1,2	300µl + 700µl

Ansatz:

1. 0,1 ml Standard bzw. Probe
oder 0,1 ml Puffer als Blindwert
2. 5 ml Reagenz (1:5 Verd.)
3. Mischen (vortexen), 5 min warten
4. Messung der Extinktion bei 595 nm

Microassay (1-20 µg Protein oder Proteinlösung mit < 25 µg/ml)

Standardkurve:

Verdünnungsreihe von 1-25 µg/ml Protein

BSA-Stammlösung: 0,1 mg/ml

Verdünnung	BSA-Konzentration µg/ml	Ansatz
1:100	1	10µl + 990µl
1:20	5	50µl + 950µl
1:10	10	100µl + 900µl
1:6,6	15	150µl + 850µl
1:5	20	200µl + 800µl
1:4	25	250µl + 750µl

Ansatz:

1. 0,8 ml Standard bzw. Probe
oder 0,8 ml Puffer als Blindwert
2. 0,2 ml Reagenz unverdünnt
3. Mischen (vortexen), 5 min bis 1 Std. warten
4. Messung der Extinktion bei 595 nm

2.2.3 Nephelometrische Quantifizierung von Proteinen

(Automatisierte Standardmethoden; gemessen am BN 100 (Behring-Werke, Marburg, Deutschland))

Nephelometrische Bestimmungen beruhen auf der Messung von Lichtstreuung an Molekülkomplexen in wässriger Lösung. Unter optimierten Bedingungen ist die Streuung von eingestrahltm Licht der Konzentration dieser Molekülkomplexe proportional.

Bereits 1871 stellte J.W. Rayleigh seine Theorie zur Streuung von Licht an Partikeln auf. Danach werden Partikel durch einfallendes Licht zu oszillierenden Dipolen angeregt, die ihrerseits Licht emittieren [101].

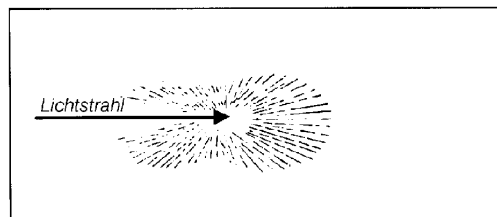


Abbildung 5: Rayleigh-Streuung des Lichtes an einem Partikel.

Ist das Partikelchen größer als $\frac{1}{20}$ der einfallenden Wellenlänge, so ist die Streustrahlung nicht mehr symmetrisch um das Teilchen verteilt, sondern wird asymmetrisch. Dabei wird mit zunehmender Partikelgröße mehr Licht in Vorwärtsrichtung ausgestrahlt (Rayleigh-Debye-, Mie-Streuung).

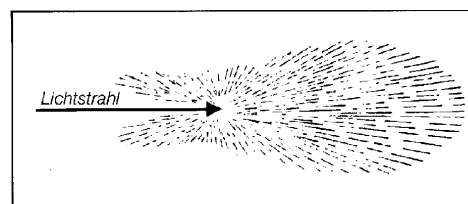


Abbildung 6: Mie-Streuung des Lichtes an einem Partikel.

Bei der nephelometrischen Bestimmung von Proteinen werden durch Zugabe entsprechender Antiseren Immunkomplexe erzeugt. Die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper ist reversibel, die Größe der Partikel variiert mit dem Verhältnis zwischen Antigen und Antikörper. Zur Messung des Streulichts an diesen Partikeln wird am besten in verdünnten Lösungen gearbeitet, da hier Reflexion und Selbstadsorption am geringsten sind. Der Antikörper wird immer im Überschuß zugesetzt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen werden Antigen und Antikörper in einer Küvette gemischt und in einen Meßstrahl (840 nm) gebracht. Das Streulicht wird in einem Raumwinkel von 13 bis 24° unter Ausblendung des Primärstrahls mit einem Detektor gemessen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Anhand von Referenzkurven werden daraus die Proteinkonzentrationen berechnet.

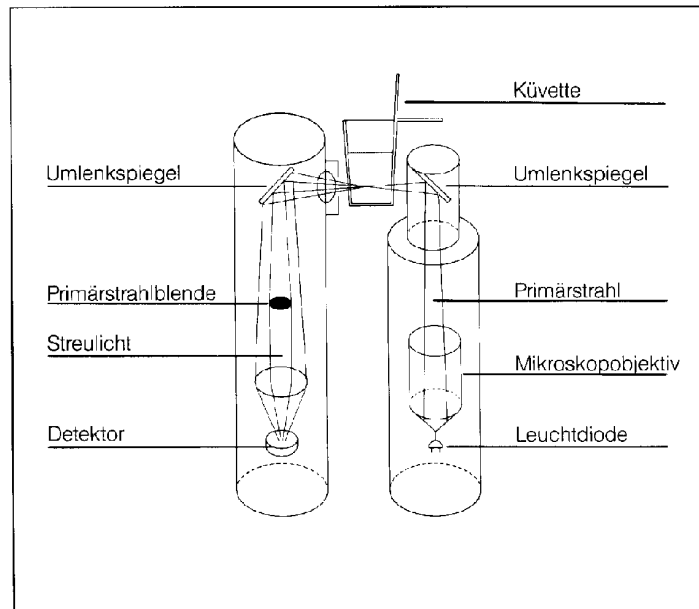


Abbildung 7: Optischer Strahlengang im Nephelometer.

Reaktionspuffer:

11,6 g/l Polyethylenglycol
11,6 g/l NaCl
0,05 M Phosphatpuffer
< 1 g/l NaN₃

Diluens:

Phosphat-Buffered-Saline
< 1 g/l NaN₃

Antiseren:

- Antiseren; spezifisch gegen humane Apolipoproteine gewonnen aus Kaninchen.
- Zur Gesamtproteinbestimmung wurde Trichloressigsäure (TCA, 20%ig) als Fällungsreagenz verwendet.

Standard:

Apolipoprotein- bzw. Protein-Standard der Behring-Werke

Die Beziehung zwischen Antigenmenge und Meßsignal bei konstanter Antikörperkonzentration wird durch die HEIDELBERGER-KENDALL-Kurve dargestellt.

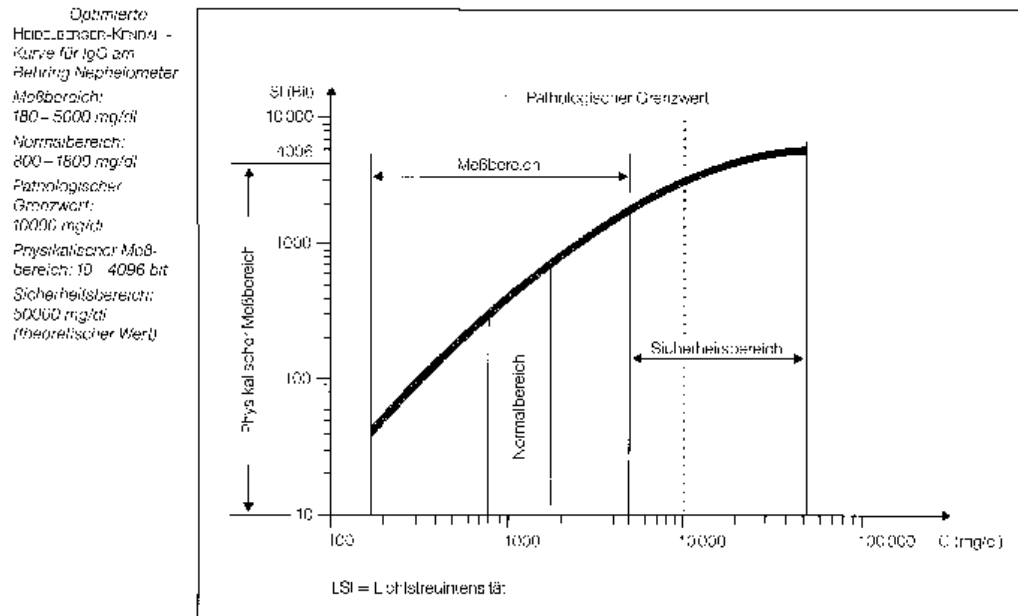


Abbildung 8: Heidelberg-Kendall-Kurve.

Die Aufnahme der Meßwerte erfolgt über die *Fixed-Time Methode*, die sich aus der Differenzbildung zweier zeitlich versetzt gewonnener Meßwerte zusammensetzt. Nach Pipettierung aller Reaktionspartner in die Meßküvette wird der erste Meßwert (Gesamtblindwert) nach ca. 10 Sekunden (t_1) ermittelt. Der zweite Meßwert wird nach einer Inkubationszeit von 6-18 Minuten (t_2) erfaßt.

Die Auswertung der Daten erfolgt über separat anhand von Standards erstellten Referenzkurven. Die Referenzkurven werden nach der *Logit-Log-Funktion* und der linearen Regression ermittelt. Die Referenzkurve gibt den Zusammenhang zwischen gemessener Streulichtintensität Y und den verdünnten Standardkonzentrationen C antiserumspezifisch wieder. Es wird eine doppeltlogarithmische Darstellung gewählt. Der Kurvenverlauf wird durch die Logit-Log-Funktion beschrieben. Diese Funktion hat einen mathematisch stetigen Verlauf. Es gilt:

$$\ln \frac{Y - Y_0}{Y_{\max} - Y} = a \ln(C) + b$$

Aufarbeitung: Suspension 5 min bei 12.500 x g zentrifugieren
Überstand abnehmen
Waschen mit 0,2 ml Aceton (eiskalt)
5 min 12.500 x g zentrifugieren
Überstand möglichst vollständig entfernen
Pellet trocknen

Das Pellet kann für nachfolgende Untersuchungen in dem entsprechenden Puffer aufgenommen werden.

2.3.2 *Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAAGE)*

Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte in denaturierenden Polyacrylamidgelen.

Lösungen:

Lösung A: 3 M Tris-Base, pH 8,5

Lösung C: 28,38% Acrylamid (w/v)
1,62% Bisacrylamid (w/v)

Lösung D: 1 M Tris-HCl, pH 7,0
0,8% SDS (w/v)

SDS-Lösung: 20% SDS (w/v)

Ammoniumpersulfatlösung:

10% Ammoniumpersulfat (w/v)

Laufpuffer: 25 mM Tris-Base
160 mM Glycin
1% SDS (w/v)

Probenpuffer (einfach, nach Novex, San Diego, USA):

63 mM Tris/HCl, pH 6,8
10% Glyzerin (w/v)
2% SDS (w/v)
0,0025% Bromphenolblau (w/v)
Vor Gebrauch wurden noch 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol zugesetzt.

Für ein Polyacrylamid-Gel (40 ml) wurden die Lösungen je nach der gewünschten Polyacrylamidkonzentration (in %) folgendermaßen gemischt:

	10%	12%	15%
Lösung A	5 ml	5 ml	5 ml
Lösung C	14,4 ml	17,3 ml	21,6 ml
SDS 20 %	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
bidest. H ₂ O	20,3 ml	17,4 ml	13,1 ml
TEMED	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
Ammoniumpersulfat	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

Nach dem Polymerisationsstart mit TEMED und Ammoniumpersulfat wurde die Lösung zügig zwischen die zusammengebauten Gelplatten gegossen und die Lösung mit bidest. Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels konnte das 3,5%ige Sammelgel gegossen werden.

	3,5 %
Lösung D	2 ml
Lösung C	2 ml
Laufpuffer	12 ml
TEMED	0,015 ml
Ammoniumpersulfat	0,2 ml

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und für 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 bis 40 mA pro Gel (Minigele). Als Molekulargewichtsstandard wurde ein Markergemisch der Firma BioRad verwendet.

2.3.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für ein 16 cm x 16 cm Gel wurden 12,5 ml einer Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30%:0,8%) mit 24 g Harnstoff versetzt und 25 ml bidest. H₂O zugegeben. Nachdem sich der Harnstoff gelöst hatte, wurden für die Charakterisierung der Proteine 2 ml Ampholyte mit einem pH-Bereich von pH 4-6 und 1 ml mit einem pH-Bereich von pH 5-7 zugegeben. Nach Auffüllen des Volumens auf 50 ml wurde die Polymerisation mit 50 µl TEMED und 120 µl Ammoniumpersulfat (20%) gestartet und die Gellösung in die Kammer gegossen.

Das Protein der Probe wurde mit der Acetonfällung ausgefällt. Anschließend wurde die Probe in 100 µl IEF-Probenpuffer aufgenommen, gevortext und aufgetragen. Die Stromstärke wurde pro Gel auf 10 mA bei 250 V und 250 W eingestellt und die Elektrophorese gestoppt, wenn die Stromstärke auf weniger als 1,5 mA pro Gel abgefallen war. Das Gel wurde anschließend wahlweise in Coomassie angefärbt oder geblottet.

IEF-Probenpuffer:

0,1 M Tris, pH 9,0
6 M Harnstoff
1% Na-Dodecylsulfat (w/v)
5% 2-Mercaptoethanol (v/v)
0,8% Glyzerin (75%ig) (v/v)

Kathodenpuffer:

0,02 M NaOH

Anodenpuffer:

0,01 M H₃PO₄

2.3.4 Färbung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau

Die Proteingele wurden nach der Elektrophorese mit Coomassie-Blau angefärbt, indem sie 15 Minuten in die Färbelösung gelegt wurden. Anschließend wurde mit Entfärber so lange entfärbt bis die Banden sichtbar wurden. Dabei wurde die Entfärbelösung mehrfach gewechselt.

Färbelösung:

0,63 g Coomassie Brilliant Blue R 250
23 ml Essigsäure (99%ig)
114 ml Ethanol (96%ig)
114 ml bidest. Wasser

Entfärber:

10% Methanol (v/v)
20% Essigsäure (v/v)

Die Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung lag bei einem µg Protein.

2.3.5 Färbung der Proteinbanden mit der Silberfärbung

Zum empfindlichen Nachweis von Proteinbanden in Polyacrylamid-Gelen wurde eine Silberfärbung verwendet (Silberfärbekit, Novex, San Diego, USA). Die Nachweisgrenze für Proteine liegt bei dieser Färbung bei 0,8 ng (1mm Gel).

Fixierung (10 min):

90 ml Ultra Pure H₂O
100 ml Methanol
20 ml Essigsäure

Sensitizing (30 min):

105 ml Ultra Pure H₂O
100 ml Methanol
5 ml Sensitizer (Glutaraldehyd)

Waschen:

2 mal 5 min mit 200 ml Ultra Pure H₂O

Färben (15 min):

5 ml Stainer A (Silbernitrat)
5 ml Stainer B (Ammoniumhydroxid)
90 ml Ultra Pure H₂O

Waschen:

2 mal 5 min mit 200 ml Ultra Pure H₂O

Entwickeln:

5 ml Entwickler (Formaldehyd)
95 ml Ultra Pure H₂O

Stoppen:

5 ml Stopplösung (Zitronensäure)

Waschen:

3 mal 5 min mit 200 ml Ultra Pure H₂O

2.3.6 Westernblot und Immunfärbung

Die Proteinbanden der SDS-Polyacrylamid-Gele wurden im Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm, BioRad, München, Deutschland) geblottet.

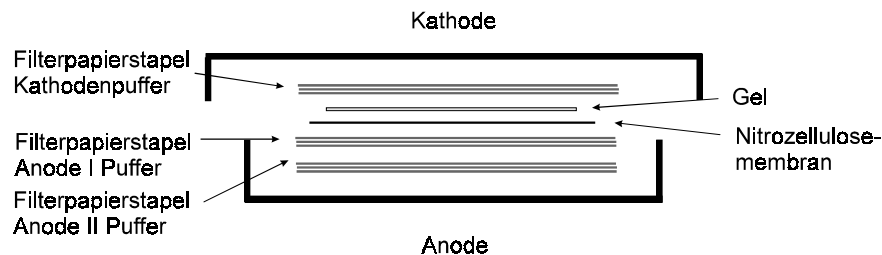


Abbildung 11: Semi-Dry-Blotverfahren.

Dazu wurde das Elektrophorese-Gel 20 min im Kathodenpuffer equilibriert, die Nitrozellulose im Anode I Puffer. Anschließend wurde der Blot gemäß Abbildung 11 zusammengebaut und für 40 min bei 25 V und 50 mA (konst.) geblottet.

Kathodenpuffer:

25 mM Tris-Base
40 mM 6-Aminohexansäure
20% Methanol

Anode-I-Puffer:

30 mM Tris-Base
20% Methanol

Anode-II-Puffer:

300 mM Tris-Base
20% Methanol

Danach wurde die Membran mit 3% BSA in PBS für eine Stunde blockiert. Für die Detektion des humanen Apolipoproteins A-I diente ein spezifischer primärer Antikörper (Goat-anti-human-ApoA-I, eigene Herstellung). Als Zweitantikörper diente ein entsprechender Biotin-markierter, affinitätsgereinigter Antikörper (biotinylierter Rabbit-anti-Goat Ig(H+L), Dianova). Nach Inkubation mit biotinyliertem Streptavidin-Peroxidase-Komplex aus Meerrettich (Amersham) wurde der Blot mit 4-Chloro-1-Naphthol und H₂O₂ in PBS gefärbt.

Inkubationen:

- Blocken mind. 1 Stunde oder über Nacht in 3% BSA in PBS
- Primärantikörper Goat-anti human ApoA-I 1:1000 in 3% BSA in PBS, 1 Stunde
- Sekundärantikörper Rabbit-anti-goat Ig(H+L) (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) 1:2000 in PBS, 1 Stunde
- Biotinylierter Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Amersham, Buckinghamshire, UK) 1:3000 in PBS, 40 Min.
- Färbung mit 4-Chloro-1-Naphthol (30 mg in 10 ml Methanol, mischen mit 50 ml PBS, 100µl H₂O₂ 30%ig)

2.3.7 Elektroelution

Nach erfolgter SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde ein Teil des Gels angefärbt. Anhand dieser Referenzbanden wurden die entsprechenden Proteinbanden identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten.

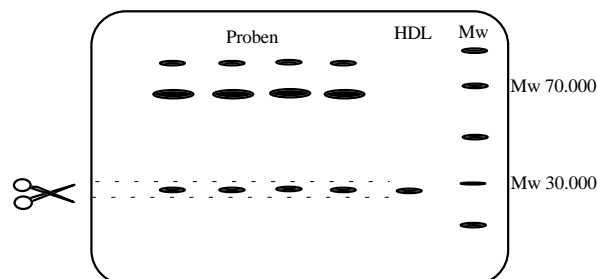


Abbildung 12: Prinzip der präparativen Elektroelution.

Zur Elektroelution wurden die ausgeschnittenen Gelbanden zerkleinert und in die Röhrcchen der Elektroelutionskammer überführt (BioRad, München, Deutschland). Der Boden dieser Röhrcchen wurde mit einer Dialysemembran mit einer molekularen

Ausschlußgröße von 3,5 kDa verschlossen. Die Kammer wurde mit 50 mM NH_4HCO_3 gefüllt und die Proteine für 4 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 10-15 mA pro Röhrchen bei 4°C elektroeluiert. Anschließend wurden alle Eluate lyophilisiert und bei -80°C tiefgefroren.

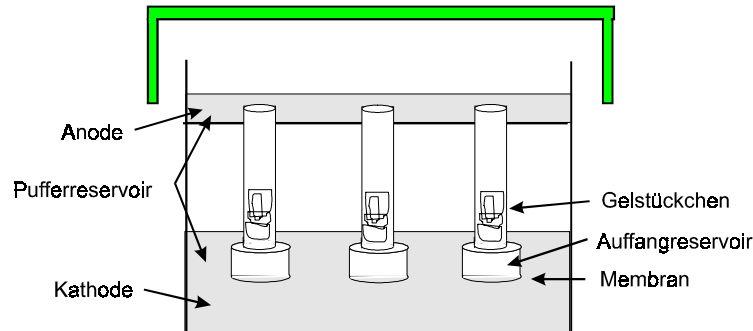


Abbildung 13: Prinzip einer Elektroelutionskammer.

2.3.8 Affinitätschromatographie

Als Affinitätschromatographie bezeichnet man das Binden und Chromatographieren von biologischen Makromolekülen an einer für ein Molekül oder Molekülklasse spezifischen Matrix, deren Spezifität durch einen kovalent gebundenen Liganden erreicht wird. Die Desorption von dieser Matrix kann durch Veränderung der Elutionsbedingungen (Ionenstärke, pH-Wert), aber auch durch Verdrängung durch andere Liganden erfolgen.

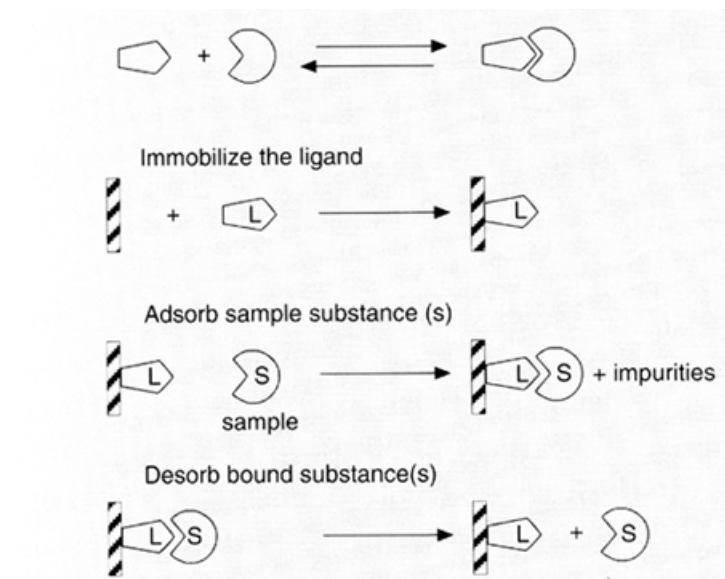


Abbildung 14: Prinzip der Affinitätschromatographie.

Für die Affinitätschromatographie des FLAG-Proteins wurde eine Affinitätssäule verwendet, bei der monoklonaler, gereinigter, muriner IgG₁-Antikörper kovalent mit Agarose verknüpft ist (Eastman Kodak Company, New Haven, USA). Nach Probenaufgabe wurde dreimal mit 12 ml TBS-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen. Für die Elution wurden 6 x 1 ml einer 0,1 M Glycinlösung (pH 3,5) auf die Säule aufgetragen und 1 ml-Fractionen aufgefangen. Zur sofortigen

Neutralisation des eluierten Proteins wurde in die Elutionsgefäße 20 µl einer 1 M Trislösung (pH 8,0) vorgelegt.

2.3.9 Reversed Phase Chromatographie

Die Reversed Phase Chromatographie macht sich die unterschiedliche Hydrophobizität der Moleküle zunutze.

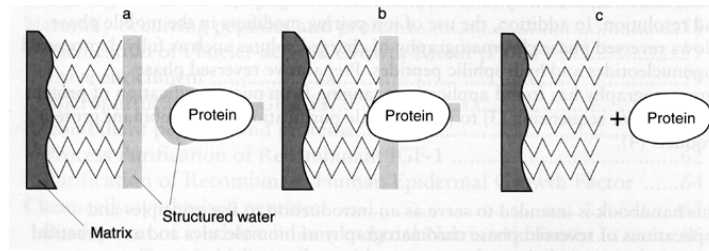


Abbildung 15: Prinzip der Reversed Phase Chromatographie.

Die SOURCE 15RPC (Pharmacia, Uppsala, Schweden) Reversed Phase Chromatographie Säule (2 x 9,4 cm) wurde in 10% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure equilibriert [102]. 1-2 ml konzentrierter Zellkulturüberstand wurde auf einen Gehalt von 10 % Acetonitril, 0,1% TFA eingestellt und auf die Säule geladen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 10 - 60% Puffer B (95% Acetonitril, 0,1% TCA).

2.4 Isolation von humanem Apolipoprotein A-I aus Serum

Ein Standardverfahren zur Isolation der Lipoproteine aus Serum ist die fraktionierte Ultrazentrifugation [103]. Durch Einstellen der entsprechenden Dichtebereiche mit NaBr bzw. KBr können die jeweiligen Lipoproteine in der Ultrazentrifuge zum flotieren gebracht werden, d.h. sie schwimmen oben auf der Lösung auf, während sich die schwereren Bestandteile im unteren Teil des Zentrifugationsröhrchens sammeln. Durch Schneiden der Röhrchen können die Fraktionen getrennt, und durch erneutes Einstellen einer Dichte kann eine weitere Auftrennung der Lipoproteine erreicht werden.

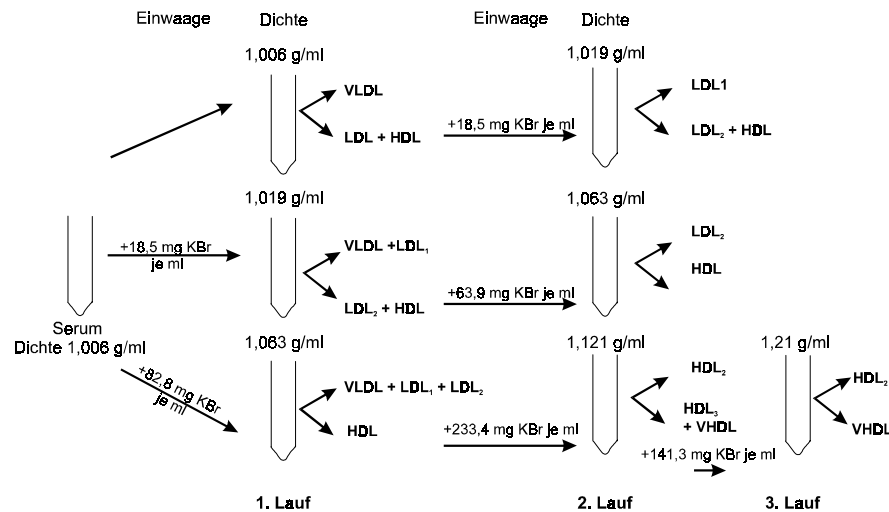


Abbildung 16: Allgemeines Schema zur Isolation der Lipoproteine mittels fraktionierter Ultrazentrifugation.

Für die Isolation des humanen Apolipoprotein A-I aus Serum wurde normolipämischen Patienten mit einer Monovette (Braun, Melsungen) Blut abgenommen und nach Gerinnung bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert (Digifuge GL, Heraeus). Das Serum wurde anschließend abpipettiert, mit Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,063 g/ml eingestellt und in Beckmann-Zentrifugenröhrchen (12,5 ml, Ultraclear) gegeben. Zur Entfernung von Luftblasen wurde mit KBr-Dichtelösung 1,063 g/ml aufgefüllt. Anschließend wurde im 65-Ti-Rotor für 24 Stunden bei 50.000 rpm zentrifugiert (Beckmann Model L5-65 Ultrazentrifuge, Beckmann, München, Deutschland). Unter diesen Bedingungen flotieren die im Serum ebenfalls enthaltenen VLDL und LDL und können abgetrennt werden. Dazu wurden die Zentrifugenröhrchen etwa 3 cm unterhalb des oberen Randes durchgeschnitten. Die untere Fraktion wurde mit festem Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,210 g/ml eingestellt und in neue Zentrifugenröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden wieder mit einer KBr-Dichtelösung der gleichen Dichte aufgefüllt, verschlossen und 48 Stunden im 65-Ti-Rotor bei 50.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Röhrchen etwa 3 cm unterhalb des oberen Randes geschnitten und die flotierte HDL-Fraktion abpipettiert. Zur Entfernung des KBr wurde diese Fraktion anschließend gegen 50 mM Ammoniumbicarbonat dialysiert, für spätere Anwendungen aliquotiert und eingefroren oder lyophilisiert.

2.5 Stoffwechselkinetische Untersuchungen

2.5.1 Kaninchen

Der Lipidstoffwechsel der Kaninchen ist dem des Menschen recht ähnlich. Aus diesem Grund eignet sich das Kaninchen als Modell für den humanen Lipidstoffwechsel [104-107]. Der Dichtebereich der Kaninchen-HDL-Fraktion wird analog dem des Menschen definiert. (HDL₂, $d = 1,063-1,125 \text{ g/ml}$ und HDL₃, $d = 1,125-1,210 \text{ g/ml}$).

3-6 Monate alte New Zealand White Kaninchen (NZW) wurden von Hagemann (Extetal, Deutschland) und Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

2.5.2 Kaninchenhaltung

Außerhalb der Untersuchungen wurden die Kaninchen im zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover gehalten und von den dortigen Tierpflegern versorgt.

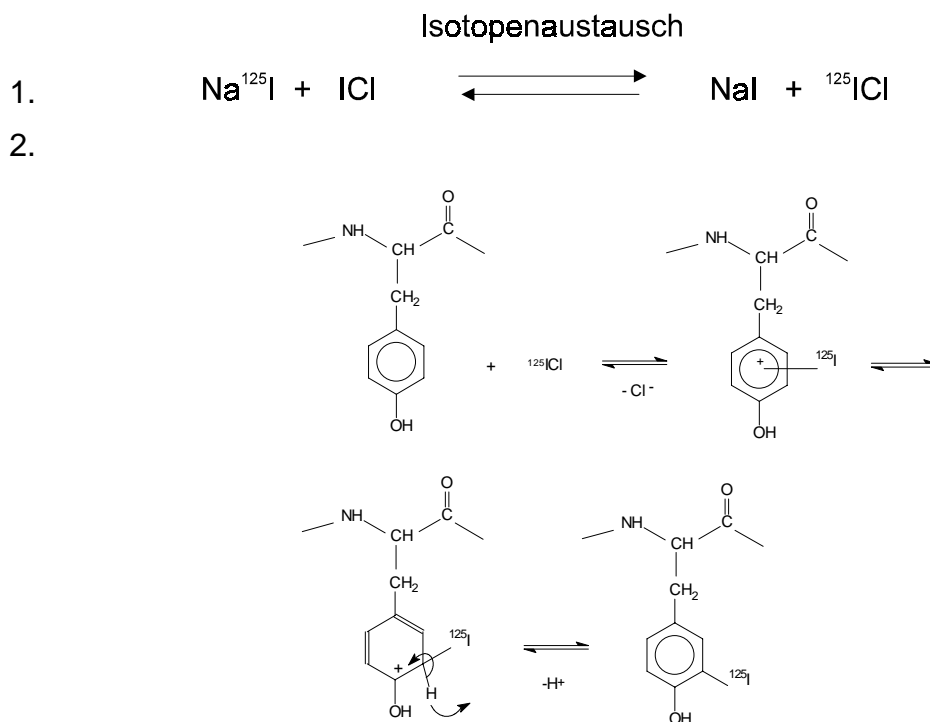
Während der Untersuchungen wurden die Kaninchen in der Nuklearmedizin der MHH in speziellen Stoffwechsellkäfigen gehalten. Diese Käfige ermöglichten die gesonderte Sammlung von Urin und Kot. Die Nahrungszufuhr erfolgte über automatische Futter- und Wasserspender.

2.5.3 Radioiodmarkierung von Apolipoprotein A-I

2.5.3.1 Iod-Monochlorid-Methode

Für Radioiodmarkierungen wurden die beiden Isotope ^{125}I ($t_{1/2}$: 60 Tage, γ -Strahler) sowie ^{131}I ($t_{1/2}$: 8 Tage, γ - und β^- -Strahler) verwendet.

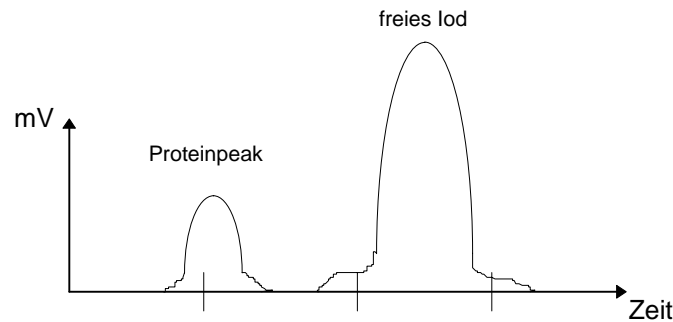
Für die Markierung wird folgender Reaktionsmechanismus angenommen: Im ersten Schritt erfolgt ein schneller Isotopenaustausch zwischen $\text{Na}^{125/131}\text{I}$ und Iodmonochlorid (ICI). Im zweiten Schritt greift das positiv polarisierte Iod aus dem ICI den Benzolring der Aminosäure Thyrosin des Proteins nach dem Mechanismus einer elektrophilen aromatischen Substitution an. Die Substitution erfolgt dabei in o-Stellung zur Hydroxylgruppe des Thyrosins.



Zur Iodierung der Apolipoproteine wurden Na^{125}I bzw. Na^{131}I mit einer Aktivität von ca. 2,7 mCi (100 MBq) eingesetzt. 100 μg lyophilisiertes Apolipoprotein wurde in 100 μl Guanidin-Puffer gelöst (6 M Guanidinhydrochlorid, 1 M Glycin, pH 8,5) und mit der entsprechenden Menge Na^{125}I bzw. Na^{131}I versetzt. Zu dieser Mischung wurde

Iodmonochlorid gegeben. Das molare Verhältnis von Protein zu ICI sollte dabei 1:2 betragen. Der Ansatz wurde gut gemischt und dann 10-15 min inkubiert.

Zur Trennung von radiomarkiertem Protein und verbliebenem freien Iod wurde das Reaktionsgemisch über eine Sephadex G-25 Gelfiltrations-Säule (1x15 cm) chromatographiert. Um die unspezifische Bindung von Protein an das Sephadexmaterial zu minimieren wurde die Säule zuvor mit Kaninchenserum equilibriert. Als Elutionspuffer diente PBS. Ein Monitor erfaßte die Energie der einzelnen Säulenfraktionen.



Die Effizienz der Markierung wurde dünn-schichtchromatographisch überprüft (Gelman ITLC SG, PBS-Puffer, 1 µl Probe, 7,5 cm Laufstrecke).

2.5.4 Isolation der HDL-Fraktion

2.5.4.1 Superose 6

Ein weiteres Verfahren zur Isolation der HDL-Fraktion war die Auftrennung der Seren über eine Superose 6-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Dazu wurden 0,8 ml Markierungslösung mit 0,2 ml Kaninchenserum gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Diese Mischung wurde auf die Säule gegeben und mit isotonischer Kochsalzlösung bei einer Flußrate von 0,2 ml/min eluiert und 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden mit einem Gamma-Counter (Compu-Gamma, Pharmacia) auf ihre Aktivität hin untersucht. Die HDL enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, sterilfiltriert und zur Injektion verwendet.

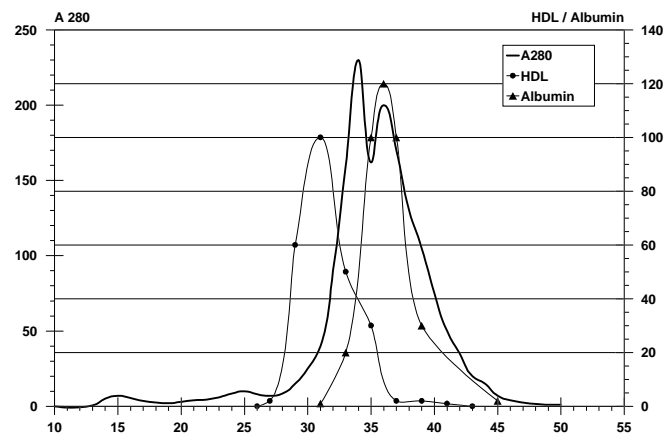


Abbildung 17: Elutionsprofil einer Superose 6-Säule, Abtrennung der HDL-Fraktion aus Kaninchenserum.

2.5.5 Stoffwechselkinetische Untersuchungen

Sobald wie möglich nach der Radiomarkierung der Proteine mit ^{125}I bzw. ^{131}I wurden diese den Kaninchen über die Ohrvene injiziert. Dabei wurde von jedem Protein eine Aktivität von ca. 15-20 μCi eingesetzt.

Zu den Zeitpunkten 5 min, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 und 120 Stunden nach Injektion wurde den Kaninchen über die Ohrarterie ca. 2 ml Blut abgenommen, zentrifugiert und das Serum aufbewahrt.

In 500 μl Aliquots dieser Seren wurden anschließend im Gamma-Counter (Compu-Gamma, Pharmacia) die Aktivität bestimmt. Während der Kinetik wurde der Urin der Kaninchen ebenfalls gesammelt, aliquotiert und die Aktivität ermittelt. Die während der Kinetik erhaltenen Seren wurden mittels FPLC-Analyse und Dichtegradienten-Ultrazentrifugation bezüglich ihrer Aktivitätsverteilung untersucht.

2.5.6 FPLC-Analyse

0,2-0,5 ml Serum wurden auf eine Superose 6-Säule (1x30 cm, Pharmacia, Uppsala, Schweden) gegeben und mit PBS-Puffer, 1mM EDTA, 0,1% NaN_3 eluiert. 0,5 ml Fraktionen wurden gesammelt und die Aktivität bestimmt.

2.5.7 Dichtegradienten-Ultrazentrifugations-Analyse

Bei der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation wird das Serum in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und mit verschiedenen Dichtelösungen überschichtet. Während der Zentrifugation bildet sich ein Dichtegradient aus und die verschiedenen Lipoproteine reichern sich in dem ihrer eigene Dichte entsprechenden Bereich an.

	Dichte (g/ml)				
	1,006	1,019	1,063	1,210	12386
NaBr (g)	4,5	13,51	42,46	141,7	262,4
10% EDTA (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Finales Volumen (ml)	500	500	500	500	500

Tabelle 3: Zusammensetzung der verschiedenen Dichtelösungen.

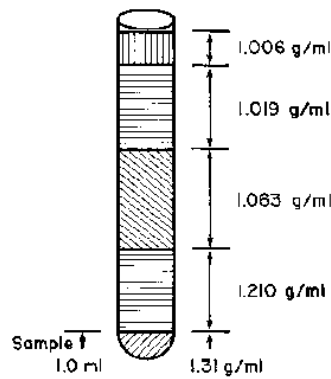


Abbildung 18: Einstellung des Dichtegradienten.

Die Dichtelösungen wurden mit NaBr eingestellt und enthielten 0,05% EDTA. Zur vollständigen Abdeckung des Dichtebereichs wurden die Lösungen auf zwei Röhrchen verteilt. Die Zentrifugationsröhrchen (Beckmann, Ultraclear 5,5 ml) wurden nach folgendem Schema befüllt:

Dichte (g/ml)	1. Röhrchen mit den geringeren Dichtebereichen	2. höhere Dichtebereiche
1,386	0,2 ml Serum	0,2 ml Serum
1,21	/	0,6
1,019	1,5	1,7
1,063	1,8	1,8
1,006	1,5	1,2
1,006	0,5	/

Die Röhrchen wurden im Rotor SW55 in der Beckmann Ultrazentrifuge (Model L5-65) für 24 Stunden bei 38.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden der Inhalt der Röhrchen vorsichtig in 500 µl Fraktionen von oben abpipettiert. Die einzelnen Fraktionen wurden in zuvor ausgewogene Eppendorfgefäße überführt. Durch Zurückwiegen der Gefäße konnte die Dichte der einzelnen Fraktionen bestimmt werden. Anschließend wurde die Aktivität der Fraktionen bestimmt.

2.5.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAAGE)

Zum Teil wurden die einzelnen Fraktionen der FPLC-Analyse bzw. der Dichtegradienten-UZ mittels SDS-PAAGE mit anschließendem Immunoblot und/oder Autoradiogramm analysiert. Für das Autoradiogramm wurde auf das Elektrophoresegel bzw. den Blot ein Hyperfilm MP (Amersham, Buckinghamshire, UK) aufgelegt, in einer Kodak X-Omatic Kassette (Trimax-System, Eastman Kodak Company, New Haven, USA) exponiert und anschließend entwickelt.

2.6 Bestimmung der N-terminalen Proteinsequenz

Die Bestimmung der N-terminalen Proteinsequenz erfolgte mit einem automatischen Proteinsequenziergerät (ABI 494 Procise Sequencer, Perkin-Elmer Corporation, USA).

2.7 Massenspektroskopische Analysen

Die massenspektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem automatischen Elektrospray Massenspektrometer (Sciex API III, Perkin Elmer Corporation, USA) durchgeführt.

Sowohl die massenspektroskopischen Untersuchungen wie auch die Aminosäuresequenzanalysen erfolgten in Kooperation mit dem Niedersächsischen Institut für Peptidforschung (IPF) in Hannover.

2.8 Proteaseinhibitoren

Die in Tabelle 4 aufgeführten Protease-Inhibitoren wurden auf ihren Einfluß auf die Degradation von rekombinantem Protein untersucht, das in Sf9-Zellen mit rekombinantem Baculovirus exprimiert wurde (Aprotinin, Bestatin, EDTA-Na₂, Leupeptin, Pepstatin, Phosphoramidon und PMSF) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland). Jeder Protease-Inhibitor wurde im mittleren Bereich der empfohlenen Konzentration eingesetzt und zu frisch geerntetem Protein gegeben. Die Lösung wurde bei 37°C inkubiert und in definierten Zeitabständen wurden Aliquots entnommen. Diese wurden bis zur Analyse bei -80°C eingefroren und anschließend mit SDS-PAAGE und Immunoblot analysiert.

Inhibitor	Spezifität	empf. Konzentration
Aprotinin	Serinproteasen	0,06-2 µg/ml
Bestatin	Aminopeptidasen	40 µg/ml
EDTA	Metalloproteasen	0,2-0,5 mg/ml
Leupeptin	Serin- und Cystein-Proteasen (Plasmin, Trypsin, Cathepsin B)	0,5 µg/ml
Pepstatin	Aspartatproteasen	0,7 µg/ml
Phosphoramidon	Metalloendopeptidasen, spez. Thermolysin	4-330 µg/ml
PMSF	allgemeiner Serinproteaseinhibitor	22 mg/ml (in Ethanol lösen)

Tabelle 4: Proteaseinhibitoren.

2.9 Transgene Kaninchen

Transgene Kaninchen wurden uns freundlicherweise von Dr. N. Duverger zur Verfügung gestellt (Rhône-Poulenc Rorer-Gencell, Vitry, Frankreich). Um das Transgen einzuführen, wurden Kaninchen gepaart und Embryonen 17 Stunden später isoliert. Das menschliche ApoA-I-Fragment aus genomischer DNA, das für die Mikroinjektion verwendet wurde, wurde aus einem teilverdauten EcoRI-Fragment einer DNA-Bank von K562-Zellen erhalten und wurde anschließend in den Bacteriophagen Charon 4a insertiert. Das eingefügte Fragment umfaßte das gesamte ApoA-I-Gen und zusätzlich 3,5 kb *downstream* vom 3'- und 5,5 kb *upstream* vom 5'-Ende der ApoA-I-Sequenz. Die DNA-Lösung mit dem genomischen ApoA-I-Fragment

wurde in Pronuklei injiziert und die Embryonen in pseudoschwangere Kaninchen überführt [108].

2.10 Immunhistochemie

2.10.1 Einbetten der Organe und Anfertigen der Gefrierschnitte

Kaninchenorgane wurden frisch entnommen und in Tissue-Tek Einfrierschälchen und Einfriermedium (Miles Inc., Elkhart, USA) eingebettet. Das Einfrieren erfolgte möglichst rasch auf Trockeneis bzw. in flüssigem Stickstoff. Die eingebetteten Organe wurden luftdicht bei -80°C bis zum Anfertigen der Gefrierschnitte gelagert. Anschließend wurden von den Organen mit dem Schneidegerät Microm HM-500 OM (Microm Laborgerate GmbH, Walldorf, Deutschland) Gefrierschnitte von $10\ \mu\text{m}$ Schichtdicke angefertigt. Diese wurden auf einen Objektträger aufgebracht und durch kurzes Eintauchen in eiskaltes Aceton fixiert, anschließend getrocknet und bis zur Färbung in Alufolie gehüllt bei -20°C eingefroren.

2.10.2 Immunhistochemische Färbung der Gefrierschnitte

Zur Immunhistochemie wurden die Schnitte 10 min bei Raumtemperatur aufgetaut. Alle Färbeschnitte wurden in einer feuchten Färbekammer durchgeführt, damit die Präparate nicht austrockneten. Als Negativkontrollen dienten unbehandelte nicht transgene New Zealand White Kaninchen, als Positivkontrolle diente gesunde humane Leber.

Alle Gebrauchslösungen sollten frisch sein und wurden 15 Minuten zuvor aus dem Kühlschrank entnommen.

Folgende Schritte wurden zur Immunfärbung durchgeführt:

1. Fixierung:
10 Min. kaltes Aceton (-20°C)
2. Präparate trocknen und 5 min bei RT mit PBS pH 7,4 rehydrieren
3. PO-Blocking:
20 min. mit einer Mischung aus 200 ml Methanol + 50 ml H_2O_2 (3%) inkubieren. Anschließend mit bidest. Wasser abspülen und 5 min in PBS rehydrieren.
4. Blockieren:
Kaninchenserum (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde 1:5 mit PBS verdünnt und ca. $100\ \mu\text{l}$ pro Präparat aufgetragen. Nach 15 min Inkubationszeit wurde die Lösung vorsichtig abgekippt.
5. Avidin-Blockierung:
Avidin-Lösung wurde unverdünnt aus dem Avidin/Biotin Blocking-Kit (Vector, Laboratories Inc., Burlingame, USA) auf die Präparate getropft und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS gespült und 3fach je 2 min mit PBS gewaschen.

6. Biotin-Blockierung:

Biotin-Lösung wurde unverdünnt aus dem Blocking-Kit (Vector, Laboratories Inc., Burlingame, USA) auf die Schnitte getropft und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Präparate mit PBS gespült und 3 mal je 2 min mit PBS gewaschen.

7. Primärantikörper:

monoklonaler Maus-anti human ApoA-I-Antikörper (von Firma Bayer zur Verfügung gestellt) bzw. polyklonaler Goat-anti human ApoA-I-Antikörper (selbst hergestellt) wurden in PBS-1%BSA verdünnt (1:50 bis 1:400). Anschließend wurden die Schnitte 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurden die Präparate mit PBS gespült und 3fach je 2 min mit PBS gewaschen. Die Pufferkontrolle wurde nur mit PBS-1%BSA ohne Primärantikörper inkubiert.

8. Sekundärantikörper:

biotinylierter anti-Maus-Antikörper aus Kaninchen (Dako Cooperation, Carpinteria, USA) bzw. biotinylierter anti-Ziege-Antikörper Ig(H+L) aus Kaninchen (Dianova) wurden 1:400 in PBS-1% BSA verdünnt und die Schnitte damit 15 min inkubiert. Anschließend wurde wieder 3fach je 2 min mit PBS gewaschen.

9. Streptavidin:

Streptavidin wurde aus dem LSAB(R)-Kit (Dako Cooperation, Carpinteria, USA) laut Anweisung verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Nach 15 minütiger Inkubation bei RT wurde wie oben gewaschen.

10.Färbung:

Für die Färbelösung wurde 2 ml Acetatlösung mit einem Tropfen AEC-Lösung (aus LSAB-Kit, Dako Cooperation, Carpinteria, USA) gemischt und kurz vor Gebrauch 1 Tropfen H₂O₂ zugegeben. Die Inkubation der Präparate erfolgte je nach Färbegeschwindigkeit 15-20 min bei RT. Danach wurden die Schnitte mit bidest. Wasser gewaschen, 1 min mit unverdünnter Mayers Hämalaun-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt und nochmals mehrere Minuten mit Wasser gespült.

11.Eindecken:

Kaisers Glycerin-Gelantine (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) wurde auf 37°C erwärmt, auf die Präparate aufgetropft und diese mit Deckgläschen eingedeckelt.

Positive Ergebnisse stellten sich rot auf blauem Hintergrund dar.

2.10.3 Dokumentation der Gefrierschnittergebnisse

Nach der Färbung wurden die Schnitte an einem Mikroskop (Nikon Labophot-2, Badhoevedorp, Niederlande) bei verschiedenen Vergrößerungen betrachtet und Ausschnitte fotografiert. Für die Dokumentation wurde eine Nikon-Kamera FDX-35 mit einem gängigen Diafilm (Kodak Ektachrome 100 HC) verwendet.

3 Ergebnisse

Für die Untersuchung der Proteolyse von ApoA-I wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurde das Protein rekombinant exprimiert, um unabhängig von humanem Material jederzeit Protein zur Verfügung zu haben. Des Weiteren war es auf diese Weise möglich, eine Modifikation des Proteins am C-terminalen Ende vorzunehmen und so die Möglichkeit zu erhalten, spezifische Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* durchzuführen. Zum anderen wurden transgene Kaninchen untersucht, die das humane präpro-ApoA-I in hoher Dosis exprimieren. Dadurch waren insbesondere spezielle Untersuchungen zum Stoffwechsel des ApoA-I möglich, im weiteren ergab sich die Möglichkeit immunhistochemischer Untersuchungen.

3.1 Expression von rekombinantem ApoA-I in der Insektenzelllinie Sf9 mittels Baculovirus

Reifes humanes ApoA-I wurde in der Insektenzelllinie Sf9 mit Hilfe eines rekombinanten Baculovirus exprimiert. Dies führte zu einer aminoterminalen Addition der Aminosäure Methionin in der Proteinsequenz. Des Weiteren wurde ein rekombinantes Baculovirus hergestellt, mit dem die Expression eines am C-Terminus modifizierten Proteins möglich war. Dieses Protein besaß am C-terminalen Ende eine zusätzliche FLAG-Sequenz aus 8 hydrophilen Aminosäuren (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) gegen die spezifische monoklonale Antikörper existieren und daher ein hoch selektiver Nachweis dieser speziellen Aminosäuresequenz möglich war.

Um rekombinanten Baculovirus herzustellen, wurde zuerst eine PCR-Amplifikation der Sequenz des reifen ApoA-I durchgeführt und das Produkt in den Baculovirus-Transfektor pVL1393 kloniert. Nach Amplifikation des Plasmids in *E.coli* erfolgte eine Kotransfektion des rekombinanten Transfektors mit der DNA des Baculo-Wildtypvirus AcNPV (Prinzip der homologen Rekombination). Nach Infektion von Sf9-Zellen waren rekombinante Viren vom Wildtypvirus durch die unterschiedliche Morphe der Plaques lichtmikroskopisch unterscheidbar. Die Viren wurden isoliert und über mehrere Infektionszyklen amplifiziert.

Analog zu der beschriebenen Methode wurde ein modifiziertes ApoA-I synthetisiert, das die bereits beschriebene zusätzliche hydrophile FLAG-Sequenz von

acht Aminosäuren am C-terminalen Ende enthält. Die FLAG-Sequenz wurde mit einem modifizierten *Reversed Primer* mittels PCR in die cDNA eingeführt, das amplifizierte Produkt in den Baculovirus-Transfervektor inkloniert und anschließend nach Kotransfektion in Sf9-Zellen das rekombinante Virus isoliert. Die rekombinanten ApoA-I-Konstrukte wurden durch bidirektionales Sequenzieren bestätigt.

3.1.1 Charakterisierung der exprimierten Proteine in SDS-Gel, Immunoblot und isoelektrischer Fokussierung

Die Charakterisierung der exprimierten Proteine im SDS-Gel, in der isoelektrischen Fokussierung und im Immunoblot zeigten die erwarteten Proteingrößen, Proteinladungen und Immunreaktionen. Auch die Spezifität des FLAG-Antikörpers ließ sich deutlich dokumentieren. Abbildung 19 zeigt ein 15%iges SDS-Polyacrylamid-Gel, Abbildung 20 einen Immunoblot des Gels nach Auftrennung in einem 15%igen Polyacrylamidgel. Im Immunoblot wurde sowohl eine Immunfärbung mit polyklonalem Anti-ApoA-I-Antikörper vorgenommen (linke Seite) als auch eine Immunfärbung mit dem monoklonalem Antikörper gegen die FLAG-Sequenz des rekombinanten rApoA-I-FLAG. Dabei zeigt sich deutlich, daß eine sehr spezifische Reaktion des Antikörpers erfolgt und daß es zu keiner Kreuzreaktion des monoklonalen Antikörpers mit Epitopen sonstiger zellulärer Proteine kommt.

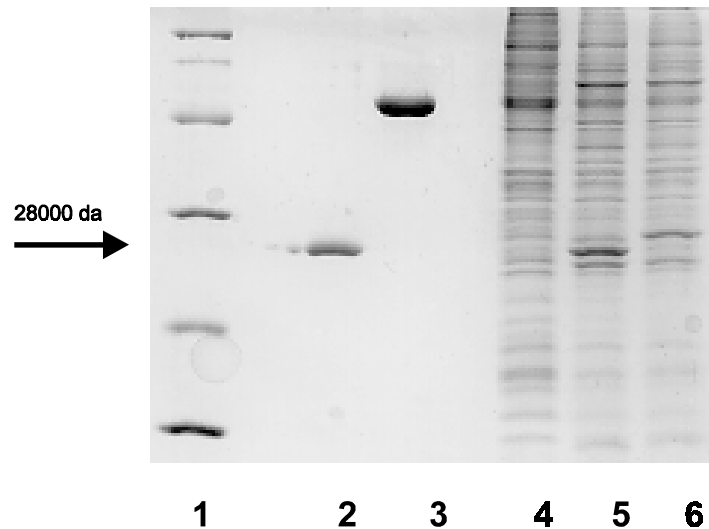


Abbildung 19: Zell-Lysate von Kulturen mit exprimiertem rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG nach Auftrennung in einem 15% SDS-Polyacrylamid-Gel. Dargestellt sind die Lysate im Vergleich zu einem Standard, der aus humanen HDL isoliert wurde. Bahn 1: Molekulargewichtsstandard; Bahn 2: ApoA-I-Standard, isoliert aus humaner HDL; Bahn 3: Kommerzielles Protein mit der FLAG-Sequenz; Bahn 4: Zell-Lysat aus nicht-infizierten Sf9-Zellen; Bahn 5: Lysat aus Zellen, die mit rekombinantem Baculovirus infiziert wurden und rApoA-I-WT exprimierten; Bahn 6: Lysat aus Sf9-Zellen, die nach Infektion rApoA-I-FLAG exprimierten.

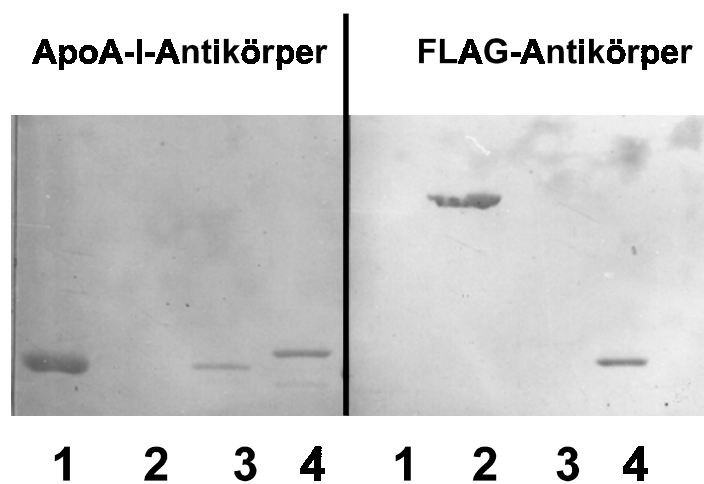


Abbildung 20: Charakterisierung von rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG mittels Western Blot. Die linke Seite des Blots wurde mit polyklonalem Anti-ApoA-I-Antikörpern gefärbt. Die rechte Seite des Blots wurde mit monoklonalem Anti-FLAG-Antikörper gefärbt. Aufgetragen sind jeweils: Bahn 1: ApoA-I-Standard, isoliert aus humanen HDL; Bahn 2: Kommerzielles Protein mit der FLAG-Sequenz. Bahn 3: rApoA-I-WT aus Sf9-Zellen; Bahn 4: rApoA-I-FLAG aus Sf9-Zellen. Bei der Färbung mit polyklonalem Anti-ApoA-I-Antikörper zeigten sowohl rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG eine spezifische Reaktion. Bei Behandlung mit monoklonalem Anti-FLAG-Antikörper war eine spezifische Reaktion nur mit dem FLAG-Epitop des exprimierten Proteins und der Positivkontrolle festzustellen.

Im Polyacrylamid-Gel und im Western Blot war knapp unterhalb der Proteinhauptbande eine zweite, schwächere Bande zu erkennen, bei der es sich, wie sich aus der immunspezifischen Färbung im Western Blot schließen ließ, ebenfalls um ein Protein handelte, das mit den polyklonalen Anti-ApoA-I-Antikörpern reagierte. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein noch nicht vollständig translatiertes ApoA-I oder bereits um ein Degradationsprodukt (Proteolyse). Eine Charakterisierung des rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG im IEF-Gel zeigte, daß diese Bande mit der Bande des Deaminierungsproduktes des ApoA-I Standard aus humanem Serum zusammenfiel (Abbildung 21).

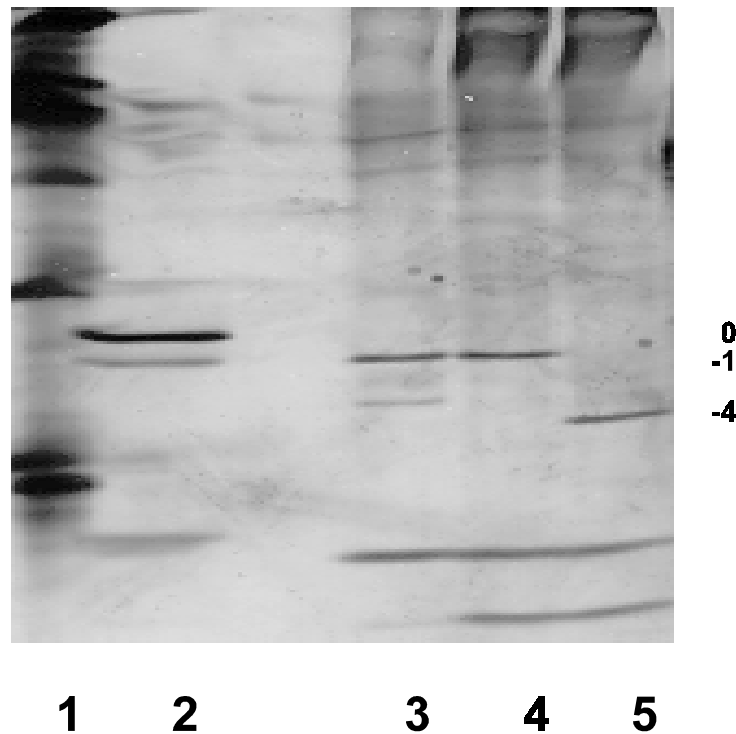


Abbildung 21: Charakterisierung der exprimierten rekombinanten Proteine aus Sf9-Zellen in einem IEF-Gel. Bahn 1: IEF-Standard; Bahn 2: ApoA-I-Standard, isoliert aus humanen HDL; Bahnen 3 und 4: rApoA-I-WT aus Sf9-Zellen; Bahn 5: rApoA-I-FLAG aus Sf9-Zellen. Deutlich ist der Ladungsunterschied des durch die FLAG-Sequenz modifizierten ApoA-I zu erkennen, der die vermuteten -4 Ladungsunterschiede aufweist. Die -1 Bande stellt ein deaminiertes ApoA-I dar.

3.1.2 Bestimmung der Proteinsequenz

Die mittels der Reversed Phase Chromatographie (vergl. Abschnitt 3.1.4 für genauere Beschreibung) isolierten Proteine rApoA-I-WT und rApoAI-FLAG wurden N-terminal ansequenziert. Dazu wurde ein automatisches Proteinsequenziergerät verwendet (Applied Biosystems Procise). Für beide Proteine ergab sich die N-terminale Sequenz

MDEPPQSPW (Met-Asp-Glu-Pro-Pro-Gln-Ser-Pro-Trp-Asp-Arg)

Ein Vergleich mit der bekannten Sequenz des humanen ApoA-I zeigte eine N-terminale Übereinstimmung, wobei N-terminal die Aminosäure Methionin angefügt ist.

3.1.3 *In vitro*-Assoziation der Proteine: Analyse mittels FPLC und Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Um das korrekte Assoziationsverhalten der rekombinanten Proteine rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG mit der HDL-Fraktion *in vitro* zu überprüfen, wurden die Proteine mit humanem Serum inkubiert und die Lipoproteinverteilung mittels FPLC-Analyse und Dichtegradienten-Ultrazentrifugation überprüft. Dazu wurde zunächst rekombinantes rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG mittels rekombinantem Baculovirus in Sf9-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden geerntet und anschließend zur Freisetzung der rekombinanten Proteine lysiert. Der Extrakt wurde sofort mit humanem Serum inkubiert. 0,5 ml des Serums wurden auf eine Superose 6 Säule gegeben und mit 1x PBS-Puffer, 1mM EDTA, 0,01% NaN₃ bei einer Flußrate von 0,3 ml/min eluiert. Das Eluat wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und diese Fraktionen mittels SDS-Polyacrylamidelektrophorese und anschließendem Westernblot analysiert. Zur Detektion des gesamten humanen ApoA-I wurden die Blots mit einem polyklonalen Antikörper gegen humanes ApoA-I gefärbt. Zur Detektion des rApoA-I-FLAG wurden die Westernblots mit einem spezifischen Anti-FLAG-Antikörper inkubiert.

Abbildung 22 zeigt zunächst die Auftrennung von reinem Humanserum auf einer Superose 6 Säule. Die Apoproteine wurden nephelometrisch quantifiziert. Deutlich ist die Trennung des Serums in die VLDL-, LDL-, HDL- und Proteinfraction, gekennzeichnet jeweils durch die spezifischen Apolipoproteine, zu erkennen.

Abbildung 23 zeigt die Auftrennung von Humanserum auf einer Superose 6 Säule nach Inkubation mit den rekombinanten Proteinen rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG. Humanes HDL eluiert im wesentlichen in den Fraktionen 19-29 wie durch den polyklonalen Antikörper gegen ApoA-I bestätigt werden konnte. Die Immunfärbung mit dem spezifischen FLAG-Antikörper belegte eine Anreicherung in den Fraktionen 21-27 (Abbildung 24). Somit konnte gezeigt werden, daß bei *in vitro* Inkubation rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG mit der HDL-Fraktion des Serums assoziieren.

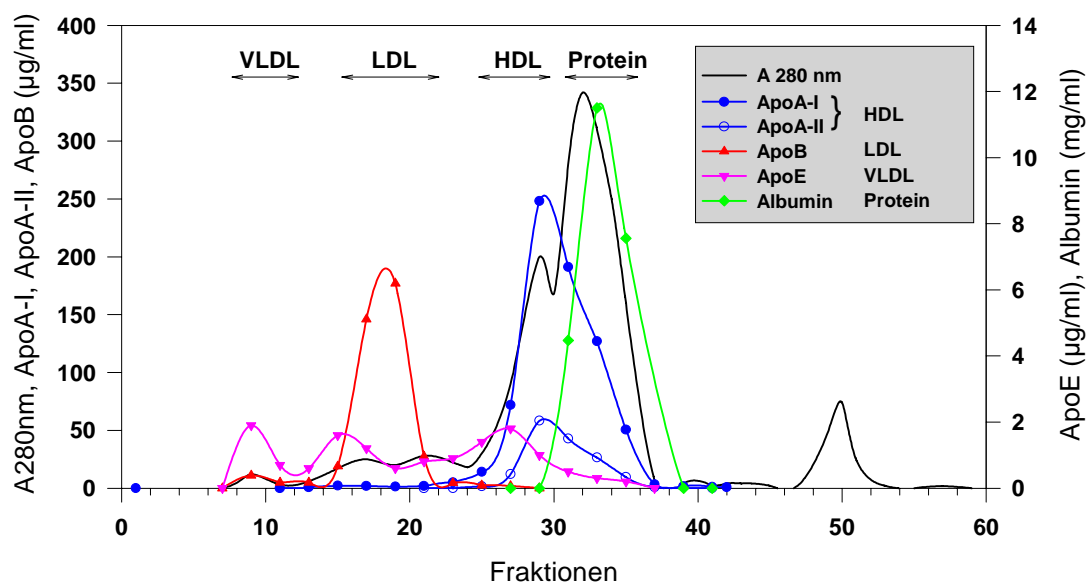


Abbildung 22: FPLC-Analyse von Humanserum mittels einer Superose 6 Säule. Die Konzentration der angegebenen Apolipoproteine wurden mittels verschiedener Antikörper nephelometrisch in den jeweiligen Fraktionen bestimmt. Deutlich spiegelt die Elution der Apolipoproteine das Elutionsprofil der Lipoproteine wider.

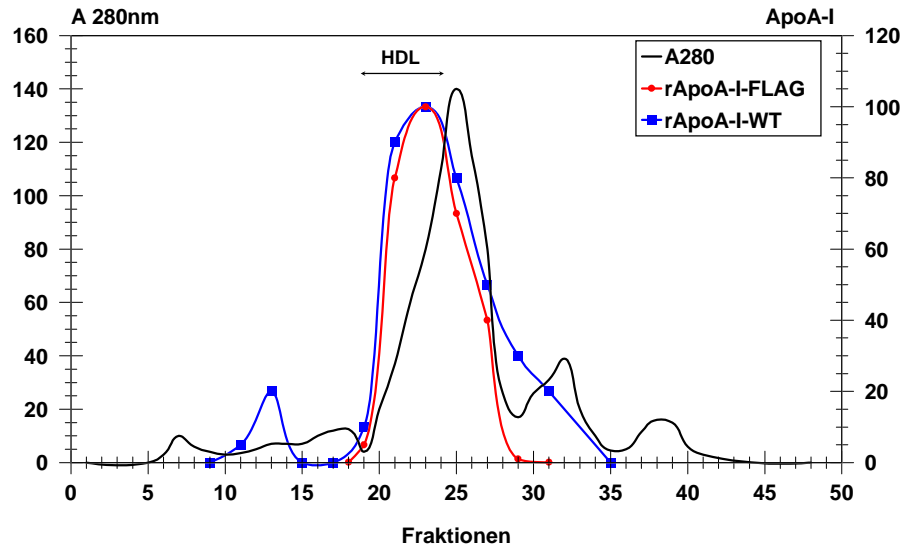


Abbildung 23: Elutionsprofil einer Superose 6 Säule: Aufgetragen wurde humanes Serum nach Inkubation mit rApoA-I-WT bzw. rApoA-I-FLAG. Die Proteine wurden nephelometrisch quantifiziert.

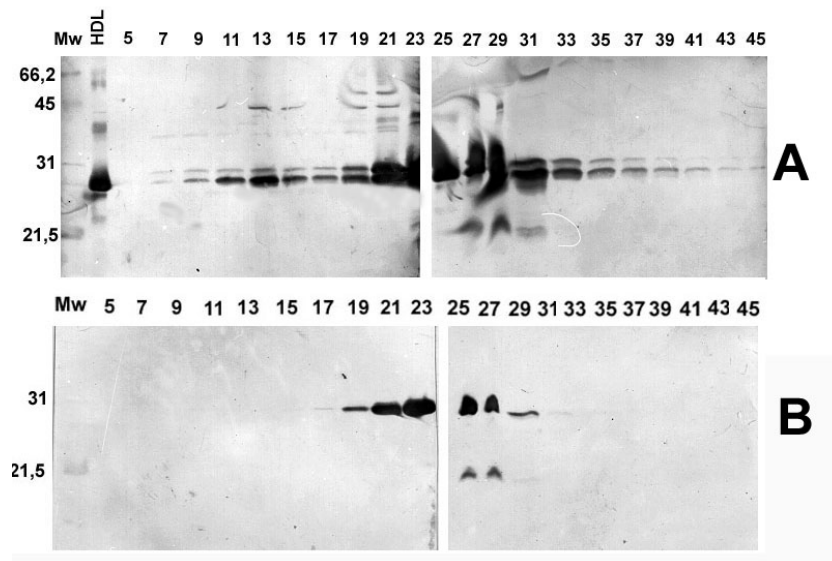


Abbildung 24 **A**: Westernblot nach SDS-PAAGE der Säulenfraktionen einer Superose 6 Säule nach Auftrennung humanen Serums nach Inkubation mit rApoA-I-WT bzw. rApoA-I-FLAG. Dieser Westernblot wurde mit einem polyklonalen Anti-ApoA-I-Antikörper inkubiert zur Detektion des humanen ApoA-I. **B**: Westernblot nach SDS-PAAGE der Säulenfraktionen einer Superose 6 Säule nach Auftrennung humanen Serums nach Inkubation mit r-ApoA-I-WT bzw. r-ApoA-I-FLAG. Dieser Westernblot wurde zur Detektion des r-ApoA-I-FLAG mit einem spezifischen Anti-FLAG-Antikörper inkubiert.

Eine weitere Untersuchung zum Assoziationsverhalten wurde mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation durchgeführt. Hierzu wurde Zellextrakt mit humanem Serum inkubiert. In ein Ultrazentrifugationsröhrchen wurden 0,2 ml Serum gegeben und mit KBr-Lösungen verschiedener Dichten überschichtet. Zur Einstellung des Dichtegradienten wurde 24 Stunden in der Ultrazentrifuge bei 38.000 rpm zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurden vorsichtig 0,5 ml Fraktionen abpipettiert und mittels SDS-PAAGE und anschließendem Westernblot untersucht. Abbildung 25A und B und zeigen die Analysen der einzelnen Dichtefraktionen. Auch hier zeigt sich eine deutliche Assoziation des rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG mit der HDL-Dichtefraktion des humanen Serums.

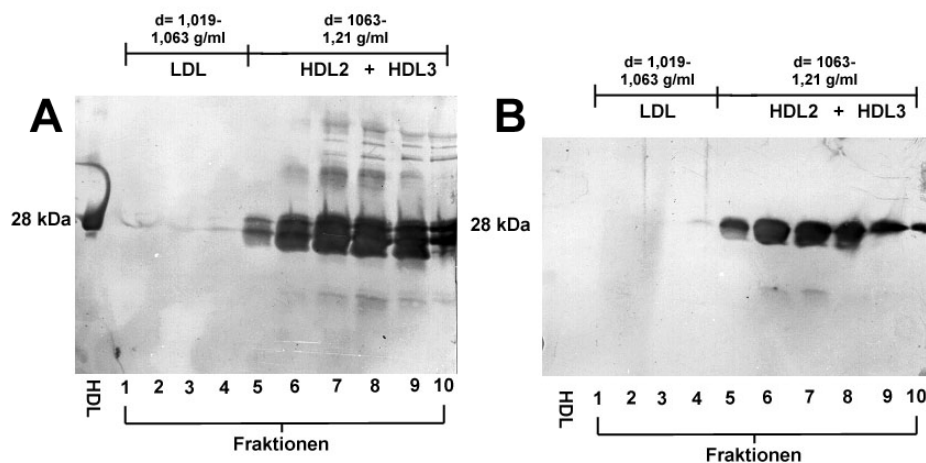


Abbildung 25: **A:** Westernblot nach SDS-PAAGE, dargestellt sind Fraktionen der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation humanen Serums nach Inkubation mit rApoA-I-WT bzw. rApoA-I-FLAG. Dieser Westernblot wurde zur Detektion des humanen ApoA-I mit einem polyklonalen Anti-ApoA-I-Antikörper inkubiert. **B:** Westernblot nach SDS-PAAGE der Fraktionen nach Dichtegradienten-Ultrazentrifugation humanen Serums nach Inkubation mit r-ApoA-I-WT bzw. r-ApoA-I-FLAG. Dieser Westernblot wurde zur Detektion des r-ApoA-I-FLAG mit einem spezifischen Anti-FLAG-Antikörper inkubiert.

3.1.4 Anreicherung und *in vivo* Charakterisierung der rekombinanten Proteine

Für stoffwechselkinetische Untersuchungen wurden rApoA-I-WT bzw. rApoA-I-FLAG mittels Reversed Phase Chromatographie gereinigt und mit Iod-Isotopen radiomarkiert. Die markierten Proteine wurden mit autologem Kaninchenserum inkubiert, die HDL-Fraktion mittels FPLC-Chromatographie isoliert und in NZW-Kaninchen injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion wurden Serumproben entnommen und auf ihre Radioaktivitätsverteilung untersucht.

3.1.4.1 Anreicherung und *in vivo* Charakterisierung von rApoA-I-WT

Bei einer Radiomarkierung werden alle in der Markierungslösung vorhandenen Proteine durch nukleophile Substitution am Tyrosinrest durch ^{125}I bzw. ^{131}I markiert. Daher war es notwendig, die exprimierten Proteine von verunreinigenden Fremdproteinen abzutrennen. Dies wurde zu Beginn der Arbeiten mittels Elektroelution aus SDS-Gelen erreicht. Im weiteren Verlauf der Experimente wurde jedoch die Reversed Phase Chromatographie für die Anreicherung und Isolierung von rApoA-I-WT etabliert. Dabei wurde mit dem Material SourceTM 15 RPC (Pharmacia) gearbeitet, die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von Acetonitril/0,1%TFA. Die Vorschrift wurde nach Hughes *et al.* modifiziert [102].

In Abbildung 26 und Abbildung 27 sind ein SDS-Gel und ein Immunoblot des exprimierten und angereicherten rApoA-I-WT dargestellt. Im SDS-Gel ist deutlich zu erkennen, daß die bei Zellyse freigesetzten Fremdproteine im angereicherten Proteinextrakt nicht mehr vorhanden sind. Eine Analyse mittels Immunoblot macht jedoch deutlich, daß es sehr leicht zu einer Degradation des Proteins kommen kann. Während in den Bahnen 2 und 3 deutlich nur eine immunreaktive Bande zu sehen ist, sind in Bahn 4 bei Verwendung von polyklonalen Antikörpern mehrere Banden zu beobachten. Da bei einer Radiomarkierung auch diese Fragmente markiert werden, ist ein besonderes Augenmerk auf die Intaktheit des untersuchten Proteins zu richten.

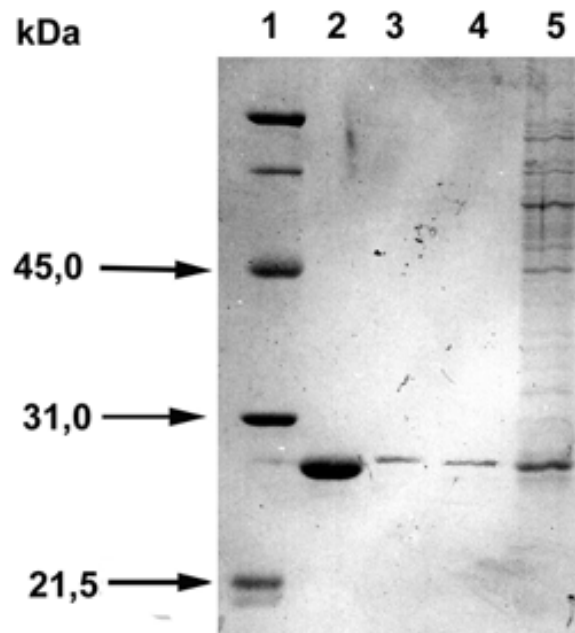


Abbildung 26: SDS-Gelelektrophorese rekombinanten rApoA-I-WT nach erfolgreicher Expression in Sf9-Zellen mittels Baculovirus und anschließender Anreicherung. Dargestellt sind in den verschiedenen Bahnen: Bahn 1: Molekulargewichtsstandard; Bahn 2: ApoA-I aus humanen HDL; Bahnen 3 und 4: angereichertes und aufgereinigtes rApoA-I-WT; Bahn 5: Zellextrakt aus lysierten Zellen.

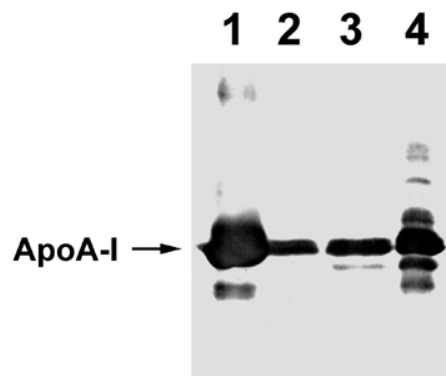


Abbildung 27: Immunoblot rekombinanten rApoA-I-WT, das mittels Baculovirus exprimiert wurde. Nach Analyse im 15%igen SDS-Gel wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit polyklonalem Antikörper spezifisch gefärbt. Bahn 1: ApoA-I aus humanen HDL; Bahnen 2 und 3: angereichertes rekombinantes rApoA-I-WT; Bahn 4: Eine aufgereinigte rApoA-I-WT-Probe mit immundetektierbaren Fragmenten.

Das Auftreten von Proteinfragmenten führte in erheblichem Umfang zu Problemen bei der Durchführung von *in vivo*-Kinetiken, da bereits geringe Mengen an Fragmenten in der Injektionslösung zu einer scheinbar schnelleren

Verstoffwechslung des eigentlich untersuchten Proteins führten (siehe Abschnitt 3.2.4). Aus diesem Grund wurde ein weiterer Isolationsschritt für das rekombinante Protein vor Injektion der Radioaktivität in NZW-Kaninchen durchgeführt.

Dazu wurde das markierte Protein mit Kaninchenserum inkubiert, so daß eine Assoziation des rApoA-I-WT mit der HDL-Fraktion des Kaninchenserum erfolgen konnte. Anschließend wurde die Inkubationslösung auf eine Superose 6-Säule an der FPLC aufgetragen und dadurch eine Fraktionierung der Serumbestandteile nach Größe erreicht. Die HDL-Fraktion im Kaninchenserum konnte auf diese Weise weitestgehend isoliert werden. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend auf ihre Radioaktivität hin untersucht und die Fraktionen vereinigt, die im ersten Radioaktivitätspeak erschienen und die, wie durch vorherige Testläufe bestätigt werden konnte, die HDL-Fraktion repräsentieren. Analog wurde auch das ApoA-I isoliert aus humaner HDL von Fragmenten gereinigt (vgl. Abbildung 28).

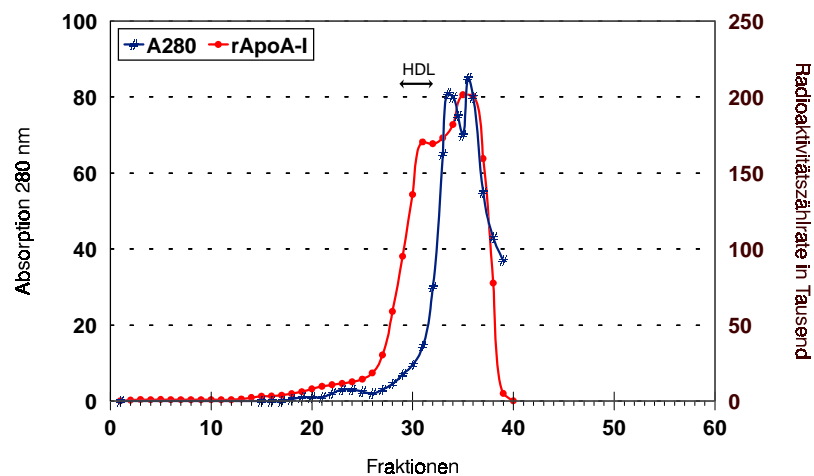


Abbildung 28: Isolation des mit der HDL-Fraktion des Kaninchenserum assoziierten rekombinanten Proteins. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm und die Radioaktivitätsverteilung über die einzelnen Fraktionen. Von dieser exemplarisch dargestellten FPLC-Fraktionierung wurden die Fraktionen 28-32 vereinigt und für die *in vivo* Kinetik des HDL-assoziierten Proteins in Kaninchen injiziert.

In Abbildung 29 sind die *in vivo* Kinetiken von rApoA-I-WT im Vergleich zu ApoA-I, das aus humaner HDL isoliert wurde, dargestellt. Diese hochempfindliche Stoffwechseluntersuchung zeigt eine identische Abbauraten von rApoA-I-WT und

humanem ApoA-I. Dies läßt den Schluß zu, daß sich hoch aufgereinigtes rekombinantes rApoA-I-WT physiologisch gesehen wie natives ApoA-I verhält.

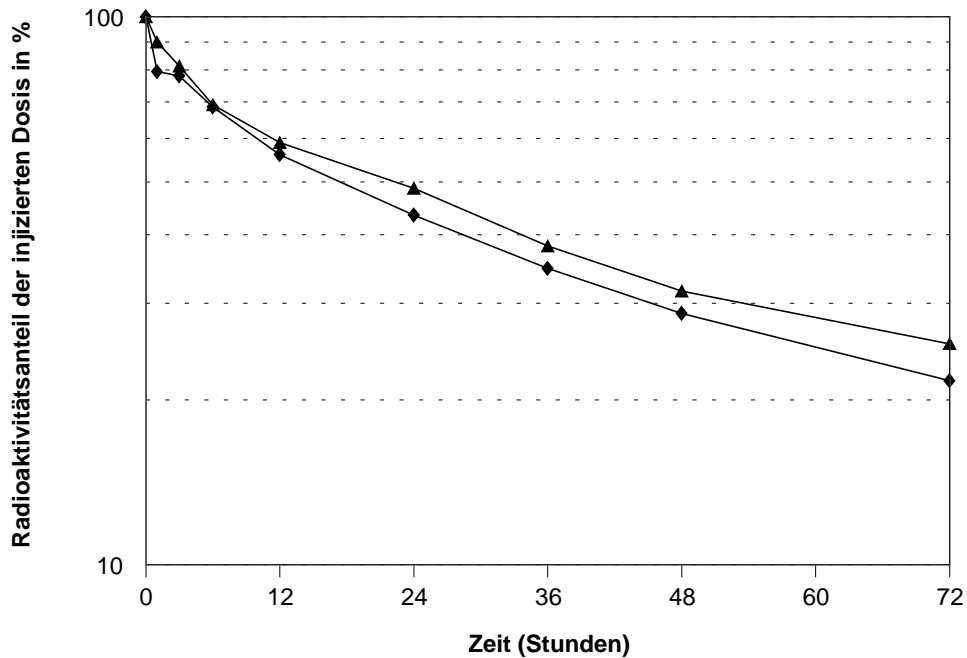


Abbildung 29: *In vivo* Kinetik von rekombinatem rApoA-I-WT aus mit Baculovirus infizierten Sf9-Zellen (◆) und ApoA-I isoliert aus humanen HDL (▲). Die Proteine wurden isoliert, radioiodiert und anschließend in NZW-Kaninchen injiziert. Alle Daten stellen den Mittelwert vierfacher Messungen dar.

Blutentnahmen 5 Minuten, 1 Stunde und 6 Stunden nach Injektion der radiomarkierten Protein rApoA-I-WT und humanem ApoA-I wurden mittels FPLC-Analyse an einer Superose 6-Säule untersucht. Die Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen ist in Abbildung 30 dargestellt.

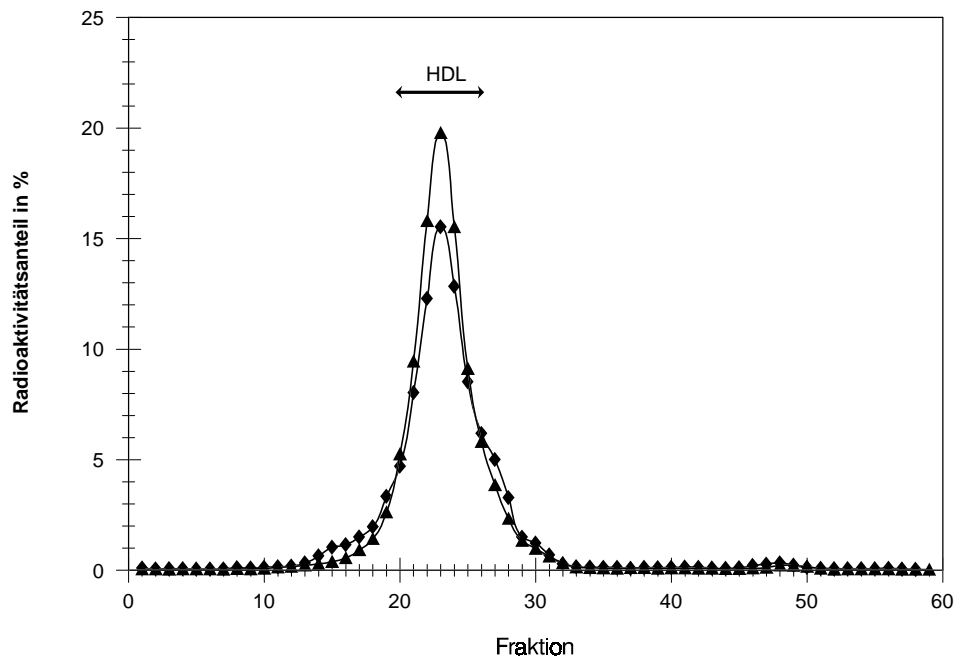


Abbildung 30: FPLC-Analyse einer Serumprobe 1 Stunde nach Injektion der markierten Proteine in NZW Kaninchen. Der Radioaktivitätsverlauf aller untersuchten ApoA-I-Proben spiegelt deren Assoziation mit HDL wider. Rekombinantes ApoA-I-WT aus Sf9-Zellen (◆) bzw. ApoA-I isoliert aus humanen HDL (▲) wurden untersucht.

Der Radioaktivitätsverlauf in Abbildung 30 ist bei beiden Proteinen identisch. Dies bestätigt, daß beide Proteine mit der HDL-Fraktion assoziieren, da dieser Bereich zusätzlich durch Immunoblot mit polyklonalen Antikörpern als der Bereich identifiziert werden konnte, der die HDL-Fraktion der Kaninchen darstellt.

Eine weitere Bestätigung, daß die rApoA-I-WT auch *in vivo* mit der HDL-Fraktion assoziieren, konnte durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation eines Serumaliquots nach Injektion der markierten Proteine erhalten werden (nicht abgebildet). Dabei wurde deutlich, daß sich beide Proteine im identischen Dichtebereich befinden, welcher den Dichtebereich der HDL darstellt.

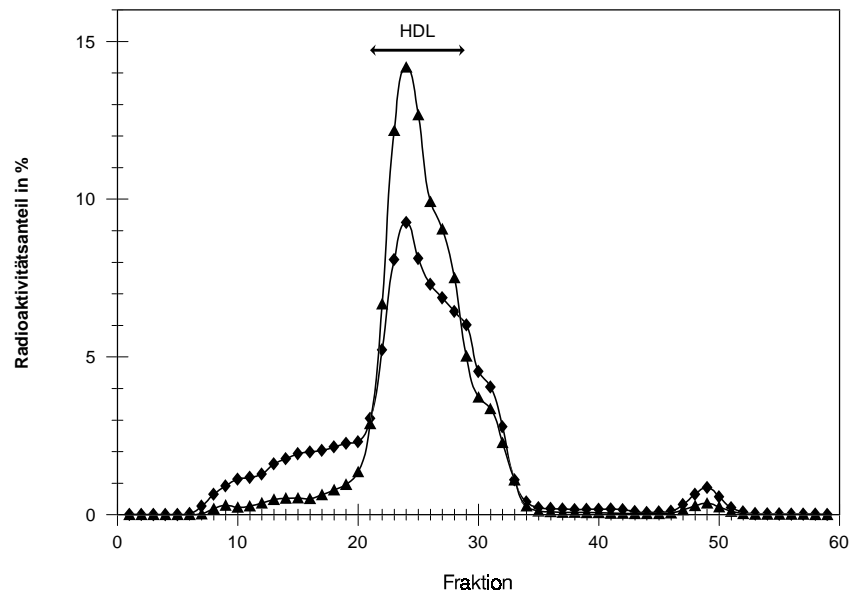


Abbildung 31: FPLC-Analyse von radioaktiv markiertem rApoA-I-WT nach Inkubation der Proteine in Humanserum. Die analysierte Probe war 30 min nach Inkubation von gereinigtem, radiomarkiertem rApoA-I-WT (◆) und ApoA-I isoliert aus humanen HDL (▲) in humanem Serum gewonnen worden. Wiederum reflektiert die Radioaktivitätsverlaufkurve die Assoziation des untersuchten rApoA-I-WT hauptsächlich mit der HDL-Fraktion.

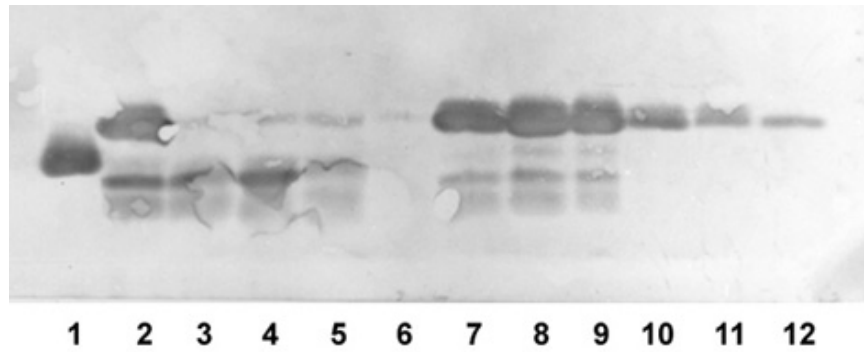
Um zu zeigen, daß sich rApoA-I-WT auch im menschlichen Serum wie aus humaner HDL isoliertes ApoA-I verhält und beide Proteine mit den gleichen Serumpartikeln assoziieren, wurden beide radiomarkierten Proteine in Humanserum inkubiert (siehe Abbildung 31). Anschließend erfolgte eine FPLC-Analyse der Inkubationslösung mit darauffolgender Ermittlung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen. Dabei wird deutlich, daß sich sowohl rApoA-I als auch humanes ApoA-I in denselben FPLC-Fraktionen wiederfinden lassen, was auf eine Assoziation mit denselben Partikeln schließen läßt. Auch hier konnten diese Fraktionen durch Immunoblotting als die identifiziert werden, in denen sich die HDL befinden.

3.1.4.2 Anreicherung und *in vivo* Charakterisierung von rApoA-I-FLAG

Die Anreicherung von rApoA-I-FLAG wurde zuerst mittels einer monoklonalen Anti-FLAG Immun-Affinitätssäule getestet. Ein großer Teil der zellulären Fremdproteine und Fragmente des rekombinanten Proteins wurde mit dieser Methode abgetrennt, wie im Immunoblot in Abbildung 32 gezeigt werden konnte. Allerdings wurde im weiteren bei der Proteinanreicherung mit der Reversed Phase

Chromatographie - wie bereits bei rApoA-I-WT beschrieben - gearbeitet, zumal sich keine besonderen Vorteile insbesondere im Hinblick auf Kapazität und Lebensdauer der Anti-FLAG-Säule zeigten (Abbildung 33).

A



B

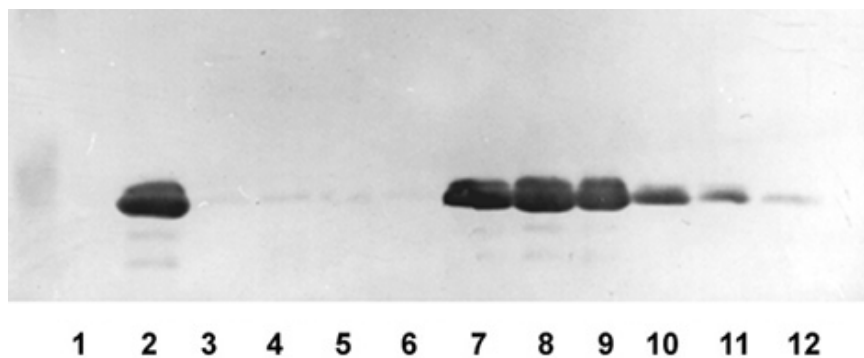


Abbildung 32: Säuleneluat einer Anti-FLAG-Immuno-Affinitätssäule nach Western Blot. Blot A wurde mit Anti-ApoA-I-Antikörpern gefärbt, Blot B mit Anti-FLAG-Antikörpern. Die verschiedenen Bahnen in beiden Blots stellen dar: Bahn 1: HDL-Standard; Bahnen 2-5: Durchlauf der Säule mit ungebundenem Protein; Bahnen 6-12: Säuleneluat mit dem rApoA-I-FLAG-Protein.

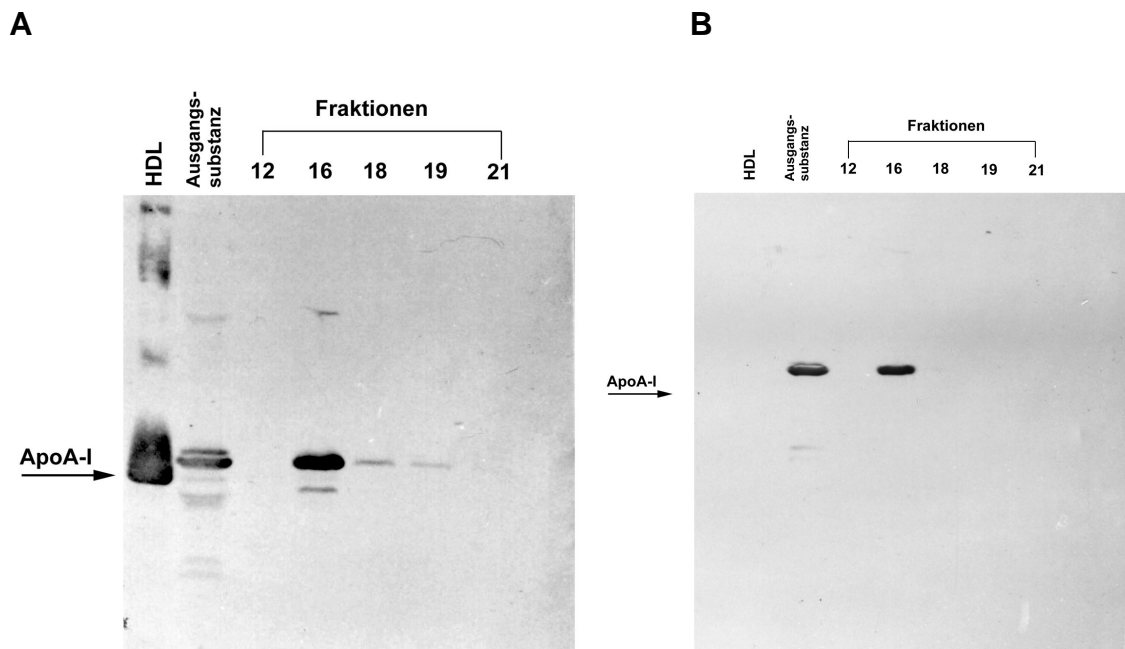


Abbildung 33: Säuleneluat von rApoA-I-FLAG nach der Reversed Phase Chromatographie. Dargestellt ist ein Immunoblot nach Inkubation mit polyklonalem Anti-ApoA-I-Antikörper (A) und monoklonalem Anti-FLAG-Antikörper (B) und anschließender Färbung. Als Vergleichsubstanzen wurden die Ausgangslösung und HDL isoliert aus humanem Serum aufgetragen.

Nach der Anreicherung wurde die *in vivo*-Charakterisierung für das mit der FLAG-Sequenz modifizierte ApoA-I durchgeführt. Dabei wurde rekombinantes rApoA-I-WT, für das das physiologische Verhalten bereits belegt wurde, mit rApoA-I-FLAG verglichen. Für die stoffwechselkinetischen Untersuchungen wurden die mittels Reversed Phase Chromatographie angereicherten Proteine rApoA-I-WT bzw. rApoA-I-FLAG radiomarkiert. Anschließend wurden die radiomarkierten Proteine mit autologem Kaninchenserum inkubiert, die HDL-Fraktion mittels FPLC-Chromatographie wie bereits in Abschnitt 3.1.4.1 beschrieben isoliert und in NZW-Kaninchen injiziert. Zu den bereits erwähnten verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion wurden Serumproben entnommen und auf ihre Radioaktivitätsverteilung untersucht.

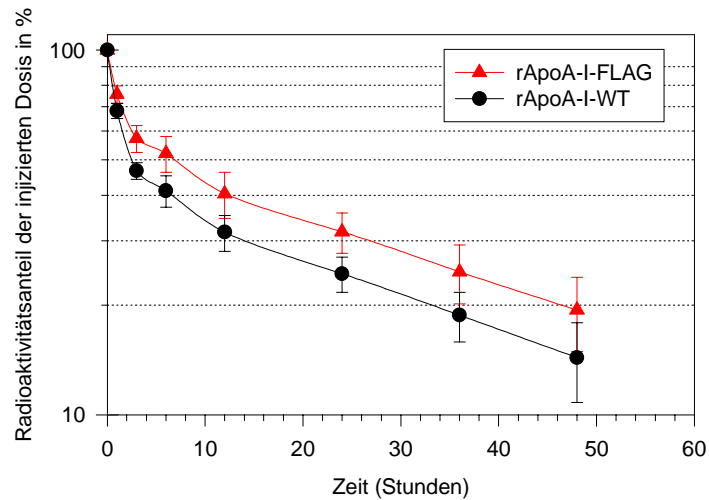


Abbildung 34: Vergleichende *in vivo* Kinetik des radiomarkierten ^{125}I -ApoA-I-FLAG und ^{131}I -ApoA-I-WT nach Injektion in NZW-Kaninchen.

Die Radioaktivitätsabklingkurven des ^{125}I -rApoA-I-FLAG und ^{131}I -rApoA-I-WT nach Injektion in NZW-Kaninchen sind in Abbildung 34 dargestellt. Diese Ergebnisse reflektieren eine analoge Verstoffwechslung beider untersuchten rekombinanten Proteine. Der etwas unterschiedliche Kurvenverlauf wird im wesentlichen durch eine schnellere Verstoffwechslung von rApoA-I-WT in der initialen Phase nach Injektion bedingt, danach verlaufen beide Kurven parallel.

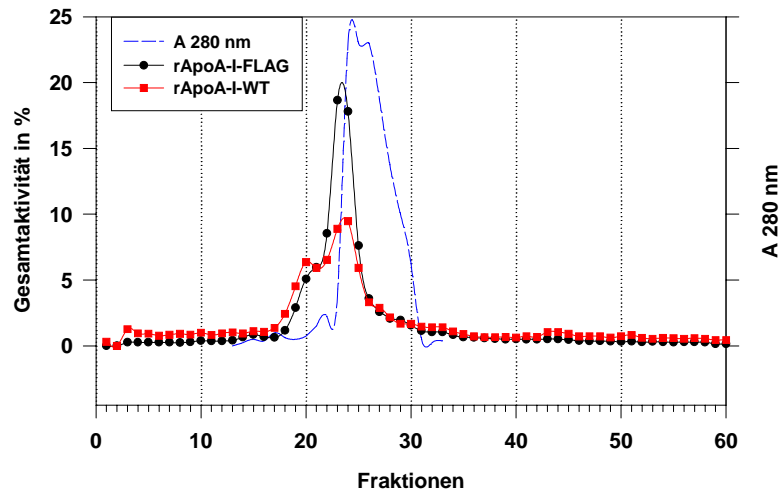


Abbildung 35: FPLC-Analyse des Kaninchenserums 1h nach Injektion der markierten Proteine ^{125}I -ApoA-I FLAG und ^{131}I -ApoA-I WT.

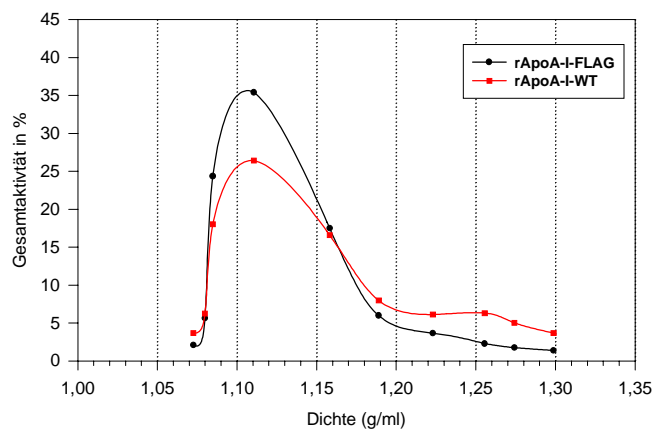


Abbildung 36: Dichtegradienten-Ultrazentrifugationsanalyse des Kaninchenserums 1h nach Injektion der markierten Proteine ^{125}I -rApoA-I-FLAG und ^{131}I -rApoA-I-WT.

Sowohl die FPLC-Analyse als auch die Dichtegradienten-UZ bestätigten für rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG ein korrektes Assoziationsverhalten mit der HDL-Fraktion (Abbildung 35 und Abbildung 36). Die Radioaktivität beider Proteine fand sich im Dichtebereich $d= 1,07\text{-}1,19$ g/ml mit gleicher Verteilung wieder, der Dichtebereich der HDL ist als der Bereich von $d=1,063\text{-}1,210$ g/ml definiert. Somit konnten wir belegen, daß rApoA-I-FLAG auch *in vivo* korrekt mit der HDL-Fraktion assoziiert ist.

3.2 Degradation von ApoA-I

Interessanterweise konnte bei ApoA-I eine deutliche und rasch einsetzende Degradation des Proteins beobachtet werden. Diese Degradation wurde sowohl bei ApoA-I isoliert aus humaner HDL beobachtet (vgl. Kapitel 3.2.2) als auch bei Expression des rekombinanten Proteins in Zellkultur (rApoA-I-WT bzw. rApoA-I-FLAG vgl. Kapitel 3.2.1). Die aufgetretenen Fragmente decken sich in ihrer Größe mit bereits in der Literatur beschrieben und in der eigenen Arbeitsgruppe beobachteten. Dies deutet eventuell auf einen vergleichbaren Mechanismus der Degradation hin.

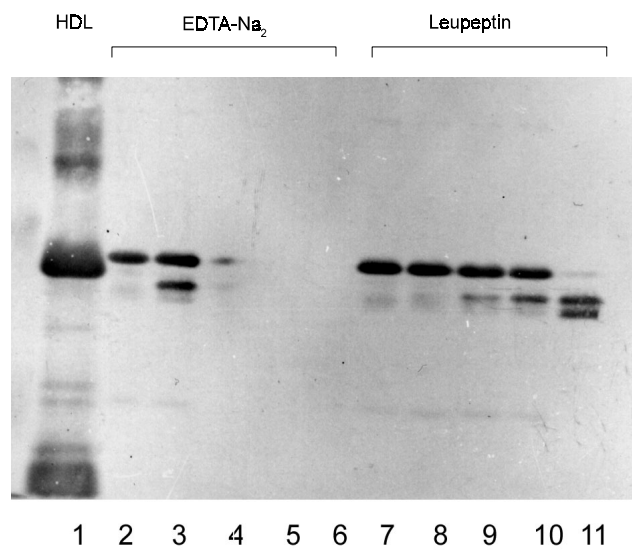
Die auftretende Degradation des ApoA-I *in vitro* erschwerte alle nachfolgenden Untersuchungen erheblich. Aus diesem Grund wurde die *in vitro*-Stabilität des ApoA-I im Verlauf der Arbeiten in Bezug auf den Einfluß verschiedener Faktoren (Solventien, Proteaseinhibitoren, humanes Serum) näher untersucht, um weitere Aufschlüsse und Informationen zu erhalten, ebenso wurde das physiologische Verhalten einer Probe mit immundetektierbaren Fragmenten betrachtet.

3.2.1 Wirkung von Proteaseinhibitoren auf die Degradation

Da bei der Lyse der Zellen auch zelluläre Proteasen freigesetzt werden, war es von Interesse, den Einfluß von Proteaseinhibitoren auf die Degradation von ApoA-I zu untersuchen. Eigene Beobachtungen zeigten, daß eine Fragmentierung des ApoA-I in unterschiedlichem Ausmaß bei den exprimierten Proteinen auftrat. Bei Raumtemperatur degradierte sowohl aus humaner HDL isoliertes (wie später gezeigt) als auch rekombinant exprimiertes ApoA-I bereits binnen weniger Stunden. Selbst bei längerer Lagerung bei -20°C war ein zunehmender Anteil an Bruchstücken des Proteins erkennbar. Entsprechend führte Auftauen und Wiedereinfrieren exprimierten Proteins zu vermehrter Fragmentierung. Verschiedene Proteasen-Inhibitoren in Konzentrationen wie vom Hersteller empfohlen wurden am Beispiel des exprimierten rApoA-I-FLAG bezüglich ihres hemmenden Einflusses auf die Degradation untersucht. Während der Inkubation bei 37°C wurden Aliquots zu 0, 1, 4, 20 und 30 Stunden entnommen, nachfolgend im SDS-Gel aufgetrennt und im Western-Blot mittels polyklonalen Anti-ApoA-I-Antikörpern (selbst hergestellt) und Anti-FLAG-Antikörpern (Integra Biosciences) identifiziert. Die Abbildung 37 zeigt die schnelle Degradation von rApoA-I-FLAG im

ApoA-I-Antikörper nachweisbar war, konnte mit dem Anti-FLAG-Antikörper kein positives Signal mehr gesehen werden. Dies unterstreicht, daß das rApoA-I-FLAG und damit eventuell auch ApoA-I C-terminal gespalten wurde. Ein Vergleich weiterer Protease-Inhibitoren zeigte, daß bei Aprotinin, Bestatin, EDTA-Na₂, Pepstatin und Phosphoramidon wenig bzw. keinen Einfluß auf die Degradation von rApoA-I-FLAG beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte die Zugabe von Leupeptin allein eine deutlich verzögerte Degradation (Abbildung 38).

A



B

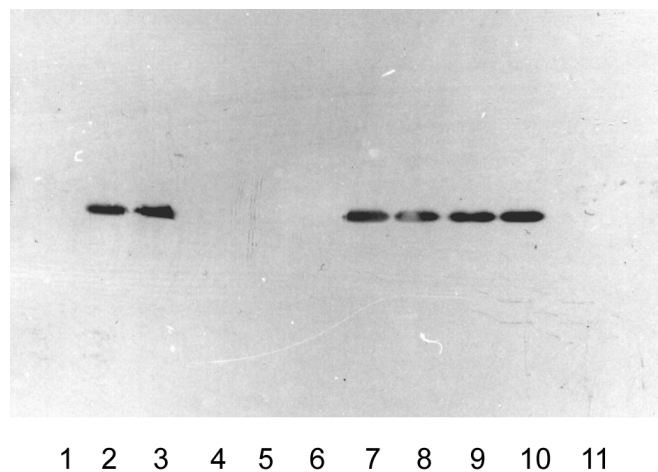


Abbildung 38: Fragmentierung exprimierten Proteins rApoA-I-FLAG mit Zusatz der Protease-Inhibitoren EDTA-Na₂ und Leupeptin. Frisch geerntetes Protein wurde mit Protease-Inhibitor bei 37°C inkubiert. Nach definierten Zeitabständen wurden Aliquots untersucht, indem sie mit einem 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, geblottet und immunologisch gefärbt wurden. Blot A wurde mit Anti-ApoA-I-Antikörpern, Blot B mit monoklonalem Anti-FLAG-Antikörper gefärbt. Aufgetragen sind jeweils in Blot A und B: Bahn 1: ApoA-I-Standard, aus humaner HDL isoliert; Bahnen 2-6: Inkubationen des Proteins rApoA-I-FLAG mit dem Protease-Inhibitor EDTA, dabei erfolgte die Aliquotentnahme nach 0 (Bahn 2), 1 (Bahn 3), 4 (Bahn 4), 20 (Bahn 5) bzw. 30 Stunden (Bahn 6); Bahnen 7-11: Inkubation des Proteins rApoA-I-FLAG unter Zusatz des Protease-Inhibitors Leupeptin. Die Aliquotentnahme erfolgte wie bei den Bahnen 2-6 beschrieben.

Fazit ist, daß unmittelbar nach der Proteinernte von rApoA-I und rApoA-I-FLAG ein Inhibitorcocktail von PMSF, Aprotinin und Leupeptin zugesetzt werden muß, bevor weitere Schritte erfolgen, da sonst eine sehr rasche Degradation des Proteins erfolgt.

3.2.2 in vitro Stabilität von ApoA-I

Der Einfluß der bei der Anreicherungen und in den Experimenten benutzten Lösungsmittel auf die Stabilität isolierten ApoA-I wurde im folgenden Ansatz untersucht. Dazu wurde humanes ApoA-I aus der HDL-Fraktion eines gesunden Probanden frisch isoliert, um Informationen über das physiologische, humane ApoA-I zu bekommen und insbesondere auch den Einfluß zellulärer Proteasen aus den Sf9.Zellen auf die Degradation auszuschließen.

Für die Isolation der humanen HDL wurde eine Dichte-Ultrazentrifugation durchgeführt, die HDL-Fraktion mit Chloroform:Methanol delipidiert und anschließend lyophilisiert. Das Protein wurde in PBS resuspendiert und nachfolgend mittels Reversed Phase Chromatographie mit einem linearen Gradienten mit Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure angereichert. Die Elution des Proteins wurde mit einem UV-Detektor bei 280 nm verfolgt (vgl. Abbildung 39). Die das Protein enthaltenden Fraktionen wurden mittels eines Nephelometers detektiert und im SDS-Gel und Immunoblot nachgewiesen. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

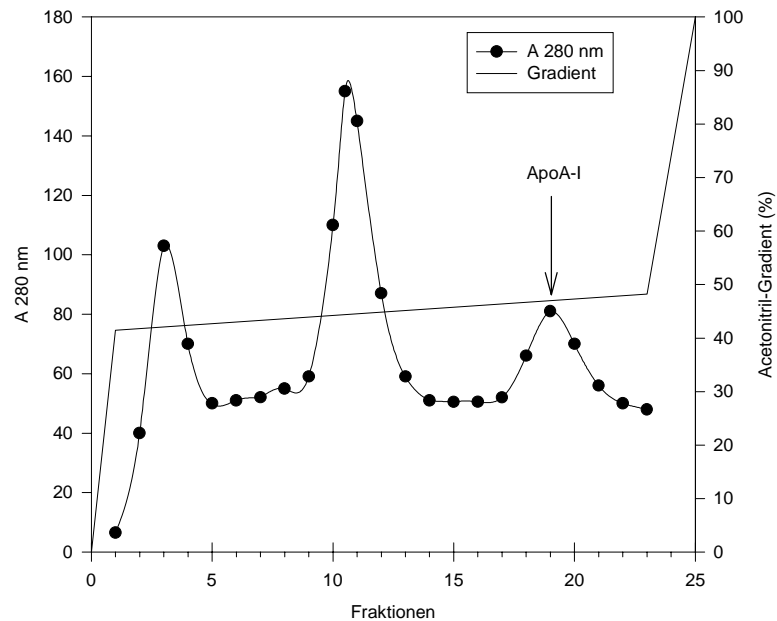


Abbildung 39: Darstellung des Gradienten zur Isolation von ApoA-I mittels Reversed Phase Chromatographie. Für die weiteren Experimente wurden die Fraktionen 18-21 mit anderen Chromatographieläufen vereinigt.

Ca. 50 µg Protein wurde in 1 ml des entsprechenden Solvents gelöst und für den Inkubationsansatz verwendet. Die verwendeten Solventien waren: 1. Bidestilliertes Wasser, 2. PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung), 3. 50% Acetonitril/0,1% TFA, 4. 10% Glycerin und 5. 50% Glycerin. Alle Lösungen und Materialien wurden vor Benutzung bei 121°C autoklaviert, um eine Verunreinigung durch Proteasen in den Lösungen zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, zu den in den Abbildungen angegebenen Zeitpunkten (0 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden, 144 Stunden) wurden Aliquots entnommen. Diese wurden sofort mit denaturierendem SDS-Probenpuffer versetzt und die Proben bis zur weiteren Analyse im SDS-Gel und Immunoblot bei -80°C eingefroren.

Die Auswirkung der unterschiedlichen Solventien auf die Stabilität von ApoA-I ist in Abbildung 40A nach Analyse in einem SDS-Gel mit anschließender Silberfärbung und in Abbildung 40B nach Immunoblotanalyse dargestellt.

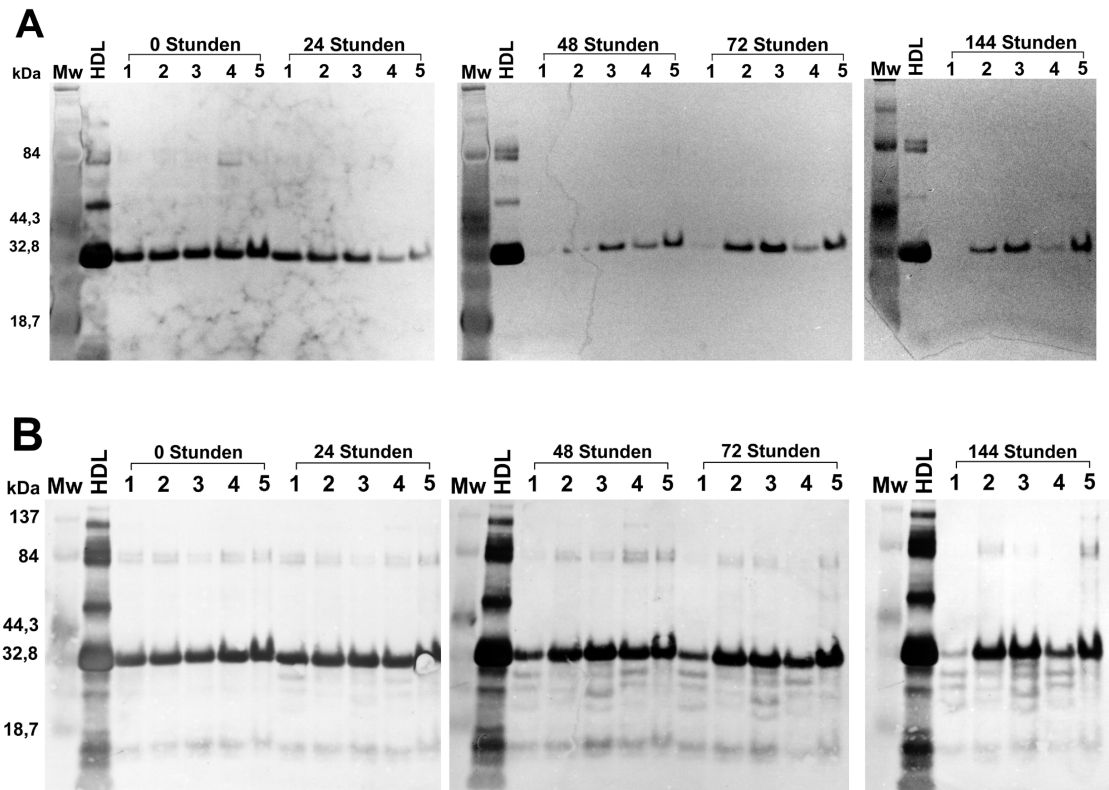


Abbildung 40: Apo A-I wurde in verschiedenen Solventien aufgenommen und bei 37°C inkubiert. Aliquots wurden zu den dargestellten Zeitpunkten entnommen und in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel bzw. Immunoblot analysiert. **A**: 15% SDS-PAAGE nach Silberfärbung **B**: Westernblot mit polyklonalem Anti.ApoA-I-Antikörper. Dargestellt sind: MW: Molekulargewichtsstandard; HDL: Mittels Ultrazentrifugation isoliertes HDL von humanem Plasma. Bahn 1: Bidestilliertes Wasser. Bahn 2: 1xPBS. Bahn 3: 50% Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure. Bahn 4: 10% Glycerin. Bahn 5: 50% Glycerin.

Die Degradation des Proteins wird zum einen deutlich durch das Verschwinden der 28 kDa-Bande im SDS-Gel sowie durch das Erscheinen von Fragmenten des ApoA-I im Westernblot. Die Ergebnisse zeigen, daß das Protein in reinem Wasser besonders schnell degradiert (Bahn 1). Nach 48 Stunden bereits ist nur noch eine sehr schwache 28 kDa-Bande zu erkennen, nach 144 Stunden ist mit der Silberfärbung überhaupt keine 28 kDa-Bande mehr detektierbar. Im Westernblot sind bereits nach 24 Stunden deutlich Fragmente zu erkennen zunächst ein 22 und 10 kDa- Fragment, später dann auch noch andere Bruchstücke. Nach 144 Stunden ist das ursprünglich intakte Protein fast vollständig degradiert. Eine ähnlich schnelle Degradation des ApoA-I wurde auch in 10 % Glycerin beobachtet, jedoch nicht in dem Ausmaß wie in reinem Wasser (Bahn 4). Ein deutlich stabilisierender Effekt wurde mit 50 % Glycerin beobachtet (Bahn 5). Hier lagen auch nach 144 Stunden Inkubation so

gut wie keine Degradationsprodukte vor. Ein mäßig stabilisierender Effekt war sowohl mit PBS-Puffer (Bahn 2) als auch mit Acetonitril (Bahn 3) zu beobachten, wobei der Effekt mit PBS deutlicher war. Interessanterweise führt 50%iges Glycerin zu einer besseren Stabilisierung des Proteins als 10%iges Glycerin.

3.2.3 Inkubation rekombinanten Proteins in Humanserum: Untersuchungen zur Degradation

In einem weiteren *in vitro* Inkubationsansatz sollte überprüft werden inwieweit rApoA-I-FLAG auch während Inkubation mit humanem Serum und damit bei Assoziation mit physiologischen Partikeln proteolytisch abgebaut wird bzw. ob Degradationsprodukte nachweisbar sind. Dazu wurde rApoA-I-FLAG über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 37 °C mit humanem Serum inkubiert und zu den Zeitpunkten 0, 1, 3 und 24 h Proben entnommen. Diese wurden anschließend mittels 15%igem SDS-Gel und anschließendem Westernblot analysiert.

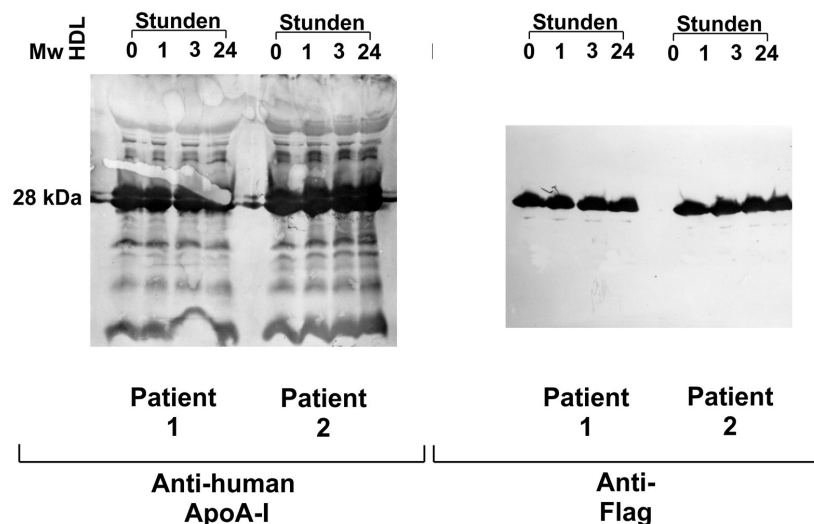


Abbildung 41: Westernblot nach SDS-PAAGE der Fraktionen nach *in vitro* Inkubation von rApoA-I-FLAG in humanem Serum. Patient 1 war normolipämisch, Patient 2 wies einen sehr hohen Triglyzeridspiegel auf.

Abbildung 41 zeigt, daß auch nach 24-stündiger Inkubation des rekombinanten Proteins in humanem Serum keine nennenswerte Zunahme von Degradationsprodukten erfolgt. Die bereits in Abschnitt 3.1.3 gezeigte Assoziation des rApoA-I-FLAG mit der HDL-Fraktion scheint das Protein zu stabilisieren und gegen einen proteolytischen Abbau zu schützen. Somit konnte eindeutig belegt werden, daß rekombinantes rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG nach Inkubation mit humanem Serum korrekt mit der HDL-Fraktion assoziiert sind und daß interessanterweise für HDL-assoziiertes rekombinantes Protein *in vitro* keine nennenswerte Proteolyse im Serum nachzuweisen ist.

3.2.4 Einfluß von ApoA-I-Fragmenten auf die funktionellen Eigenschaften von ApoA-I

Wie bereits beschrieben, waren sowohl bei der Expression als auch bei der Reinigung Fragmente von rApoA-I-WT als auch bei rApoA-I-FLAG in unterschiedlichem Ausmaß nachweisbar. Um den Einfluß dieser Fragmente auf die physiologische ApoA-I Funktion hin zu untersuchen, wurde eine solche isolierte rekombinante rApoA-I-WT Probe, die minimal mit Fragmenten verunreinigt war (Abbildung 42), kinetisch und bezüglich ihrer Assoziation zu HDL *in vivo* analysiert. Die dargestellten Fragmente waren lediglich mittels Immunoblot nachweisbar. Ein dazu korrespondierendes Coomassie gefärbtes SDS-Gel zeigte keinerlei Fragmente.

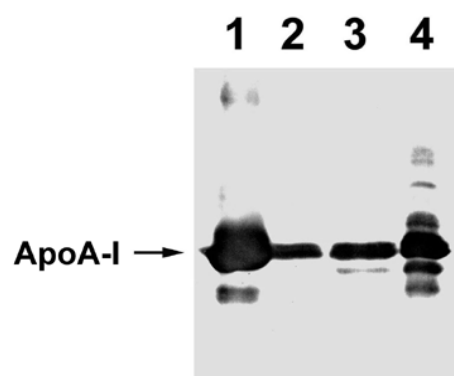


Abbildung 42: Analyse von rekombinanten rApoA-I-WT, exprimiert im Baculovirus-System, mittels Immunoblot. Dargestellt sind ApoA-I isoliert aus humaner HDL (Bahn 1), gereinigtes rekombinantes rApoA-I-WT (Bahnen 2 und 3) und eine gereinigte Probe rekombinanten Proteins, das mit immunologisch detektierbaren Fragmenten verunreinigt ist (Bahn 4). Die Proben wurden in einem 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Zum immunologischen Nachweis wurde ein polyklonaler Anti-ApoA-I-Antikörper verwendet.

Der Anteil des intakten rApoA-I-WT dieser Probe wurde auf 85-90% geschätzt. Nach Radiomarkierung wurde diese Probe ohne weitere HDL-Isolationsschritte in Kaninchen injiziert. Die Radioaktivitätsabklingkurven sind in Abbildung 43 dargestellt.

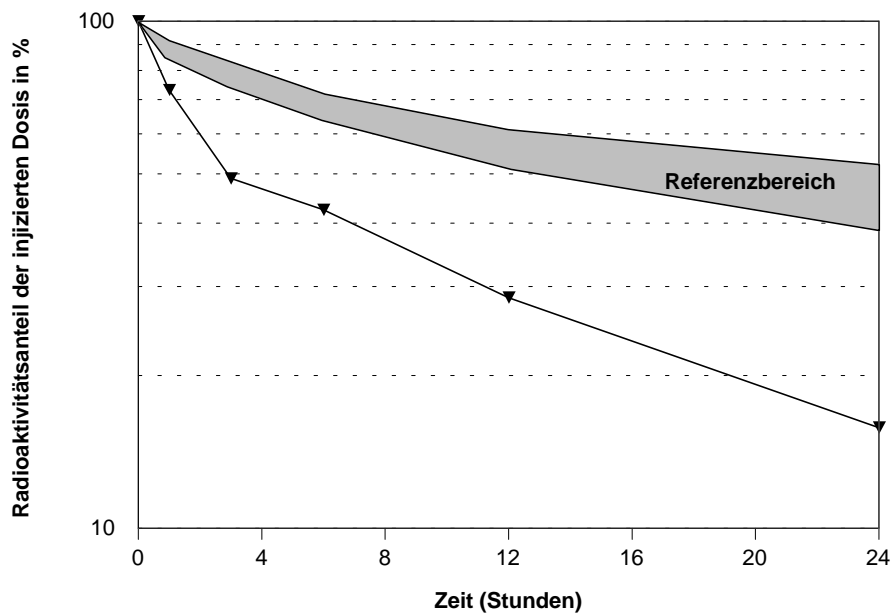


Abbildung 43: In vivo Kinetik einer rApoA-I-WT-Probe aus Sf9-Zellen geringer Kontaminationen an fragmentiertem rApoA-I-WT (▼). Die in vivo Kinetik des fragmentierten Proteins wurde mit Kinetiken hoch aufgereinigten ApoA-I verglichen, die ebenfalls in NZW Kaninchen durchgeführt wurden und den Referenzbereich repräsentieren. Der Katabolismus dieser Probe ist deutlich erhöht.

Der dargestellte Referenzbereich reflektiert die Stoffwechselkinetiken nicht verunreinigter ApoA-I Proben. Diese Untersuchung belegt, daß ApoA-I-Fragmente ein anderes stoffwechselkinetisches Verhalten zeigen und damit die stoffwechselkinetischen Eigenschaften deutlich verändern. Eine dramatische Zunahme des ApoA-I Katabolismus ist damit trotz nur geringfügiger Verunreinigungen belegt.

Um die Assoziation des Proteins und der Fragmente mit den Serumfraktionen zu überprüfen, wurde eine Serumprobe von den Kaninchen gewonnen und an der FPLC mittels einer Superose 6 Säule aufgetrennt (Abbildung 44).

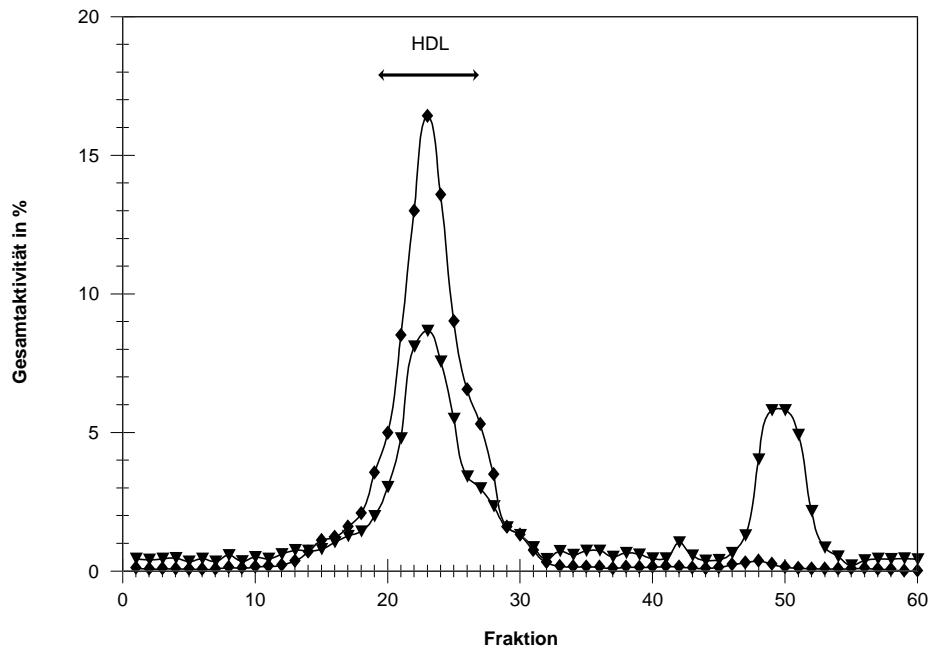


Abbildung 44: FPLC Analyse von Serumproben nach Injektion radioaktiv markierten rekombinanten Proteins aus Sf9-Zellen. Das untersuchte Protein rApoA-I-WT beinhaltete geringe Kontamination mit ApoA-I-Fragmenten. Zur Untersuchung wurden Serumproben dieser Kinetik 1 Stunde nach Injektion gewonnen (▼) und wurden mit Kinetiken hoch gereinigten Proteins (◆) verglichen. Die Radioaktivität der fragmentierten ApoA-I Probe war sowohl mit HDL als auch mit der Nicht-Lipoproteinfraktion (Fraktionen 46-54) assoziiert.

Die Radioaktivität war mit der HDL-Fraktion und zum Teil auch mit der nicht Lipoprotein gebundenen Serumfraktion assoziiert (Fraktionen 46-54). Dies legt die Vermutung nahe, daß die 10-15% Fragmente dieser rApoA-I-WT-Probe primär mit der nicht Lipoprotein gebundenen Serumfraktion assoziiert zu sein scheinen. Die Untersuchung mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation bestätigte diese Beobachtung (Abbildung 45). Hierbei zeigt sich ein verändertes Assoziationsverhalten von rApoA-I-WT, wenn es mit Fragmenten verunreinigt ist. Die Assoziation des markierten Proteins verschiebt sich vom Dichtebereich der HDL₂ (1,063-1,12 g/ml) zu einem Bereich mit höherer Dichte, evtl. auch in den nicht lipidassoziierten Dichtebereich, was jedoch bei dieser Analyse leider nicht erkennbar ist, da die hohen Dichtebereiche nicht erreicht wurden.

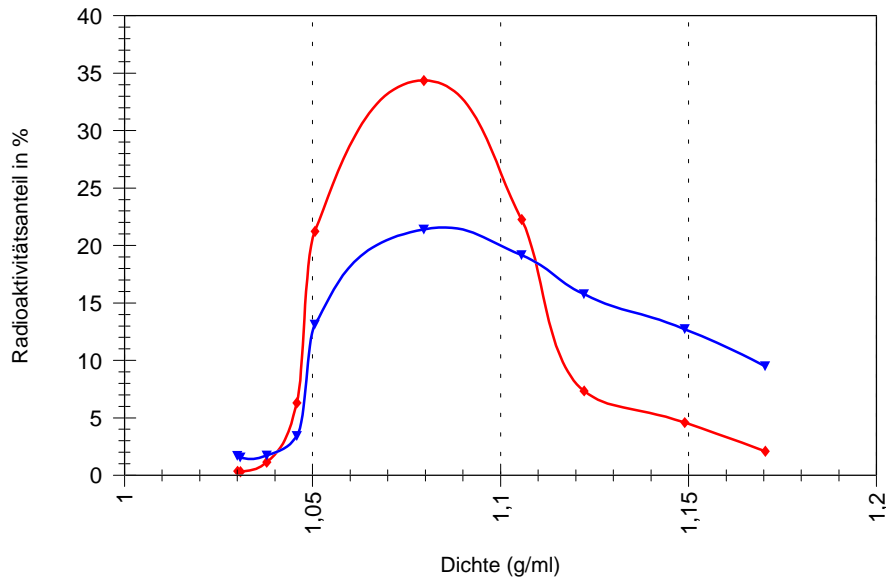


Abbildung 45: Dichte-Ultrazentrifugation von rApoA-I-WT (▼) verunreinigt mit Fragmenten im Vergleich hochreinem ApoA-I (◆). Dargestellt ist die Analyse einer Serumprobe aus Kaninchen, die 1 Stunde nach Injektion gewonnen wurde.

Zusätzlich wurden eine FPLC-Analyse nach Inkubation dieser radiomarkierten rApoA-I-WT-Probe in humanem Serum für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Es konnte wiederum gezeigt werden, daß die proteingebundene Radioaktivität vermehrt mit der nicht Lipoprotein-gebundenen Serumfraktion assoziiert war. Interessanterweise ergab dieses Experiment gleichzeitig einen Shift innerhalb der HDL-Fractionen zu den dichteren HDL-Partikeln hin (siehe Abbildung 46).

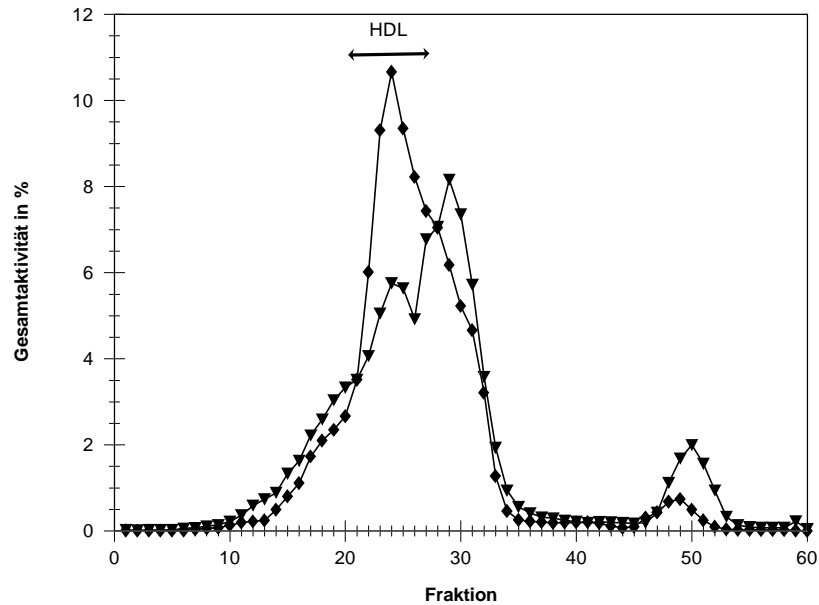


Abbildung 46: FPLC-Analyse nach Inkubation der rApoA-I-WT-Probe in Humanserum. Die Radioaktivitätsverläufe stellen die mit Fragmenten kontaminierte rApoA-I-WT-Probe (▼) bzw. hoch aufgereinigtes rApoA-I-WT (◆) aus Sf9-Zellen dar. Die Proteine wurden 30 Minuten in Humanserum inkubiert und anschließend analysiert. Die Radioaktivität der mit Fragmenten verunreinigten Probe erscheint eher innerhalb der Fraktion dichter HDL-Partikel (Fraktionen 27-33) und in der Fraktion nicht lipidgebundenen Proteins (Fraktionen 47-53).

Die entsprechende Untersuchung mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (Abbildung 47) ergab eine deutlich verschobene Assoziation des rApoA-I mit anderen Subfraktionen des Serums als ApoA-I isoliert aus humaner HDL. Dabei zeigt sich eine Hauptassoziation des rApoA-I-WT mit Teilchen der Dichte 1,09 g/ml (Dichtebereich der HDL₂: 1,063-1,125 g/ml) und eine zweite, sogar noch stärker ausgeprägte Assoziation mit Teilchen der Dichte 1,16 g/ml und darüber (Dichtebereich der HDL₃: 1,125-1,21 g/ml), evtl. auch im Bereich der nicht lipidgebundenen Fraktionen. Leider konnten mit diesem Gradienten keine höheren Dichten erreicht werden, so daß die genaue Bestimmung der Dichte der Partikel nicht möglich war. Diese Untersuchungen legen den Schluß nahe, daß bereits geringe Anteile von ApoA-I Fragmenten zu einer geringeren Assoziation mit der HDL₂- und HDL₃-Fraktion führen, das wiederum einen beschleunigten *in vivo* Katabolismus des ApoA-I bedingt.

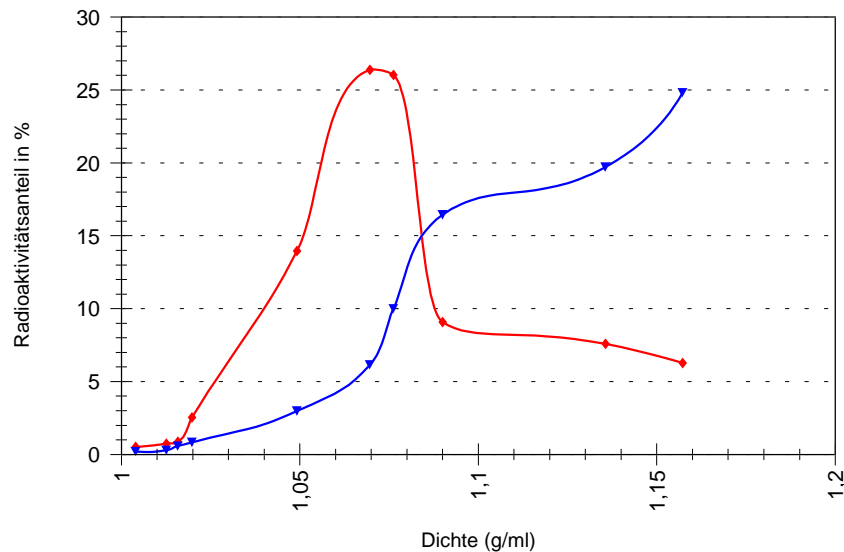


Abbildung 47: Dichtegradienten-Ultrazentrifugationsanalyse einer rApoA-I-WT-Probe (▼), die mit Fragmenten kontaminiert war. Die analysierte Probe wurde nach 30 minütiger Inkubation von rApoA-I-WT und hoch aufgereinigtem ApoA-I (◆) in Humanserum gewonnen und anschließend im Dichtegradienten untersucht.

3.2.5 Charakterisierung eines Fragmentes aus der RPC mittels Massenspektrum

Für eine weitere Charakterisierung der bei der Proteolyse auftretenden Fragmente von rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG sollten Degradationsprodukte mittels Reversed Phase Chromatographie isoliert und anschließend durch Proteinsequenzierung und Massenbestimmung näher untersucht werden. Die über Reversed Phase Chromatographie angereicherten Fragmente sind in Abbildung 48 und Abbildung 49 dargestellt. Die bei der Chromatographie erhaltenen Fraktionen wurden mit Western Blot auf immunreaktive Fragmente hin untersucht. Die relevanten Fraktionen sind in den Darstellungen mit einem Pfeil gekennzeichnet, sie wurden lyophilisiert und anschließend in Zusammenarbeit mit dem Institut für Peptidforschung analysiert.

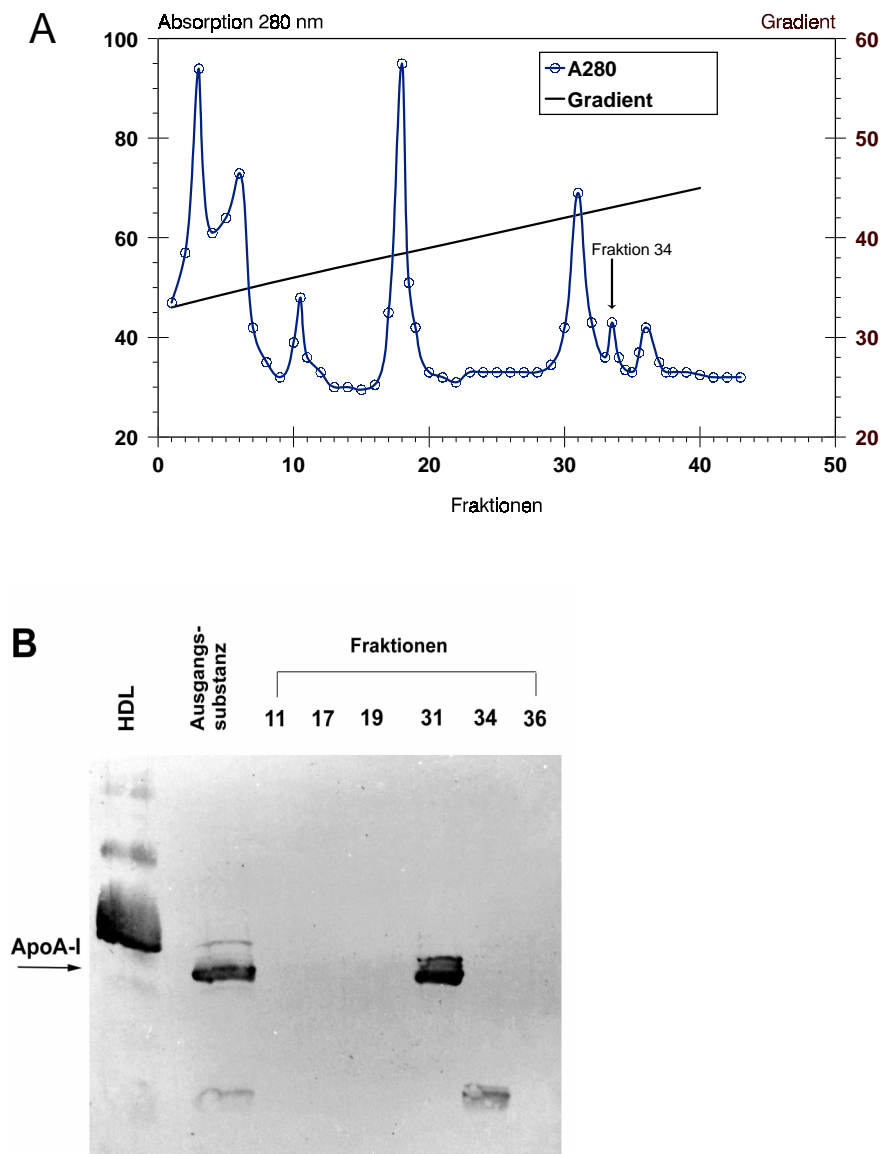


Abbildung 48: A: Elutionsprofil der Reversed Phase Chromatographie zur Isolierung der untersuchten Fragmente nach Expression von rApoA-I-WT. Es wurde mit einem linearen Elutionsgradienten von Acetonitril/0,1% TFA gearbeitet. B: Analyse der Fraktionen mittels Western Blot unter Verwendung eines polyklonalen Anti-ApoA-I-Antikörpers.

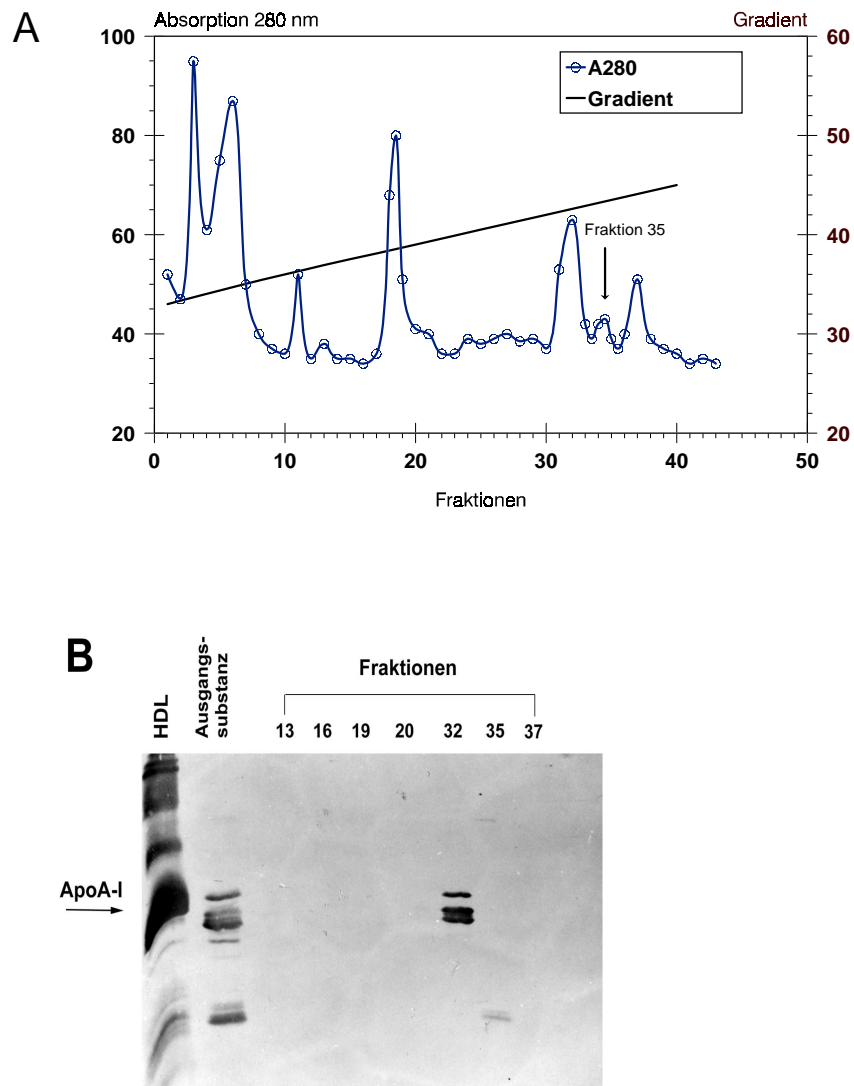


Abbildung 49: A. Elutionsprofil der Reversed Phase Chromatographie zur Isolierung der untersuchten Fragmente nach Expression von rApoA-I-FLAG. Es wurde mit einem linearen Elutionsgradienten von Acetonitril/0,1% TFA gearbeitet. B: Analyse der Fraktionen mittels Western Blot unter Verwendung eines Anti-ApoA-I-Antikörpers.

Die anschließende massenspektroskopische Analyse der Fragmente ergab ein identisches Molekulargewicht von $14698 \pm 2,5$ Dalton für rApoA-I-WT bzw. $14697 \pm 4,5$ Dalton für rApoA-I-FLAG (Abbildung 50).

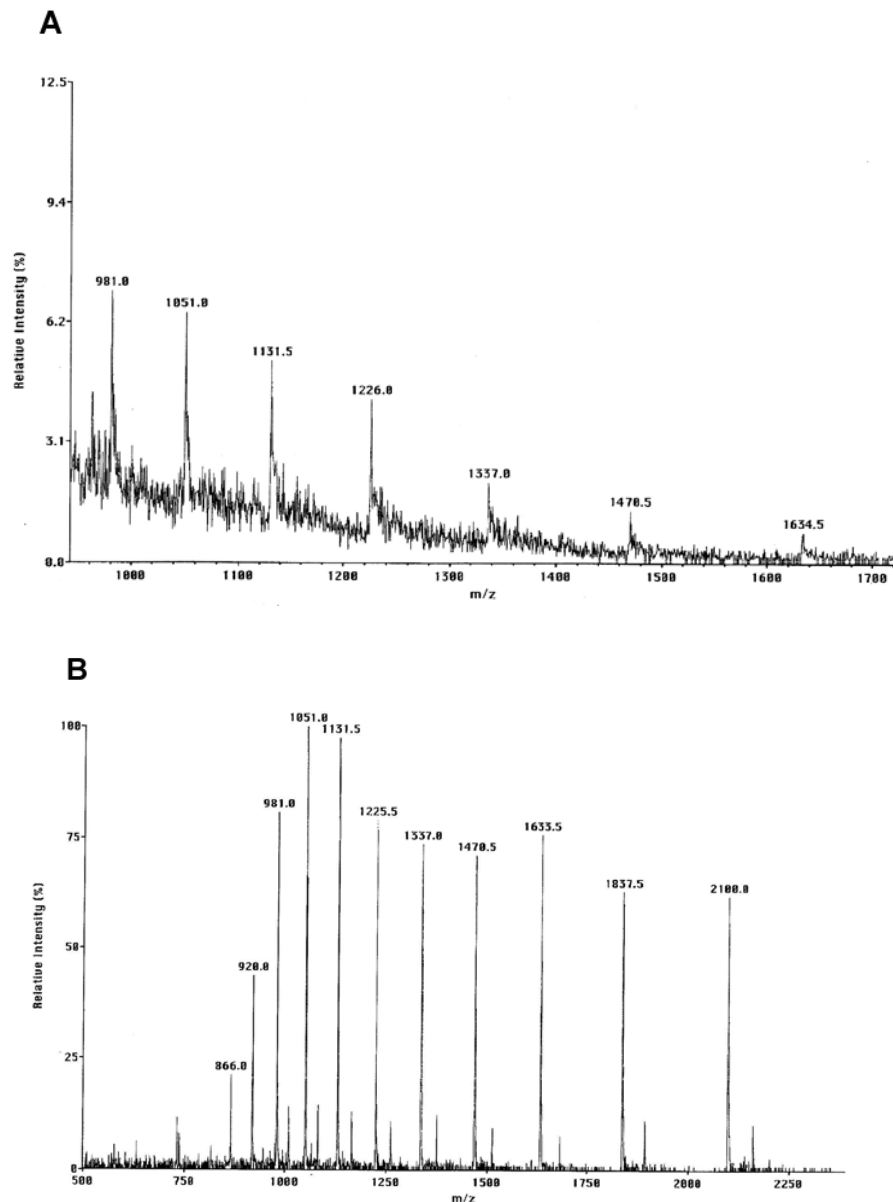


Abbildung 50: Darstellung der Peakanalyse der massenspektroskopisch untersuchten Fragmente. A: Peakanalyse des Fragmentes von rApoA-I-WT. B: Peakanalyse des rApoA-I-FLAG-Fragmentes.

Die N-terminale Sequenzierung konnte vermutlich aufgrund einer Acylierung oder Formulierung des bei den rekombinanten Proteinen vorhandenen Methionins nicht durchgeführt werden. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.1 belegen jedoch eindeutig, daß eine proteolytische Spaltung des ApoA-I offensichtlich am C-terminalen Ende des Proteins erfolgt. Unter Voraussetzung dieser Annahme entsprechen die Molekulargewichte einem N-terminalen Bruchstück mit der Aminosäuresequenz von 1-124 unter der Annahme, daß entweder

- a) zwei Methioninreste der Sequenz oxidiert sind, oder
- b) eine N-terminale Acetylierung vorliegt ohne Oxidation eines Methioninrestes, oder
- c) das Fragment N-terminal formyliert ist und ein Methioninrest oxidiert vorliegt.

3.3 Transgen exprimiertes ApoA-I in Kaninchen

Als eine alternative Möglichkeit, Einblicke in den Stoffwechsel und gegebenenfalls die potentiellen Degradationsorte von ApoA-I zu erlangen, boten transgene New Zealand White Kaninchen (NZW), die humanes ApoA-I (hApoA-I) exprimieren. Sie wurden uns von Dr. N. Duverger zur Verfügung gestellt (persönliches Geschenk). Die für die Mikroinjektion verwendete genomische DNA wurde aus einem zuvor beschriebenen Fragment aus einer DNA-Bank erhalten und in einen Bakteriophagen eingefügt. Die DNA wurde in die Embryonen injiziert und diese in pseudoschwangere Kaninchen implantiert [108]. Die Kaninchen exprimieren zwischen 80 und 150 mg/dl humanes ApoA-I. Diese Kaninchen wurden stoffwechselkinetisch sowie immunhistologisch untersucht.

3.3.1 In vivo Charakterisierung humanen und Kaninchen-ApoA-I

Die transgenen Tiere exprimieren humanes ApoA-I (hApoA-I) in erheblichem Maße. Die Serumspiegel des humanem ApoA-I der Tiere wurden nephelometrisch bestimmt. Da bei dieser Methode Antikörper verwendet werden, die im Kaninchen hergestellt sind, reflektieren die in Tabelle 5 angegebenen Expressionsraten nur die Höhe des transgen exprimierten hApoA-I. Der durchschnittliche ApoA-I-Serumspiegel im Menschen liegt bei 80-160 mg/dl, somit liegt die Expressionsrate bei exprimierenden Tieren im gleichen Bereich wie beim Menschen.

Kaninchen- Nummer	Expressionsrate ApoA-I (mg/dl)
8180	< 0,7
8186	< 0,7
8178	150
8181	120
8199	130
8204	100

Tabelle 5: Expression von humanem ApoA-I in den transgenen ApoA-I-Kaninchen. Die Werte wurden durch Messung am Nephelometer ermittelt.

Für die stoffwechselkinetischen Untersuchungen wurde sowohl humanes ApoA-I als auch Kaninchen-ApoA-I aus dem jeweiligen Serum mittels Ultrazentrifugation und nachfolgender präparativer Elektrophorese isoliert. Die isolierten Proteine wurden radiomarkiert und simultan in die transgenen Kaninchen injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion wurden Serumproben entnommen und auf ihre Radioaktivitätsverteilung untersucht.

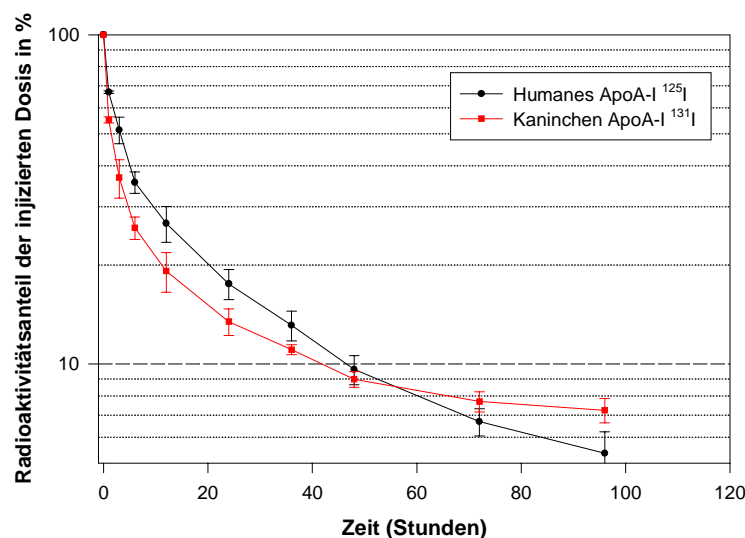


Abbildung 51: In vivo Kinetik des radiomarkierten ¹²⁵I-Human-ApoA-I und ¹³¹I-Kaninchen-ApoA-I nach Injektion in transgene hApoA-I-Kaninchen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten.

Abbildung 51 zeigt den Anteil der Radioaktivität im Serum der Kaninchen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion der markierten Proteine. Interessanterweise bestand ein konstant reproduzierbarer langsamerer Metabolismus in der initialen Phase des humanen ApoA-I im Vergleich zum Kaninchen-ApoA-I, während in der späteren Phase der Kinetik humanes ApoA-I schneller katabolisiert wird. Hieraus wird ersichtlich, daß das humane ApoA-I im transgenen hApoA-I-Kaninchen ähnlich, jedoch nicht identisch verstoffwechselt wird im Vergleich zu Kaninchen-ApoA-I. Die Radioaktivitätsablenkkurven legen das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Partikelpools nahe, mit denen die beiden Proteine in unterschiedlichem Anteil assoziiert sind und die unterschiedlich verstoffwechselt werden. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Seren mittels FPLC-Analyse und Dichtegradienten-Ultrazentrifugation untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 und Abbildung 53 dargestellt.

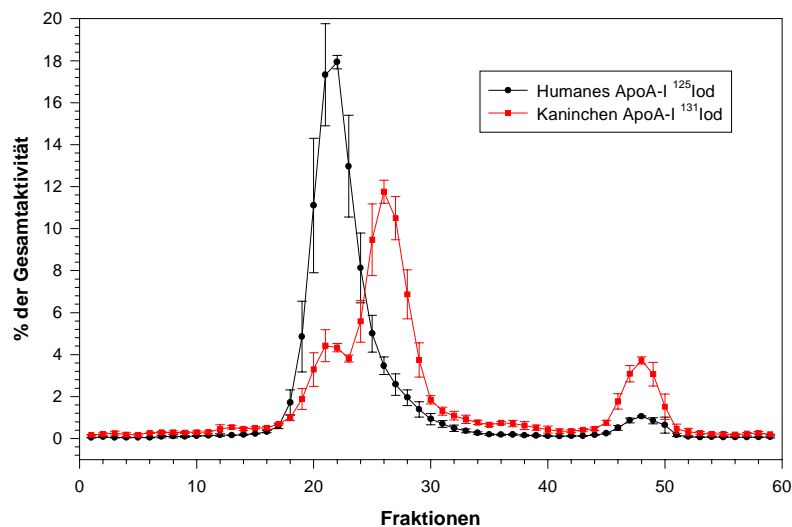


Abbildung 52: FPLC-Analyse des Kaninchenserums nach Injektion der markierten Proteine ¹²⁵I-hApoA-I und ¹³¹I-Kaninchen-ApoA-I. Die Daten wurden über alle Tiere 5 Minuten nach Injektion der radioaktiv markierten Proben gemittelt.

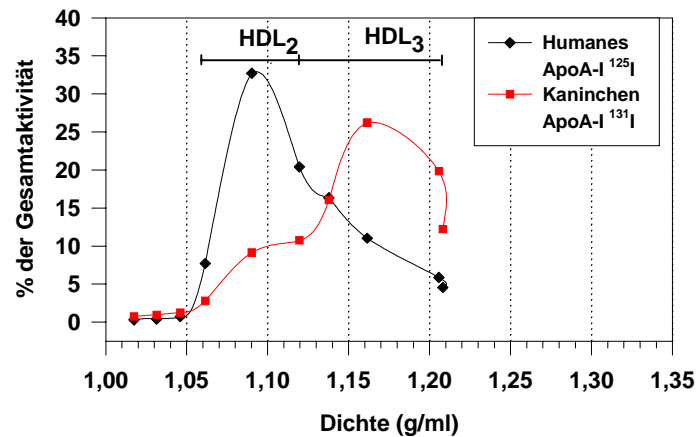


Abbildung 53: Dichtegradienten-Ultrazentrifugationsanalyse nach Injektion der markierten Proteine ¹²⁵I-human-ApoA-I und ¹³¹I-Kaninchen-ApoA-I. Exemplarisch dargestellt ist eine Serumprobe, die 1 Stunde nach Injektion der radiomarkierten Proteine gewonnen wurde.

Auch die FPLC- und Dichtegradienten-UZ-Analyse der Seren bestätigen die Annahme, daß das humane ApoA-I mit einer anderen Lipoprotein-Subfraktion assoziiert ist als das Kaninchen-ApoA-I. Humanes ApoA-I ist offenbar mit einem in Größe und Dichte dem humanen HDL₂ entsprechenden Partikelchen assoziiert, während das Kaninchen-ApoA-I mit einem kleineren und dichteren Partikelchen assoziiert ist, das eher die HDL₃-Fraktion repräsentiert.

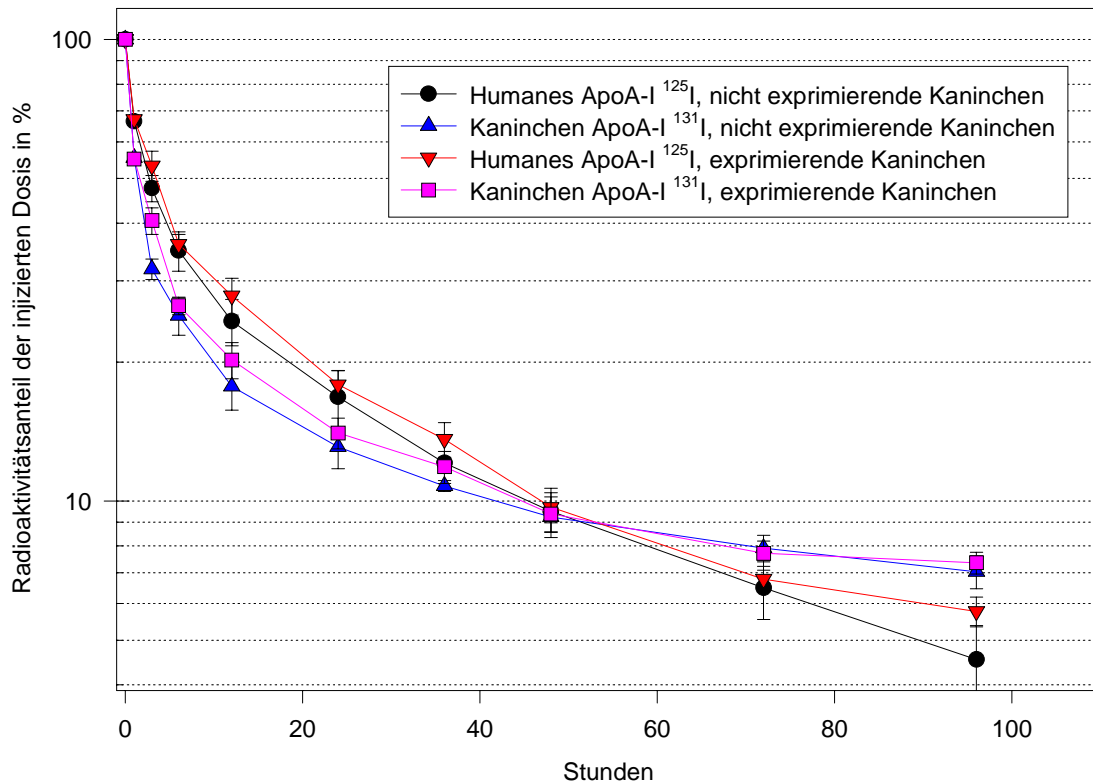


Abbildung 54: Darstellung der *in vivo* Kinetiken differenziert nach humanes ApoA-I exprimierenden und nicht exprimierenden Kaninchen. Die Darstellungen repräsentieren für die nicht exprimierenden Kaninchen den Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten, für die exprimierenden Kaninchen von vier unabhängigen Experimenten.

Eine genauere Betrachtung der Kinetiken, die eventuell vorhandene Unterschiede im Stoffwechsel zwischen exprimierenden und nicht exprimierenden transgenen Kaninchen aufzeigen könnte, ist in Abbildung 54 dargestellt. Interessanterweise zeigt die differenzierte Untersuchung der Kinetikdaten keine wesentlichen Unterschiede im Stoffwechsel zwischen humanes ApoA-I exprimierenden und nicht exprimierenden Kaninchen. Letztlich kann nur ein geringfügig verlangsamter Katabolismus beider markierter Proteine in transgenen Kaninchen beobachtet werden, allerdings erscheinen diese Unterschiede nicht signifikant. Grundsätzlich ist die Verstoffwechslung offensichtlich unabhängig vom Serumspiegel des vorhandenen Proteins.

3.3.2 Immunhistochemische Untersuchung

Die im weiteren durchgeführten Untersuchungen an den transgenen Tieren wurden auf histologischer Basis durchgeführt. Dabei sollten im wesentlichen Auskünfte über den Katabolismus des ApoA-I und mögliche Degradationsorte erhalten werden.

3.3.2.1 Testen verschiedener monoklonaler Antikörper in Hinsicht auf die Kreuzreaktion mit Kaninchen-ApoA-I

Um das transgen exprimierte humane hApoA-I spezifisch nachweisen zu können, mußte ein Antikörper gefunden werden, der keine Kreuzreaktion mit dem kanincheneigenen ApoA-I aufwies. Dazu wurden vier uns freundlicherweise von der Firma Bayer zur Verfügung gestellte monoklonale Antikörper auf ihre Spezifität hin getestet. Das Serum von Kaninchen und vom Menschen wurde auf ein 15%iges SDS-PAAGE aufgetragen und die aufgetrennten Proteine anschließend auf Nitrozellulose geblottet. Danach wurde die Immunfärbung der Blots mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern durchgeführt. Der Immunoblot des letztendlich in den Immunhistochemien verwendeten Antikörpers ist in Abbildung 55 dargestellt. Er zeigt keine Kreuzreaktion mit dem ApoA-I Kaninchen.

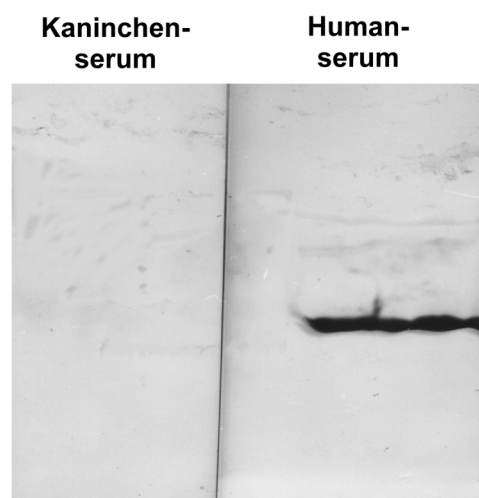


Abbildung 55: Western-Blot-Analyse zum Testen der Kreuzreaktivität eines monoklonalen, gegen humanes ApoA-I gerichteten Antikörpers mit ApoA-I aus Kaninchen (Antikörper 307-2).

3.3.2.2 Immunhistochemien verschiedener Organe

Zum Nachweis der Lokalisation des humanen hApoA-I in den transgenen Kaninchen wurden den Kaninchen Gewebeproben entnommen, Gefrierschnitte angefertigt und diese mit für humanes ApoA-I spezifischen, zuvor getesteten monoklonalen Antikörpern gefärbt. Abbildung 56 zeigt Gefrierschnitte von Lebergewebe von jeweils einem NZW-Kaninchen (Kontrolle) und einem transgenen hApoA-I-Kaninchen. Die obere Reihe zeigt eine Immunfärbung der Gefrierschnitte, bei denen der spezifische Primärantikörper weggelassen wurde. Die Schnitte weisen dabei eine charakteristische blau-violette Färbung auf. Diese Versuchsreihe diente als Negativ-Kontrolle um auszuschließen, daß unspezifische Reaktionen seitens des Sekundärantikörpers mit dem Gewebe vorliegen. In der zweiten Reihe wurden die Schnitte mit einem polyklonalen Anti-human-ApoA-I Primärantikörper inkubiert. Da dieser Antikörper an mehrere Epitope auf dem Protein bindet, reagiert er sowohl spezifisch mit humanem ApoA-I als auch mit Kaninchen-ApoA-I. Beide Schnitte zeigen hier eine charakteristische Rotfärbung, die jedoch aufgrund des hohen Serumspiegels an ApoA-I für das transgene Kaninchen sehr viel stärker ausgeprägt ist. In der dritten Reihe wurden die Gefrierschnitte mit einem spezifischen monoklonalen Anti-ApoA-I-Primärantikörper inkubiert, der keine Kreuzreaktion mit Kaninchen-ApoA-I zeigt. Hier zeigt nur der Gefrierschnitt des transgenen Kaninchens eine deutliche Rotfärbung, während die Immunfärbung für das NZW-Kaninchen negativ ausfällt.

Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für die Organe Niere und Milz erbracht werden. Eine differenzierte Lokalisation des Proteins in bestimmten Zellen konnte bisher mit der Technik der Immunhistologie nicht erreicht werden.

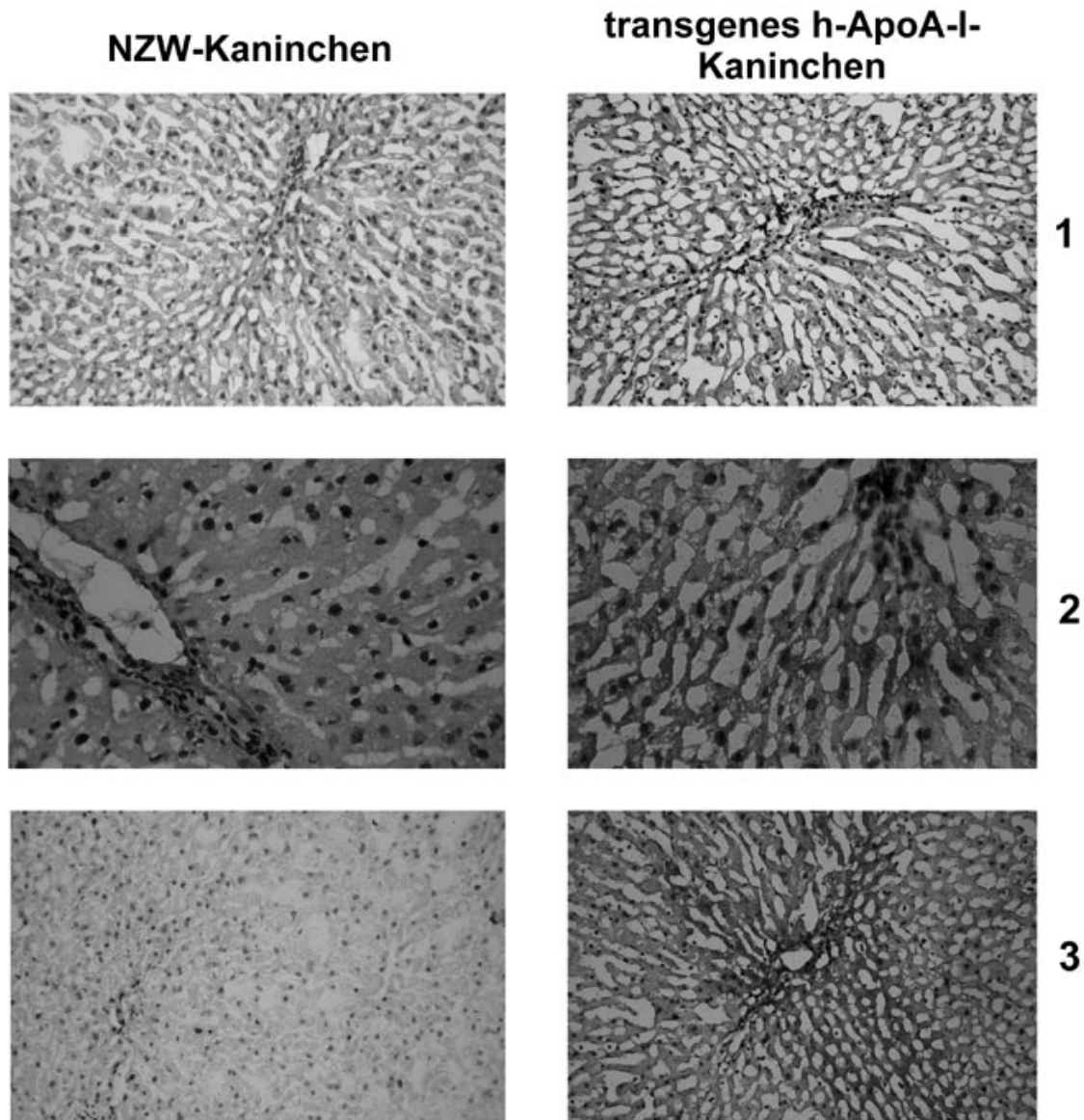


Abbildung 56: Histologische Untersuchung von Gefrierschnitten von Lebergewebe eines normalen NZW-Kaninchens sowie eines transgenen hApoA-I-Kaninchens. 1: Negativ-Kontrolle, Färbung ohne spezifischen Primärantikörper; 2: Färbung mit einem polyklonalen Antikörper gegen humanes ApoA-I; 3: Färbung mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen humanes ApoA-I.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ApoA-I rekombinant in einer Insektenzelllinie exprimiert, charakterisiert und auf das Verhalten *in vivo* im Kaninchenmodell untersucht. Anschließend wurden neue Ergebnisse im Bereich der Proteolyse des Proteins und zum Katabolismus von Fragmenten gesammelt und dargestellt. Zusätzlich bot sich die Möglichkeit, in transgenen, humanes ApoA-I exprimierenden Kaninchen Untersuchungen zum Degradationsort *in vivo* durchzuführen. Dadurch konnte das Verständnis zum ApoA-I-Katabolismus deutlich verbessert werden.

4.1 Apolipoprotein A-I

Hydrophobe Substanzen bedürfen im wasserlöslichen Medium wie z.B. im Serum einer Lösungsvermittlung, um transportabel zu sein. Ähnlich wie bei den micellären Strukturen im Intestinum gibt es im Serum sog. Lipoprotein-Partikel, die lipophile Substrate wie Triglyzeride und Cholesterinester transportieren. Diese sind wiederum von polaren Substanzen wie Cholesterin und Phospholipiden sowie amphiphilen Proteinen, den sog. Apolipoproteinen, umgeben. Die Lipoproteine werden aufgrund ihrer Dichte und Zusammensetzung in unterschiedliche Klassen eingeteilt (siehe Einleitung).

Für das *High Density Lipoprotein* (HDL)-Partikel ist belegt, daß es für den sogenannten reversen Cholesterintransport von peripheren Körperzellen zur Leber verantwortlich ist [109-111]. Nur die Leber ist in der Lage, Cholesterin in Form von wasserlöslichen Gallensäuren und freiem Cholesterin aus dem Körper auszuscheiden. Von daher repräsentiert der reverse Cholesterintransport die einzige Möglichkeit des Organismus, um Cholesterin zur Leber zu transportieren und damit die Modifikation und letztlich die Ausscheidung des Cholesterins zu ermöglichen. Insofern sind hohe HDL-Serumkonzentrationen negativ mit der Entstehung einer Koronarsklerose verknüpft: HDL spielt daher als antiarterogener Faktor eine besondere physiologische Rolle [59, 70, 112, 113]. Weitere protektive Eigenschaften der HDL stellen die Modulation des Vasomotoren-Tonus [114, 115] sowie der Schutz der LDL vor Oxidation, vermutlich durch das HDL-ständige Enzym Paraoxonase, dar [116-119].

Als Hauptstrukturprotein der HDL konnte das Apolipoprotein A-I (ApoA-I) identifiziert werden [6, 120]; daneben kommen in der HDL noch die Apolipoproteine A-II, C und E vor, die jedoch in deutlich geringeren Konzentrationen mit den HDL assoziiert sind. ApoA-I spielt vermutlich als Ligand für HDL-Rezeptoren eine Rolle, ebenso ist das Apolipoprotein von besonderer Bedeutung als Kofaktor für die HDL-ständige LCAT, die die Veresterung des Cholesterins katalysiert [121].

Der HDL-Serumspiegel hängt eng mit Synthese und Katabolismus des ApoA-I zusammen. So konnte im Fall eines erhöhten Katabolismus von ApoA-I ein niedriger HDL-Serumspiegel gemessen werden, umgekehrt konnte eine erhöhte Syntheserate als primäre Ursache für eine erhöhte HDL-Serumfraktion identifiziert werden [83, 85, 86, 122]. Trotz zahlreicher Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des ApoA-I scheint der Katabolismus des Proteins für die HDL-Serumkonzentration entscheidend zu sein [123, 124]. Dabei sieht es so aus, als ob der Prozeß des Lipidtransfers und damit die Lipidkomposition der HDL eine Rolle spielen [125, 126]. In diesem Zusammenhang sind weitere Proteine wie Apolipoprotein A-II (ApoA-II), Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, Lipoprotein-Lipase, Hepatische Lipase sowie das Cholesterinester-Transferprotein bedeutend, die die Lipidzusammensetzung der HDL beeinflussen [127-129].

4.2 Rekombinantes ApoA-I: Expression und Charakterisierung

Eine erfolgreiche Proteinexpression wurde bereits 1977 beschrieben [130, 131]. Seitdem hat diese Technik die gesamte Proteinanalytik beeinflusst, da es mit dieser Methode möglich ist, selbst Proteine, die in der Natur nur in geringen Mengen vorkommen, in größerem Maßstab zu synthetisieren, zu isolieren und zu untersuchen. Auch die Expression von Proteinen, die sonst in größerer Menge verfügbar sind, hat gegenüber natürlich vorkommendem Material den Vorteil, daß die Expressions- und Anreicherungsbedingungen standardisiert werden können, so daß physiologisch immer vorhandene Schwankungen ausgeschlossen werden können. Zellkultur bietet weiterhin den Vorteil, daß in derselben der Einfluß vieler Substanzen auf Proteinexpression oder -stabilität getestet werden können, was im humanen System vielfach nicht möglich ist. Die *in vitro* Synthese von Proteinen bietet zusätzlich die Möglichkeit, sowohl natürlich vorkommende als auch künstliche Mutationen in das

Protein einzuführen und diese dann in ihrer Wirkung auf Sekundärstruktur, physiologisches Verhalten usw. zu untersuchen. Durch eine geeignete Wahl der Expressionsbedingungen kann das gesuchte Protein oftmals bereits ohne große Verunreinigungen an Fremdproteinen vorliegen.

Die Expression von ApoA-I wurde bereits in mehreren Zelllinien beschrieben so z.B. in *E. coli* [132] und CHO-Zellen [133, 134]. Prokariotische Zelllinien besitzen den Vorteil, daß mit ihnen sehr schnell große Proteinmengen synthetisiert werden können. Der Nachteil ist, daß posttranslationale Modifikationen von den Bakterien nicht durchgeführt werden. Es gibt jedoch Hinweise, daß ApoA-I sowohl acyliert als auch phosphoryliert posttranslational modifiziert vorliegt [135, 136], wobei die Bedeutung dieser Veränderungen für den ApoA-I-Stoffwechsel unbekannt ist. Wie Schmidt *et al.* berichten, zeigt in *E. coli* und eukariontischen Systemen exprimiertes rekombinantes ApoA-I in Stoffwechselkinetiken die gleichen Eigenschaften wie das natürlich vorkommende ApoA-I, was darauf hindeutet, daß diese posttranslationalen Modifikationen zumindestens für die Verstoffwechslung des Proteins keine Rolle spielen [137].

Bei der Proteinexpression in eukariontischen Zelllinien können diese Modifikationen durchgeführt werden. Für eine dauerhafte Expression muß eine stabile Zelllinie etabliert werden, die das interessierende Gen in das Genom integriert hat, was unter Umständen Zeit in Anspruch nehmen kann. Luckow und Summers beschrieben 1988 ein System, bei dem eine Insektenzelllinie mit einem rekombinanten Baculovirus infiziert wird [138]. Diese Methode vereint die Vorteile beider Systeme, nämlich die Schnelligkeit bis zur Proteinexpression und die Möglichkeit der posttranslationalen Modifikationen durch die Expression in einem eukariontischen System. Aus diesem Grund wurde dieses System für eine ApoA-I-Expression ausgewählt. Gleichzeitig mit uns etablierten Pyle *et al.* und Sorci-Thomas *et al.* eine erfolgreiche Expression des Proteins in Sf9-Zellen [139, 140].

In der vorliegenden Arbeit wurde reifes ApoA-I, im weiteren als rApoA-I-WT bezeichnet, ohne Präpropeptid in den Zellen exprimiert. Dies führte zu einer aminoterminalen Addition der Aminosäure Methionin. Zudem verblieb das Protein intrazellulär und wurde nicht in den Extrazellularraum sezerniert. Dies bot den Vorteil, daß bei der Wahl des Expressionsmediums nicht auf serumfreie Kultivierungsbedingungen geachtet werden mußte, denn durch die Zugabe von FCS

zum Medium kommt es auch zu einer Zugabe von im FCS enthaltenen bovinen ApoA-I. Probleme in dieser Hinsicht sind aus der Literatur bekannt [141]. Die Expression in den Zellen ermöglichte eine einfache Proteinernte; Kontaminationen von bovinen ApoA-I aus dem Kulturmedium konnten durch mehrfaches Waschen der Zellen vermieden werden. Allerdings wurde bei der anschließenden Lyse der Zellen nicht nur das rekombinante ApoA-I freigesetzt, sondern ebenfalls die zelleigenen Proteasen, was teilweise zu einer rasch einsetzenden Degradation des Proteins führte. Auf dieses Problem soll jedoch erst im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ApoA-I-Fragmente, die beim proteolytischen Abbau entstehen, zu untersuchen. Dabei wurde von einer C-terminalen Proteolyse ausgegangen. Leider gibt es jedoch gegen die C-terminale Aminosäuresequenz von ApoA-I im Abschnitt von den Aminosäuren 230-243 keine spezifischen Antikörper, sodaß der immunologische Nachweis von C-terminalen Fragmenten nicht möglich ist. Einer der Gründe für die Schwierigkeit Antikörper herzustellen liegt vermutlich in einer Sequenzhomologie zu ApoA-II in diesem Abschnitt. Zusätzlich ist wahrscheinlich dieser Sequenzabschnitt im nativen Zustand für Antikörper schwer erkennbar [142]. Deshalb wurde neben der Expression des WT-Proteins ein weiteres, am C-Terminus modifiziertes ApoA-I hergestellt. Die Modifikation besteht aus einem Oktapeptid aus 8 hydrophilen Aminosäuren und wird als FLAG-Sequenz bezeichnet; im weiteren wird das Fusionsprotein rApoA-I-FLAG genannt. Die funktionellen Eigenschaften von ApoA-I wie Lipidbindung, Aktivierung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase sowie die Interaktion mit dem postulierten HDL Rezeptor sind insbesondere Funktionen des mittleren und C-terminalen Anteils von ApoA-I. Diese Bereiche zeichnen sich durch amphipatische Helices mit einem hydrophilen C-terminalen Ende aus, so daß eine Fusion mit einer hydrophilen FLAG-Sequenz, die dann in das umgebende hydrophile Medium des Blutes ragen würde, diese funktionellen Eigenschaften von ApoA-I nicht beeinflussen sollte. Der große Vorteil dieses Oktapeptids ist das Vorliegen von hochspezifischen Antikörpern, die mit der Zielsequenz reagieren [143].

Die primäre Charakterisierung der Proteine erfolgte mit einem 15%igen SDS-Gel und einem Immunoblot. Dabei zeigten sowohl das rApoA-I-WT als auch das rApoA-I-FLAG die erwartete Proteingröße: Das Wildtyp-Protein wies eine Masse von 28 kDa auf, die dem reifen ApoA-I entspricht. In den Darstellungen ist deutlich neben den zellulären Proteinen das Auftreten einer starken Proteinbande von der

erforderlichen Größe zu beobachten. Das Oktapeptid vergrößerte das Molekulargewicht um 1 kDa, sodaß das Gesamtgewicht des Fusionsproteins 29 kDa betrug. Die Proteinbande in der SDS-PAAGE ist deutlich sichtbar verschoben. Im Immunoblot nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im 15%igen SDS-Gel konnte die spezifische Reaktion beider Proteine mit dem polyklonalen Antikörper gegen ApoA-I gezeigt werden. Dabei zeigte sich knapp unterhalb der Proteinhauptbande eine zweite, schwächere Bande. Hierbei handelt es sich vermutlich bereits um ein Degradationsprodukt des ApoA-I. Der monoklonale Antikörper gegen die FLAG-Sequenz reagierte erwartungsgemäß nur mit dem Fusionsprotein und zeigte auch keinerlei Kreuzreaktion mit anderen Epitopen des ApoA-I oder mit den übrigen noch vorhandenen zellulären Proteinen der Insektenzelllinie. Dies bestätigte die hohe Spezifität des Antikörpers.

Eine weitere Charakterisierung wurde mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Bande des rApoA-I-WT mit der des Desaminierungsproduktes des ApoA-I-Standards aus humanem Serum zusammenfiel. Für rApoA-I-FLAG ergab sich durch die zusätzlich eingeführten Aminosäuren des Oktapeptids eine rechnerische Ladungsänderung von 4 Einheiten in Richtung der Kathode, die sich auch im IEF-Gel bestätigen ließ. Als weitere Bestätigung der Integrität der Proteine wurden diese in Zusammenarbeit mit dem Institut für Peptidforschung nach Anreicherung N-terminal ansequenziert. Dabei konnte wie erwartet die N-terminale Sequenz von MDEPP für beide rekombinanten Proteine bestätigt werden.

Um festzustellen, ob sich die rekombinant exprimierten Proteine überhaupt physiologisch korrekt verhalten, wurde die Assoziation der Proteine mit den für sie typischen Partikeln, den HDL, untersucht. Dazu wurden rApoA-I-FLAG und rApoA-I-WT ohne weitere Anreicherungsschritte direkt nach der Proteinernte mit Humanserum versetzt und nachfolgend mittels FPLC an einer Superose 6-Säule und Dichtegradienten-Ultrazentrifugation analysiert. Die gewonnenen Fraktionen wurden jeweils im Immunoblot mit polyklonalen Anti-ApoA-I-Antikörpern und monoklonalen Anti-FLAG-Antikörpern untersucht. Beide Untersuchungen ergaben eine Assoziation des rApoA-I-FLAG und rApoA-I-WT mit den Fraktionen bzw. Dichtebereichen, die die HDL-Fraktion des Menschen repräsentieren. Dieser Versuch bestätigte, daß sich die rekombinanten Proteine wie natives, humanes ApoA-I verhalten.

Für die im weiteren vorgenommene *in vivo* Charakterisierung der Proteine wurde hoch aufgereinigtes ApoA-I benötigt. Dazu wurde anfänglich das Protein mittels Elektroelution aus dem Proteingemisch nach Expression isoliert. Hierbei wurden die Proteine in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die das rApoA-I-WT bzw. rApoA-I-FLAG enthaltende Proteinbande mittels einer Referenzbande von reinem ApoA-I identifiziert. Anschließend wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die Proteine durch Anlegen von Spannung aus dem Gel eluiert. Jedoch konnte mit dieser Methode nur eine geringe Proteinausbeute erreicht werden. In der Literatur ist ein weites Spektrum an Anreicherungsverfahren für ApoA-I beschrieben. Die Reversed Phase Chromatographie stellt eine effiziente Möglichkeit dar, amphiphile Proteine wie rApoA-I anzureichern [102, 141]. Dabei werden bei dieser Chromatographie die hydrophoben Wechselwirkungen des Proteins mit der Matrix der Säule genutzt. Schmidt *et al.* berichten dabei von einer hohen Reinheit des angereicherten ApoA-I sowie einer guten Ausbeute verglichen mit anderen Methoden [141]. Nach erfolgreicher Proteinexpression wurde mit dieser Methode rApoA-I angereichert und von den zellulären Fremdproteinen abgetrennt. Die anschließende Konzentration konnte schonend mittels Lyophilisierung der entsprechenden Fraktionen vorgenommen werden. Die denaturierenden Elutionsbedingungen mit Acetonitril/TFA stellten bei den anschließend durchgeführten physiologischen Versuchen kein Problem dar, da die Renaturierung des Proteins bei Inkubation in Serum bzw. in Anwesenheit von HDL-Partikeln spontan erfolgt. Vielmehr stabilisieren die denaturierenden Bedingungen das Protein, wie im nächsten Abschnitt erläutert wird, da hierbei auch eventuell vorhandene Proteasen denaturiert vorliegen.

Für das rApoA-I-FLAG bot sich zusätzlich die Möglichkeit, über eine spezifische, kommerziell erhältliche Immunitätssäule gegen die FLAG-Sequenz das Protein von zellulären Fremdproteinen und ApoA-I-Fragmenten abzutrennen. Aufgrund der geringen Kapazität und Lebensdauer der Anti-FLAG-Säule zeigte sich diese Methode jedoch als nicht praktikabel, um in präparativem Maßstab Protein zu isolieren. Aus diesem Grund wurde auch für das rApoA-I-FLAG die Reversed Phase Chromatographie genutzt.

Zur Untersuchung der physiologischen Integrität wurden die angereicherten rekombinanten Proteine durch stoffwechselkinetische Untersuchungen am Kaninchenmodell getestet. Diese Untersuchungen sind ein gängiges Verfahren, um

sensitiv den Metabolismus von Substanzen und Proteinen zu untersuchen. Das Kaninchen stellt dabei ein geeignetes und gut charakterisiertes Modell für den menschlichen Lipoproteinstoffwechsel dar [104-107, 144-147]. Die Radioaktivitätsabklingkurven von simultan in Kaninchen injizierten Proteinen können dabei direkt verglichen werden, da eine Unterscheidung der markierten Proteine durch unterschiedliche radioaktive Tracer möglich ist. In diesen Untersuchungen wurden die beiden Isotope ^{131}I und ^{125}I eingesetzt. Aufgrund der hohen Sensitivität dieses Verfahrens mußte die Kontamination mit Fragmenten des Proteins vermieden werden, da dieses eine Verfälschung der Kinetik zur Folge hätte. Aus diesem Grund wurde ein zusätzlicher Anreicherungsschritt vor Beginn der Kinetik durchgeführt, um wirklich nur intakte Proteine zu untersuchen, die mit der HDL-Fraktion assoziieren konnten. Dazu wurden die Proteine sofort nach der Radiomarkierung in autologem Kaninchenserum inkubiert. Im Serum findet sofort ein Austausch der markierten Apolipoproteine mit den Apolipoproteinen des Kaninchens statt. Nur intaktes rekombinantes rApoA-I kann mit der HDL-Fraktion assoziieren. Nach Isolation dieser HDL-Fraktion hat man deshalb nur noch die auch tatsächlich assoziierten Apolipoproteine vorliegen. Die Abtrennung der HDL-Fraktion von Fragmenten und übrigen Serumbestandteilen wurde mit einer Superose 6-Säule vorgenommen.

Die auf diese Weise isolierte HDL-Fraktion wurde in Stoffwechselkinetiken eingesetzt. Die Radioaktivitätsabklingkurven zeigten für rApoA-I-WT einen identischen Verlauf wie humanes ApoA-I, das aus HDL isoliert wurde. Ebenso zeigten die weiteren Analysen mit FPLC und Dichtegradienten-Ultrazentrifugation sowohl für die untersuchten Serumaliquots des Kaninchen als auch für die Inkubation der rekombinanten Proteine in Humanserum eine vergleichbare Assoziation mit den Lipoprotein-Partikeln.

Im Gegensatz zu rApoA-I-WT ergaben die stoffwechselkinetischen *in vivo* Untersuchungen für rApoA-I-FLAG ein etwas anderes Bild. Hier wurde deutlich, daß die Radioaktivitätsabklingkurve der untersuchten Proteine rApoA-I-WT, für das das physiologische Verhalten bereits belegt wurde, und rApoA-I-FLAG nicht genau identisch verliefen. Bei genauer Betrachtung zeigte sich, daß der Unterschied insbesondere in der initialen Phase der Kinetik zu finden war, ab dem 3-Stunden-Wert der Blutentnahme verliefen beide Kurven parallel. Die durchgeführten Untersuchungen mittels FPLC und Dichtegradienten-Ultrazentrifugation verdeutlichten

jedoch, daß zu diesem Zeitpunkt eine Assoziation der Proteine mit den Serumpartikeln derselben Dichtefraktion erfolgte. Dies bestätigte die Beobachtung, daß sich die Proteine ab dem 3 Stunden-Wert metabolisch gleich verhielten. Die Analyse der 5-Minuten und 3-Stunden-Werte ergab ebenfalls eine identische Assoziation der beiden rekombinanten Proteine mit den Serumbestandteilen, so daß eine Erklärung des Differenz in der initialen Phase der Kinetik dadurch nicht möglich war. Aufgrund des ähnlichen Verlaufes beider Kurven (außer in der initialen Phase) und den in FPLC und Dichte-UZ gewonnenen Daten legten wir eine übereinstimmende Verstoffwechslung der Proteine zugrunde. Vermutlich war der schnellere Metabolismus von rApoA-I-WT auf geringe Kontaminationen mit Fremdproteinen zurückzuführen, die mitmarkiert und in der folgenden Anreicherung der HDL-Fraktion nicht ausreichend abgetrennt wurden. Diese wurden insbesondere in der initialen Phase der Kinetik schnell metabolisiert und führten zum Gesamtbild eines scheinbar schnelleren Katabolismus von rApoA-I-WT.

Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß beide rekombinanten Proteine ein mit dem humanen ApoA-I vergleichbares physiologisches Verhalten aufzeigten. Aus diesem Grund können beide rekombinanten Proteine in weiteren Degradationsexperimenten und Tierversuchen als Repräsentanten von humanem ApoA-I eingesetzt werden.

4.3 Degradation von ApoA-I

Wie bereits beschrieben, zeigt ApoA-I eine starke Tendenz zu degradieren. Dies scheint um so mehr der Fall zu sein, wenn das Protein in der lipidfreien Form, d.h. nicht mit der HDL-Fraktion assoziiert, vorliegt [148]. Diese Degradation des nativen ApoA-I *in vitro* erschwert alle nachfolgenden Untersuchungen in erheblichem Ausmaß.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits über eine Degradation von ApoA-I berichtet [95, 96]. Dabei wurde sowohl über N-terminale als auch C-terminale Proteolyse berichtet [20, 92, 94, 149]. Pyle *et al.* konnte eine verminderte Proteolyse von ApoA-I im Baculovirus-Expressionssystem durch den Zusatz der Proteaseinhibitoren Leupeptin und Pepstatin zeigen [139]. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Veröffentlichungen von Gregg *et al.* und Kunitake *et al.* [93,

97]. Beide Arbeitsgruppen beschreiben das *in vivo* Vorkommen eines ApoA-I-Fragments von ca. 26 kDa sowie eines 14 kDa Fragmentes, welche N-terminal intakt sind. Das Auftreten dieser Fragmente konnte mit einem Protease-Inhibitorcocktail limitiert werden. Dennoch verbleibt der Mechanismus der Katabolie von ApoA-I und vor allen Dingen der Abbauort im Menschen ungeklärt. Unabhängig vom exprimierten Protein wurde im Hinblick auf das Baculovirus-Expressionssystem von einer auch in der frühen Phase der Virusinfektion relevanten Cystein-Protease V-CATH berichtet, die eine wichtige Rolle bei der Lyse der Wirtszellen durch das Virus spielt. Die Protease kann jedoch auch zur Degradation rekombinant exprimierten Proteins führen. Dabei erfolgt die Aktivierung des Proenzymes scheinbar durch den Zusatz von denaturierendem SDS-Probenpuffer. Eine Inhibition ist durch den Cysteinproteaseinhibitor E64 möglich [150]. Da bei der Expression mit rekombinantem Baculovirus das Protein intrazellulär exprimiert wurde, mußten die Zellen lysiert werden, um das gewünschte Protein freizusetzen. Bei der Lyse wurden natürlich auch zelluläre Proteasen frei, die gegebenenfalls einen Einfluß auf die Proteolyse des Proteins zeigen konnten.

Um die Umstände und Ursachen der Fragmentierung von ApoA-I näher zu untersuchen, wurden unterschiedliche Inkubationsexperimente mit rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG durchgeführt und dabei verschiedene Proteaseinhibitoren getestet. Frisch geerntetes rekombinantes rApoA-I-FLAG wurde über einen Zeitraum von 30 Stunden bei 37°C in PBS-Puffer unter dem Zusatz verschiedener Proteaseinhibitoren inkubiert. Hierbei trat ohne Proteaseinhibitorzugabe eine sehr rasche Degradation des Proteins auf. Aufgrund der Immunreaktionen im Western Blot sowohl mit polyklonalem Anti-ApoA-I-Antikörper als auch mit dem monoklonalen Anti-FLAG-Antikörper wurde deutlich, daß die Spaltung am C-Terminus erfolgte, da die Degradationsprodukte mit dem polyklonalen Antikörper noch nachweisbar waren, nicht jedoch mit dem gegen die C-terminale FLAG-Sequenz gerichteten monoklonalen Antikörper. Die Identifikation und Charakterisierung des offensichtlich sehr kleinen C-terminalen Fragmentes mit der FLAG-Sequenz gelang jedoch auch mit den spezifischen Antikörpern nicht. Dies könnte in der sehr geringen Konzentration des Fragmentes begründet sein. Wahrscheinlicher ist jedoch die Annahme, daß das abgespaltene Fragment sofort proteolytisch weiter in die einzelnen Aminosäurenbestandteile abgebaut wurde, sodaß mit dem spezifischen Antikörper

kein Nachweis mehr möglich war. Insofern zeigte bei diesen Untersuchungen das FLAG-Fusionsprotein keine Vorteile.

Durch die beobachtete Degradation wurden die Daten von Kunitake *et al.*, der eine N-terminale Trunkation postuliert, bestätigt. Zudem waren auch ähnliche Fragmentgrößen wie bei Kunitake *et al.*, der von ca. 26 kDa und 14 kDa großen Fragmenten berichtet, sichtbar [93]. Von den verschiedenen eingesetzten Proteaseinhibitoren zeigte sich die Mischung aus PMSF, Aprotinin und Leupeptin als besonders potent. PMSF ist eine allgemeine Serinprotease, Leupeptin weist spezifische Hemmung von Serin- und Cysteinproteasen, insbesondere von Plasmin, Trypsin, Papain und Cathepsin B auf. Aprotinin ist ebenfalls ein Serinproteaseninhibitor. Eine Zugabe des Proteaseinhibitors Leupeptin alleine zeigte in den Experimenten jedoch keine so gute Wirkung auf wie die Mischung der verschiedenen Inhibitoren. Der Zusatz des Metalloproteaseninhibitors EDTA ließ so gut wie keine Änderung der Degradation im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Dies spricht für die Degradation des Proteins durch Serin- und Cysteinproteasen. Unsere Ergebnisse sind damit teilweise in Übereinstimmung mit denen von Pyle *et al.*, die jedoch eine Mischung aus Leupeptin und Pepstatin (ein Aspartatproteaseinhibitor) einsetzten [139]. Auf jeden Fall erfolgt die Degradation nicht nur durch die von Hom *et al.* beschriebene virale Protease V-CATH, da die Degradation durch PMSF-Zugabe weiter verringert werden konnte [150]. Hom *et al.* beschreibt weiterhin, daß die virale Protease V-CATH scheinbar durch die denaturierenden Bedingungen im SDS-Probenpuffer aktiviert werden [150]. In diesem Experiment erfolgte die Inkubation jedoch nicht in SDS-Probenpuffer, die Protease dürfte also gar nicht aktiviert vorgelegen haben. Außerdem wurden die entnommenen Aliquots sofort bei -80°C eingefroren und baldmöglichst untersucht, so daß in diesem Teil des Experimentes der Einfluß minimiert gewesen sein sollte. Zudem sollte die virale Protease durch den Cysteinproteasehemmer Leupeptin ausreichend inhibiert werden. Auch ein im folgenden beschriebenes Experiment im Rahmen dieser Arbeit zeigte, daß eine Degradation des ApoA-I offensichtlich auch unabhängig von den Proteasen aus dem Baculovirussystem erfolgte und auch die Größe der auftretenden Fragmente eine Konsistenz aufwies. Degradationsprodukte vermutlich durch zelluläre Proteasen konnten in der Arbeitsgruppe auch bei ApoA-I-Expression in CHO-Zellen beobachtet werden. Hier erwies sich die Zugabe von Pepstatin, ein Aspartatprotease-Inhibitor, als vorteilhaft. Da in jedem Expressionssystem offensichtlich unterschiedliche zelluläre

Proteasen zumindest teilweise zur Degradation des ApoA-I beitragen, muß für jedes System der optimale Inhibitor ermittelt werden. Aufgrund der gewonnenen Einsichten sollte sofort bei Zellyse ein Inhibitorecocktail aus PMSF, Aporotinin und Leupeptin zugesetzt werden, um die Degradation von rekombinanten ApoA-I in diesem Expressionssystem zu minimieren.

Es stellte sich infolge der in der Literatur veröffentlichten Daten als auch durch die in der eigenen Arbeitsgruppe gewonnenen Erfahrungen die grundsätzliche Frage nach der Stabilität von ApoA-I, unabhängig von zellulären oder sonstigen, womöglich in die Probe verschleppten Proteasen. Die Erfahrung schien zu zeigen, daß ApoA-I auch einfach *per se* degradiert, eventuell beeinflusst durch die Umgebungsbedingungen in Form des eingesetzten Solvenz. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt.

Dazu wurde ApoA-I direkt aus humaner HDL mittels Reversed Phase Chromatographie isoliert, um die Degradation des Proteins durch die im Expressionssystem vorhandenen zellulären Proteasen auszuschließen. Die Stabilität des Proteins wurde dann *in vitro* in Anwesenheit verschiedener, häufig in der Chromatographie eingesetzter Solventien erkundet. Zum Ausschluß aller möglichen Kontaminationen mit Proteasen wurden sämtliche Lösungen und Materialien autoklaviert und auch im weiteren unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Die einzige Kontaminationsmöglichkeit seitens einer Protease bestand in dem recht unwahrscheinlichen Fall einer komigrierenden Protease in der Reversed Phase Chromatographie. Umso interessanter sind jedoch die Inkubationsergebnisse. So sind für die unterschiedlichen Solventien durchaus verschiedene Auswirkungen auf die Stabilität von ApoA-I zu verzeichnen. Bei Inkubation in 50%iger Glycerinlösung zeigte ApoA-I eine deutlich größere Stabilität als vergleichsweise in Wasser, wo das Protein sehr rasch degradierte. Stabilisierend wirkten auch PBS und 50% Acetonitril/0,1% TFA, wenn auch in geringerem Ausmaß als Glycerin. Der stabilisierende Effekt von Acetonitril und 50% Glycerin läßt sich wahrscheinlich auf den amphipatischen Charakter beider Solventien zurückführen. Die Wirkung von PBS kann man vermutlich mit der hohen Konzentration an monovalenten Ionen erklären, die die Sekundärstruktur des Proteins stabilisieren und daher die Degradation verringern. Interessanterweise ist 50%iges Glycerin ein besser stabilisierendes Agenz als 10%iges Glycerin. Dies könnte die Grundlage in einem besseren molaren Verhältnis

von Glycerin zu ApoA-I haben. Dennoch bleibt die Frage nach dem Mechanismus der Degradation ungeklärt. Die von Hom *et al.* beschriebene und im Baculovirus vorkommende SDS-Puffer aktivierte Protease oder auch sonstige zelluläre Proteasen konnten in diesem Fall als Ursache ausgeschlossen werden, da bei diesem Versuchsansatz ApoA-I aus humaner HDL verwendet und unter sterilen Bedingungen gearbeitet wurde [150].

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß ApoA-I auch ohne die Anwesenheit von Proteasen degradiert. Als Mechanismen kämen Autoproteolyse oder mechanische Instabilität in Frage. Autoproteolyse wurde bereits bei anderen Proteinen wie Glycosylasparaginase, Subtilisin-like Serinproteinase und Plasmin beschrieben [151-153]. Der eigentliche Nachweis einer solchen Autoproteolyse ist erst nach Ausschluß anderer Ursachen sowie Untersuchungen gezielter ApoA-I Mutanten möglich. Dies bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

Normalerweise assoziiert menschliches ApoA-I nach Sekretion ins Plasma und der Abspaltung des Propeptids sofort mit HDL-Partikeln. Bei der Expression in Zellkultur liegt jedoch der Hauptproteinanteil lipidfrei vor, was eventuell einen Einfluß auf die Degradation haben könnte [154, 155]. Aus diesem Grund sollte im weiteren die Stabilität von rApoA-I-FLAG bei *in vitro*-Inkubation in Humanserum untersucht werden. Dabei wurden Seren eines normolipämischen Patienten und eines Patienten mit ausgeprägter Hypertriglyzeridämie und konsekutiver niedriger HDL-Serumkonzentration eingesetzt. Die Annahme dabei war, daß der hypertriglyzeridämische Patient eine niedrige HDL-Serumkonzentration als Folge einer gesteigerten ApoA-I-Katabolie hat. Diese könnte evtl. von einer erhöhten spezifischen Proteaseaktivität herrühren. Dazu wurde angereichertes r-ApoA-I-FLAG über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 37°C in humanem Serum inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, die mittels SDS-PAAGE und Westernblot analysiert wurden. Hierbei zeigte sich auch nach 24 Stunden Inkubationszeit bei keinem Patienten eine nennenswerte Zunahme an Degradationsprodukten des rekombinanten Proteins. Die bereits belegte Assoziation des r-ApoA-I-FLAG mit der HDL-Fraktion schien das Protein zu stabilisieren und gegen einen proteolytischen Abbau zu schützen. Offensichtlich hatte auch der Lipidstatus keinen Einfluß auf die Degradation, so daß bei diesem Krankheitsbild eine vermehrte Proteaseaktivität ausgeschlossen werden konnte. Diese Ergebnisse in

Bezug auf die Degradation stehen in deutlichem Gegensatz zu den Ergebnissen bei nicht lipid-assoziiertem rApoA-I und müssen sicher noch näher untersucht werden.

Um die physiologische Bedeutung fragmentierten ApoA-I in Bezug auf den Stoffwechsel mittels einer Stoffwechselkinetik näher zu untersuchen, wurde eine mit Fragmenten kontaminierte rApoA-I-WT-Probe radiomarkiert. Die Kontamination war nur geringfügig, so daß sie in der SDS-PAAGE nach Coomassie-Färbung nicht zu sehen war. Wie bereits erwähnt, kommt es bei der Iodierung zu einer radioaktiven Markierung aller in der Lösung vorhandenen Proteine am Tyrosinrest, eben auch der Fragmente. Die markierten Proteine wurden Kaninchen injiziert und anschließend zu definierten Zeitpunkten Serumproben entnommen, um eine Radioaktivitätsabklingkurve zu erhalten. Die Ergebnisse zeigten, daß es zu einer wesentlich schnelleren Verstoffwechslung der kontaminierten Probe im Vergleich zu hoch angereichertem ApoA-I kam, was in einem stärkeren Abfall der Radioaktivitätsabklingkurve deutlich wurde. Bei der Untersuchung von Serumproben in der FPLC lag ein wesentlich größerer Anteil der Radioaktivität der kontaminierten Probe in der freien d.h. der nicht lipidgebundenen Fraktion im Vergleich zur Referenzsubstanz vor. Die Analyse der markierten Proteine nach Inkubation in Humanserum verdeutlichte in der FPLC-Untersuchung, daß die Proteine offensichtlich mit unterschiedlichen Serumpartikeln assoziierten. Während das hoch aufgereinigte rApoA-I-WT offensichtlich mit der HDL-Fraktion assoziierte, eluierte die mit Fragmenten kontaminierte Probe nicht einheitlich mit der HDL-Fraktion. Es zeigte sich eine Verschiebung in der Assoziation hin zu kleineren Partikeln, die vermutlich die kleinere und dichtere HDL₃-Fraktion oder sogar die noch kleinere und dichtere VHDL-Fraktion darstellten. Die Assoziation der mit Fragmenten kontaminierten Probe mit Serumbestandteilen höherer Dichte konnte auch in der Ultrazentrifugationsanalyse bestätigt werden. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Schmidt *et al.*, der für C-terminale Trunkationsproteine von ApoA-I einen deutlich schnelleren Katabolismus feststellte. Zudem kam es bei den beschriebenen Trunkationsproteinen zu einer Verschiebung der Assoziation von der HDL-Fraktion hin zur VHDL-Fraktion [132].

Es wurde schon früher berichtet, daß die Affinität der Apolipoproteine zu den Lipoprotein-Partikeln anscheinend invers mit deren katabolen Rate assoziiert ist [156, 157]. Unabhängig davon untersuchten Sparks *et al.* die strukturelle Stabilität

diskoidaler und spärlicher HDL-Partikel [158]. Sie schlußfolgerten, daß diskoidale HDL instabil seien und deshalb bestrebt sind, mit Zellmembranen und anderen Lipoproteinen zu interagieren, um Cholesterin-Efflux zu ermöglichen. Die Transition der diskoidalen HDL-Partikel in weniger dichte HDL-Partikel könnte eine Dissoziation des ApoA-I in lipidarme ApoA-I bedingen, die dann wiederum schnell katabolisiert werden. Dieses Konzept der erhöhten katabolen Rate locker gebundenen ApoA-I wird gestützt durch synthetisierte Peptide, die sich bezüglich ihrer Affinität zur HDL unterscheiden [159]. Wie gezeigt werden konnte, kommt es bei der Degradation von rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG zu einer Abspaltung des C-Terminus. Dieser Teil wird für ApoA-I als relevant für die Lipidbindung beschrieben [82]. Als Folge der Degradation könnte die Affinität zu den HDL vermindert sein, bei der Dissoziation des ApoA-I von der HDL käme es dann im weiteren zu einem schnellen Turnover des Proteins. So läßt sich bei verminderter Lipidbindung postulieren, daß das ApoA-I schnell von der HDL-Fraktion dissoziiert und im weiteren rasch katabolisiert wird.

Mittels Reversed Phase Chromatographie ist es gelungen, Fragmente, die immer wieder bei der Degradation von rekombinantem rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG auftraten, zu isolieren. Die entsprechenden Fraktionen wurden lyophilisiert und anschließend massenspektroskopisch analysiert bzw. N-terminal ansequenziert. Es zeigte sich, daß die Proteinsequenzierung nicht durchgeführt werden konnte, vermutlich weil das N-terminal vorliegende Methionin formyliert oder acetyliert vorlag. Aufgrund der immunspezifischen Nachweise konnte jedoch davon ausgegangen werden, daß die Degradation am C-terminalen Ende erfolgt. Die Bestimmung der Masse ergab für beide Fragmente von rApoA-I-WT und rApoA-I-FLAG übereinstimmend 14697 Da. ApoA-I-Fragmente dieser Größe wurden bereits von Kunitake *et al.* *in vivo* beschrieben [93]. Diese Proteinmasse entspricht einem Fragment von Aminosäure 1-124 unter der Voraussetzung, daß a) zwei Methioninreste der Sequenz oxidiert sind, oder b) eine N-terminale Acetylierung vorliegt ohne Oxidation eines Methioninrestes, oder c) das Fragment N-terminal formyliert ist und ein Methioninrest oxidiert vorliegt. Aufgrund der nicht durchführbaren Proteinsequenzierung kommen nur die Varianten b) und c) in Frage. Am wahrscheinlichsten ist die N-terminale Acetylierung, die am häufigsten vorkommt. Andere in unserer Arbeitsgruppe mittels präparativer Elektrophorese isolierte Fragmente von rekombinanten ApoA-I exprimiert in CHO-Zellen konnten ebenfalls als N-terminal intakt bestätigt werden. Die Fragmente zeigten eine Masse von 22 und 10

kDa, entsprechend den Aminosäureresten von 1-187 bzw. 1-87. Bei näherer Betrachtung der Fragmente in Verbindung mit der postulierten ApoA-I-Sekundärstruktur (siehe Einleitung) zeigt sich, daß zwei der Bruchstellen (Fragmente 1-124 und 1-187) jeweils genau am Beginn einer helikalen Struktur lokalisiert sind. Eventuell sind diese Strukturen für eine proteolytische Spaltung besonders sensitiv.

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß die bei der Degradation von ApoA-I auftretenden Fragmente vergleichbare Größen aufweisen. Wie bereits erwähnt, berichteten Kunitake *et al.* von 26- und 14-kDa-Fragmenten. Auch innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde ein scheinbar persistierendes Degradationsmuster selbst in verschiedenen Expressionssystemen (*E.coli*, CHO-Zellen, Sf9-Zellen) beobachtet. Dabei sieht es so aus, als ob bei zunehmender Degradation des Proteins zuerst ein 26kDa-Fragment entsteht, welches dann zum 22 kDa-Fragment und darüber hinaus zu vielen weiteren kleineren Fragmenten degradiert. Die Entstehung von N-terminalen Fragmenten führt zum Verlust der C-terminalen Domäne, die für die Lipidbindung verantwortlich ist. Ein solches, nicht an Lipide gebundenes Protein wäre im Serum von verschiedenen Proteasen angreifbar, was über entsprechend kleinere Fragmente bis zur kompletten Degradation von ApoA-I führt.

4.4 Transgene Kaninchen

Kaninchen stellen ein geeignetes Tiermodell bezüglich des Lipoproteinstoffwechsels des Menschen dar. So sind normolipämische Kaninchen wie z.B. New Zealand White (NZW) Kaninchen bekannt für die Entwicklung einer Hyperlipidämie gefolgt von Arteriosklerose unter einer z.B. cholesterinreichen Kost. Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) Kaninchen haben eine *inframe* Deletion des LDL-Rezeptors. Dieses genetische Modell entspricht dem Phänotyp der LDL-Rezeptor-Defizienz beim Menschen: Hypercholesterinämie, frühzeitig einsetzende Arteriosklerose, Cornealtrübungen, Xanthome, frühzeitiger Tod. Mit der Weiterentwicklung molekulargenetischer Techniken wurde es möglich, transgene Tiere zu erzeugen, die ein normalerweise nicht in ihrem Stoffwechsel vorkommendes Protein zusätzlich bzw., als sogenannte *knock out*-Tiere, ein bestimmtes Gen gar nicht mehr exprimieren. Erstmals wurde von lebensfähigen transgenen Kaninchen

1985 berichtet [160]. Die hier beschriebenen transgenen NZW Kaninchen exprimieren in der Leber humanes ApoA-I (hApoA-I) zusätzlich zum Kaninchen ApoA-I [108]. Dabei wurden bei den uns zur Verfügung gestellten Tieren Serumkonzentrationen an hApoA-I gemessen, die dem Serumspiegel des Menschen entsprechen. Duverger *et al.* berichtete von einer verminderten kanincheneigenen ApoA-I-Expression bei einer Überexpression von humanem ApoA-I. Dabei scheint die Genregulation nicht auf transkriptioneller Ebene zu erfolgen, wie aus einer mRNA-Quantifizierung deutlich wurde, sondern es scheinen posttranskriptionelle oder translationale Regulationsmechanismen involviert zu sein. Die HDL-Partikelgröße von transgenen Kaninchen und Kontrolltieren war vergleichbar, insgesamt wiesen die Partikel jedoch einen größeren Durchmesser als im Menschen auf, vermutlich aufgrund der geringeren Hepatischen Lipase-Aktivität im Kaninchen. Interessanterweise wurde bei transgenen Kaninchen im Vergleich zu normolipämischen Menschen ein deutlich größerer Anteil an präβ-HDL-Partikeln und damit assoziiertem humanem ApoA-I gefunden, eventuell als Folge eines geringen ApoA-II-Spiegels bei den Tieren. Bei Kaninchen mit hohem präβ-Spiegel konnte auch ein erhöhter Cholesterinefflux nachgewiesen werden [108].

Um den ApoA-I-Metabolismus in den transgenen Kaninchen zu charakterisieren, wurden Stoffwechselkinetiken durchgeführt. Dazu wurde Kaninchen-ApoA-I und humanes ApoA-I mittels Dichte-Ultrazentrifugation aus der HDL-Fraktion isoliert, lyophilisiert, zum Vergleich mit zwei unterschiedlichen Tracern (^{131}I , ^{125}I) radiomarkiert und anschließend in Kaninchen injiziert. Interessanterweise zeigte sich ein konstant reproduzierbarer langsamerer Metabolismus des humanen ApoA-I in der initialen Phase der Kinetik im Vergleich zu Kaninchen-ApoA-I, während in der späteren Phase der Kinetik humanes ApoA-I schneller katabolisiert wurde. Trotz dieser geringen Unterschiede verhielten sich humanes ApoA-I und Kaninchen-ApoA-I metabolisch im Kaninchen sehr ähnlich.

Bemerkenswerterweise zeigten die FPLC- und Dichtegradienten-UZ, daß das humane ApoA-I offensichtlich mit einem in Größe und Dichte dem humanen HDL₂ entsprechenden Partikel assoziierte, während das Kaninchen-ApoA-I mit einem kleineren und weniger dichten Serumbestandteil, der HDL₃, assoziiert vorlag. Diese Ergebnisse sprechen für zwei sich offensichtlich kinetisch unterschiedlich verhaltende HDL-Fraktionen. Verschiedene Autoren verwiesen auf eine schnell und eine langsam

abbauende HDL-Fraktion auf dem Boden des mathematischen Modellierens stoffwechselkinetischer Daten im Menschen [161-163]. Die zwischenzeitlich bestätigte Schlußfolgerung dieser Daten war, daß die Apolipoproteine ApoA-I und ApoA-II unterschiedlich katabolisiert wurden, sofern sie nicht auf dem gleichen Partikel vorhanden waren [164, 165]. Hieraus wird ersichtlich, daß das humane ApoA-I im transgenen hApoA-I-Kaninchen ähnlich, jedoch nicht identisch verstoffwechselt wird im Vergleich zu Kaninchen-ApoA-I. Dennoch lassen die Daten den Schluß zu, daß die erhöht gemessenen ApoA-I Serumkonzentrationen im transgenen humanen ApoA-I Kaninchen durch die erhöhte Syntheserate und nicht durch einen verlangsamten Katabolismus zu erklären sind. Bemerkenswert ist, daß auch bei einer nach exprimierenden und nicht exprimierenden Kaninchen differenzierten Betrachtung die Verstoffwechslung der beiden untersuchten Proteine in vergleichbarer Weise stattfindet. Damit ist der Abbau offensichtlich unabhängig vom Serumspiegel des vorhandenen Proteins. Eine gegenregulatorisch erhöhte Katabolie als auch eine verlangsamte Katabolie als Folge der Überlastung des unbekanntes Degradationsmechanismus konnte damit ausgeschlossen werden.

Im folgenden wurden von den Kaninchenorganen der transgenen Tiere immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Mit diesen kann die gewebespezifische Expression bzw. das Vorhandensein eines Proteins in einem bestimmten Gewebe nachgewiesen werden. In diesem Fall sollten die Untersuchungen dazu genutzt werden, weitere Hinweise über den Abbauort von ApoA-I zu erhalten. Die bereits vermuteten Abbauorte für ApoA-I sind Niere und Leber [166]. Die allgemeine Vorstellung vom Abbau des ApoA-I ist, daß es von der HDL dissoziieren kann und dann sehr schnell über die Niere filtriert wird [167, 168]. Tubuluszellen der Niere können ApoA-I aus dem Urin reabsorbieren [167]. Diese Studien wurden bisher nur am Ratten-Modell durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurden Gefrierschnitte von Leber, Milz, Niere, Darm und Muskelgewebe der hApoA-I exprimierenden Kaninchen angefertigt. Die anschließende Immunreaktion wurde nach Blockierung endogener Peroxidase, Avidins und Biotins mit einem monoklonalen, nur für das menschliche ApoA-I sensitiven Antikörper durchgeführt. Eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit den Geweben erfolgte nicht, wie in den Negativkontrollen deutlich nachgewiesen werden konnte. Auch eine unspezifische Reaktion des Sekundärantikörpers mit

Teilen des Gewebes konnte ausgeschlossen werden. Mit der Färbereaktion kam es jedoch nicht zu der erhofften zellspezifischen Farbreaktion im Gewebe, vielmehr war eine scheinbar unspezifische Färbung des Gewebes zu verzeichnen. Dabei belegten jedoch insbesondere die Negativ- und Positivkontrollen die spezifische Reaktion des monoklonalen Antikörpers mit einem Epitop des humanen ApoA-I. Der Grund für diese scheinbar unspezifische Färbung könnte darin zu suchen sein, daß ApoA-I nicht intrazellulär oder membrangebunden vorliegt, sondern in das Serum sezerniert wird, wo es mit der HDL assoziiert ist. Dabei werden in den transgenen Tieren hohe Serumspiegel besonders an humanem ApoA-I erreicht. Trotz der verschiedenen Waschschriffe nach Organentnahme und in der Immunhistologie sind noch geringe Reste von Blut in den Geweben denkbar. Dabei könnte eine spezifische Reaktion des zellulär vorliegendem ApoA-I oder eines ApoA-I-Fragmentes durch das im Serum vorhandene ApoA-I überlagert werden. Allerdings kommt es in der Leber, in der das humane ApoA-I exprimiert wird, zu einer viel stärkeren Reaktion des Antikörpers mit dem Gewebe als z. B. in der Milz, was wiederum dafür spricht, daß die Reaktion nicht nur auf das ApoA-I aus dem Blut zurückzuführen ist sondern organspezifisch bedingt ist. Eine zelluläre Lokalisation des Proteins, die einen Einblick in den Syntheseort und vor allen Dingen auch den Degradationsort zulassen würden, ist jedoch leider bisher noch nicht möglich gewesen.

Ein Lösungsansatz wäre, die Zellen aus dem Zellverband zu lösen, gründlich von Serumresten durch ausführliches Waschen zu befreien und dann dieselben Untersuchungen auf zytologischer Ebene durchzuführen. Eine weitere Idee ist, die RT-PCR zur Detektion der ApoA-I mRNA zu etablieren. Eine Diskrepanz zwischen der Lokalisation der mRNA und des Proteins könnte ein Hinweis für den Abbauort des ApoA-I in diesem Tiermodell sein.

Die verschiedenen Versuchsansätze dieser Arbeit unterstreichen die Schwierigkeit des Nachweises der Proteolyse von ApoA-I. Die Ergebnisse belegen die Neigung von ApoA-I im lipidfreien Zustand zu degradieren. Die *in vitro* nachgewiesenen Fragmente sind in unterschiedlichen Systemen N-terminal intakt und zumindest ähnlich in der Größe. Die Fortführung dieser Arbeiten sowohl im transgenen humanen ApoA-I Kaninchen als auch weitere Untersuchungen zu FLAG-ApoA-I könnten zukünftig Aufschluß auf die *in vivo* Proteolyse von ApoA-I geben.

5 Zusammenfassung

Apolipoprotein A-I (ApoA-I) kommt eine bedeutende physiologische Rolle zu: Es ist Hauptstrukturprotein der *High Density Lipoproteins* (HDL) und damit wesentlich am reversen Cholesterintransport von den peripheren Körperzellen zurück zur Leber beteiligt. Als Kofaktor für einige im Lipidstoffwechsel wichtige Enzyme wie z.B. der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase spielt ApoA-I auch bei der Veresterung des Cholesterins eine wichtige Rolle. Offensichtlich ist ein niedriger HDL-Spiegel mit einer erhöhten katabolen Rate des ApoA-I verknüpft. Dennoch verbleibt trotz intensiver Bemühungen der präzise Abbaumechanismus dieses Lipoproteins unbekannt. Mittlerweile gibt es erste Daten über eine C-terminale und N-terminale Degradation. Fragmente von 26 und 14 kDa wurden als N-terminale Aminosäuresequenzen beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es, ApoA-I rekombinant zu exprimieren, auf seine physiologische Integrität hin zu untersuchen und anschließend *in vitro* und *in vivo* nähere Informationen über den Abbau und den Degradationsort des Proteins zu erhalten. Die stoffwechselkinetischen Untersuchungen in dieser Arbeit verdeutlichten im Kaninchenmodell, daß sich reifes, in der Insektenzelllinie Sf9 mit Hilfe des Baculovirussystem exprimiertes ApoA-I (rApoA-I-WT) physiologisch wie natives ApoA-I verhält, unabhängig von der N-terminalen Addition eines Methionins. Auch die Expression von ApoA-I als Fusionsprotein mit einem FLAG-Oktapeptid am C-terminalen Ende (rApoA-I-FLAG) beeinflusste das Verhalten des Proteins bei stoffwechselkinetischen Untersuchungen nicht. Beide rekombinant exprimierten Proteine zeigten die erwarteten Molekulargewichte, isoelektrischen Punkte und Immunreaktivitäten mit spezifischen Antikörpern. Auch eine Assoziation beider rekombinanten Proteine mit der HDL-Fraktion konnte belegt werden. Insofern wurden rApoA-I-WT als auch das rApoA-I-FLAG, das aufgrund seiner FLAG-Sequenz selektiv mit monoklonalen Antikörper nachzuweisen ist, als repräsentative Proteine in weiteren Versuchen eingesetzt.

Untersuchungen der *in vitro* Degradation der rekombinanten Proteine ergaben eine Bestätigung der C-terminalen Spaltung des Proteins. Dabei konnte die beobachtete Degradation der Proteine nach Expression durch Zugabe einer Proteaseinhibitorenmischung von Phenylmethylsulfonylfluorid, Aprotinin und Leupeptin reduziert werden. Die Degradation von ApoA-I scheint jedoch auch abhängig vom

Solvenz zu sein. Dazu wurde zum Ausschluß möglicher an der Degradation beteiligter zellulärer Proteasen ApoA-I aus humanem HDL isoliert. Trotz Ausschluß dieser Proteasen wurde eine Degradation des Proteins in Abhängigkeit vom Lösungsmittel beobachtet. Als stabilisierend wirkte 50%iges Glycerin, ebenfalls stabilisierende Wirkung zeigten 50% Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure und PBS. Eine Proteolyse der rekombinanten Proteine bei Inkubation in Humanserum wurde nicht beobachtet. Eine Kontamination einer angereicherten Proteinprobe mit Fragmenten führte zu einer deutlich beschleunigten Radioaktivitätsabklingkurve bei Kinetiken im Kaninchenmodell. Dies zeigt die physiologische Relevanz des fragmentierten Proteins, das offensichtlich schneller vollständig abgebaut wird. Die Massenbestimmung eines der regelmäßig auftretenden Fragmente ergab 14697 Dalton für beide rekombinant exprimierten Proteine, was einer aminoterminalen Sequenz von Aminosäure 1-124 entspricht.

Weitere Untersuchungen bezüglich des Degradationsortes von ApoA-I wurden in Kaninchen, die transgen humanes ApoA-I exprimieren, durchgeführt. Die stoffwechselkinetische Charakterisierung der Tiere ergab interessanterweise Unterschiede im Abbau von Kaninchen-ApoA-I und humanem ApoA-I. Ersteres ist offensichtlich mit einer kleineren und dichteren Subfraktion der HDL assoziiert als humanes ApoA-I und zeigt kinetisch initial einen schnelleren, später jedoch eine verlangsamten Katabolismus. Dies deutet auf eine unterschiedliche Verstoffwechslung der verschiedenen HDL-Subfraktionen und der mit ihnen assoziierten Proteine hin. Gefrierschnitte wurden bezüglich des Vorkommens von ApoA-I-Fragmenten untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine spezifische Reaktion des monoklonalen Antikörpers gegen humanes ApoA-I, jedoch war eine Lokalisation des Proteins noch nicht möglich.

Diese Ergebnisse reflektieren somit die Degradationsneigung von ApoA-I im lipidfreien Status. Der eigentlich zugrundeliegende Mechanismus verbleibt weiterhin ungeklärt. Dennoch scheint infolge der reproduzierbar ähnlich detektierbaren Fragmente in verschiedenen *in vitro*-Ansätzen eine spezifische Protease als unwahrscheinlich. Prozesse wie Autoproteolyse und mechanische Instabilität sind deshalb in diesem Zusammenhang zu diskutieren. Die exprimierten Proteine und die transgenen Kaninchen bieten geeignete Modelle für weiterführende Untersuchungen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AcNPV	Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus
Apo	Apolipoprotein
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
rApoA-I-FLAG	rekombinantes Apolipoprotein mit FLAG-Sequenz
rApoA-I-WT	rekombinantes Apolipoprotein mit Wildtyp-Sequenz
hApoA-I	humanes ApoA-I (transgen exprimiert)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cholesterin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	codierende Desoxyribonukleinsäure
CE	Cholesterinester
CETP	Cholesterinestertransferprotein
Ci	Curie
CLA-1	CD36 and LIMPII analogous-1-Rezeptor
CM	Chylomikronen
CM-R	Chylomikronen-Remnants
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötale Kälberserum
FLAG	Peptidsequenz (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatographie
FS	Fettsäuren
h	Stunde
HDL	High Density Lipoproteins
HDL-R	High Density Lipoproteins Remnants
HTGL	Hepatische Triglyzeridlipase
IDL	Intermediate Density Lipoproteins
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilodalton
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoproteins
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
Lp	Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-Receptor Related Protein
LTIP	Lipidtransferinhibitorprotein
LTP	Lipidtransferprotein
MBq	Megabequerel
N-terminal	aminoterminal
NZW	New Zealand White Kaninchen
PAAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion

PL	Phospholipid
PLTP	Phospholipidtransferprotein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO	Peroxidase
RPC	Reversed Phase Chromatographie
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAA	Serumamyloid A
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf9-Zellen	Spodoptera frugiperda Insektenzellen
SR-BI	Scavenger receptor Class B type I
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Triglyzerid
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge bzw. Ultrazentrifugation
VHDL	Very High Density Lipoproteins

7 Literaturverzeichnis

1. Dargel, R.: *Biochemie und Pathobiochemie der Lipoproteine: Lipoproteine und Atherosklerose*. Berlin: Akademie Verlag. **1991**.
2. Kostner, G.M. and W. März: *Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine*. in: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen (Schwandt, P. and Richter, W.O. Eds.). Schattauer, Stuttgart. **1995**. p. 4-47.
3. Schmitz, G. and K.L. Lackner: *High-density Lipoproteine und Arteriosklerose*. in: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen (Schwandt, P. and Richter, W.O. Eds.). Schattauer, Stuttgart. **1995**. p. 119-142.
4. Glomset, J.A.: *The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase*. Journal of Lipid Research. **1968**. 9: p. 155-167.
5. Sandra, A. and R.E. Pagano: *Phospholipid asymmetry in LM cell plasma membrane derivatives: polar head group and acyl chain distributions*. Biochemistry. **1978**. 17(2): p. 332-8.
6. Rothblat, G.H., F.H. Mahlberg, W.J. Johnson and M.C. Phillips: *Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux*. Journal of Lipid Research. **1992**. 33: p. 1091-1097.
7. Jefferson, J.R., J.P. Slotte, G. Nemezc, A. Pastuszyn, T.J. Scallen and F. Schroeder: *Intracellular sterol distribution in transfected mouse L-cell fibroblasts expressing rat liver fatty acid-binding protein*. Journal of Biological Chemistry. **1991**. 266(9): p. 5486-96.
8. Schroeder, F., J.R. Jefferson, A.B. Kier, J. Knittel, T.J. Scallen, W.G. Wood and I. Hapala: *Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. **1991**. 196(3): p. 235-52.
9. Johnson, W.J., F.H. Mahlberg and G.H. Rothblat: *Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins*. Biochimica et Biophysica Acta. **1991**. 1085: p. 273-298.
10. Phillips, M.C., W.J. Johnson and G.H. Rothblat: *Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer*. Biochimica et Biophysica Acta. **1987**. 906: p. 223-276.
11. Bruckdorfer, K.R., J. Crowe and M.K. Sherry: *Evidence of water soluble intermedicate in exchange of cholesterol between membranes*. Biochimica et Biophysica Acta. **1984**. 778: p. 489-496.
12. Billheimer, J.T. and M.P. Reinhart: *Subcellular biochemistry*. in: Intracellular Transfer of Lipid Molecules (Hilderson, H.J. Eds.). Plenum Press, New York. **1991**. p. 301-331.
13. Mahlberg, F.H. and G.H. Rothblat: *Cellular cholesterol efflux. Role of cell membrane kinetic pools and interaction with apolipoproteins AI, AII, and Cs*. Journal of Biological Chemistry. **1992**. 267(7): p. 4541-50.
14. Shen, X.Y. and A. Angel: *Identification of high density lipoprotein binding proteins in mature adipocyte plasma membranes*. Biochemistry and Cell Biology. **1993**. 71(7-8): p. 348-54.
15. Allan, C.M., N.H. Fidge, J.R. Morrison and J. Kanellos: *Monoclonal antibodies to human apolipoprotein A-I: probing the putative receptor binding domain of apolipoprotein A-I*. Biochemical Journal. **1993**. 290: p. 449-455.

16. Acton, S., A. Rigotti, K.T. Landschulz, S. Xu, H.H. Hobbs and M. Krieger: *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*. Science. **1996**. 271: p. 518-520.
17. Rigotti, A., B. Trigatti, J. Babitt, M. Penman, S. Xu and M. Krieger: *Scavenger receptor BI- a cell surface receptor for high density lipoproteins*. Current Opinion in Lipidology. **1997**. 8: p. 181-188.
18. Rigotti, A., B.L. Trigatti, M. Penman, H. Rayburn, J. Herz and M. Krieger: *A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism*. Proceeding of the National Academy of Sciences USA. **1997**. 94(23): p. 12610-5.
19. Xu, S., M. Laccotrippe, X. Huang, A. Rigotti, V.I. Zannis and M. Krieger: *Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake*. Journal of Lipid Research. **1997**. 38(7): p. 1289-1298.
20. Dalton, M.B. and J.B. Swaney: *Structural and functional domains of apolipoprotein A-I within high density lipoproteins*. Journal of Biological Chemistry. **1993**. 268: p. 19274-19283.
21. Morrison, J., N.H. Fidge and M. Tozuka: *Determination of the structural domain of ApoA1 recognized by high density lipoprotein receptor*. Journal of Biological Chemistry. **1991**. 266(28): p. 18780-18785.
22. Vadiveloo, P.K., C.M. Allan, B.J. Murray and N.H. Fidge: *Interaction of apolipoprotein AII with the putative high-density lipoprotein receptor*. Biochemistry. **1993**. 32(36): p. 9480-5.
23. Murao, K., V. Terpstra, S.R. Green, N. Kondratenko, D. Steinberg and O. Quehenberger: *Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes*. Journal of Biological Chemistry. **1997**. 272(28): p. 17551-7.
24. Calvo, D., D. Gomez Coronado, Y. Suarez, M.A. Lasuncion and M.A. Vega: *Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL*. Journal of Lipid Research. **1998**. 39(4): p. 777-88.
25. Garver, W.S., M.A. Deeg, R.F. Bowen, M.M. Culala, E.L. Bierman and J.F. Oram: *Phosphoproteins regulated by the interaction of high-density lipoprotein with human skin fibroblasts*. Arteriosclerosis and Thrombosis Vascular Biology. **1997**. 17(11): p. 2698-706.
26. Middleton, A. and B. Middleton: *Elevation of cyclic AMP by iloprost and prostaglandin E1 increases cholesterol efflux and the binding capacity for high-density lipoproteins in human fibroblasts*. Biochimica et Biophysica Acta. **1998**. 1391(2): p. 117-32.
27. Bernard, D.W., A. Rodriguez, G.H. Rothblat and J.M. Glick: *cAmp stimulates cholesteryl ester clearance to high density lipoproteins in J7774 macrophages*. Journal of Biological Chemistry. **1991**. 266(2): p. 710-6.
28. Alam, R., F.M. Yatsu, L. Tsui and S. Alam: *Receptor-mediated uptake and 'retroendocytosis' of high-density lipoproteins by cholesterol-loaded human monocyte-derived macrophages: possible role in enhancing reverse cholesterol transport*. Biochimica et Biophysica Acta. **1989**. 1004(3): p. 292-9.
29. Rahim, A.T., A. Miyazaki, Y. Morino and S. Horiuchi: *Biochemical demonstration of endocytosis and subsequent resecretion of high-density lipoprotein by rat peritoneal macrophages*. Biochimica et Biophysica Acta. **1991**. 1082(2): p. 195-203.

30. Schmitz, G., H. Robenek, U. Lohmann and G. Assmann: *Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages*. EMBO Journal. **1985**. 4(3): p. 613-22.
31. Takahashi, K., S. Fukuda, M. Naito, S. Horiuchi, K. Takata and Y. Morino: *Endocytic pathway of high density lipoprotein via trans-Golgi system in rat resident peritoneal macrophages*. Lab Invest. **1989**. 61(3): p. 270-7.
32. McLean, L.R. and M.C. Phillips: *Mechanism of cholesterol and phosphatidylcholine exchange or transfer between unilamellar vesicles*. Biochemistry. **1981**. 20: p. 2893-2900.
33. Reichl, D., C.B. Hathaway, J.M. Sterchi and N.E. Miller: *Lipoproteins of human peripheral lymph. Apolipoprotein A-I-containing lipoprotein with alpha-2 electrophoretic mobility*. European Journal of Clinical Investigation. **1991**. 21(6): p. 638-43.
34. Asztalos, B.F., C.H. Sloop, L. Wong and P.S. Roheim: *Comparison of apo A-I-containing subpopulations of dog plasma and prenodal peripheral lymph: evidence for alteration in subpopulations in the interstitial space*. Biochimica et Biophysica Acta. **1993**. 1169: p. 301-304.
35. Heideman, C.L. and H.F. Hoff: *Lipoproteins containing apolipoprotein A-I extracted from human aortas*. Biochimica et Biophysica Acta. **1982**. 711(3): p. 431-44.
36. Cullis, P. and M.J. Hope: *Physical properties and functional roles of lipids in membranes*. in: Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Vance, D.E. and Vance, J. Eds.). Elsevier Press, Amsterdam. **1991**. p. 1-41.
37. Savion, N. and A. Gamliel: *Binding of apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-IV to cultured bovine aortic endothelial cells*. Arteriosclerosis. **1988**. 8(2): p. 178-86.
38. Fidge, N.H. and P.J. Nestel: *Identification of apolipoproteins involved in the interaction of human high density lipoprotein3 with receptors on cultured cells*. Journal of Biological Chemistry. **1985**. 260(6): p. 3570-5.
39. Oppenheimer, M.J., K. Sundquist and E.L. Bierman: *Downregulation of high-density lipoprotein receptor in human fibroblasts by insulin and IGF-I*. Diabetes. **1989**. 38(1): p. 117-22.
40. Oppenheimer, M.J., J.F. Oram and E.L. Bierman: *Up-regulation of high density lipoprotein receptor activity by gamma-interferon associated with inhibition of cell proliferation*. Journal of Biological Chemistry. **1988**. 263(36): p. 19318-23.
41. Hill, S.A. and M.J. McQueen: *Reverse cholesterol transport--a review of the process and its clinical implications*. Clinical Biochemistry. **1997**. 30(7): p. 517-25.
42. Schmidt, H.H. and M.P. Manns: *[Reverse cholesterol transport]*. Zeitschrift für Gastroenterologie. **1996**. 34(6): p. 386-91.
43. Bamberger, M., S. Lund Katz, M.C. Phillips and G.H. Rothblat: *Mechanism of the hepatic lipase induced accumulation of high-density lipoprotein cholesterol by cells in culture*. Biochemistry. **1985**. 24(14): p. 3693-701.
44. Rinninger, F. and R.C. Pittman: *Regulation of the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by human fibroblasts and Hep G2 hepatoma cells*. Journal of Lipid Research. **1988**. 29(9): p. 1179-94.
45. Glass, C., R.C. Pittman, D.B. Weinstein and D. Steinberg: *Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and*

- gonad*. Proceeding of the National Academy of Sciences USA. **1983**. 80(17): p. 5435-9.
46. McPherson, R. and Y. Marcel: *Role of cholesteryl ester transfer protein in reverse cholesterol transport*. Clinical Cardiology. **1991**. 14(2 Suppl 1): p. I31-4.
 47. Koo, C., T.L. Innerarity and R.W. Mahley: *Obligatory role of cholesterol and apolipoprotein E in the formation of large cholesterol-enriched and receptor-active high density lipoproteins*. Journal of Biological Chemistry. **1985**. 260(22): p. 11934-43.
 48. Garcia, A., R. Barbaras, X. Collet, A. Bogyo, H. Chap and B. Perret: *High-density lipoprotein 3 receptor-dependent endocytosis pathway in a human hepatoma cell line (HepG2)*. Biochemistry. **1996**. 35(40): p. 13064-71.
 49. Schwartz, L.C., L.A. Zech and J.M. Vandenbroek: *High Density Lipoprotein and Atherosclerosis*, ed. Miller, N. New York: Elsevier Sci. Publishing Co. Inc. **1989**: p. Pages.
 50. Cabral, D.J. and D. Small, M.: *Physical chemistry of bile*. in: Handbook of Physiology: The Gastrointestinal System (Schultz, S.O., Forte, J.G. and Ravner, B.B. Eds.). Waverly Press, Baltimore. **1989**. p. 621-662.
 51. Jelinek, D.F., S. Andersson, C.A. Slaughter and D.W. Russell: *Cloning and regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase, the rate-limiting enzyme in bile acid biosynthesis*. Journal of Biological Chemistry. **1990**. 265(14): p. 8190-7.
 52. Chiang, J.Y., W.F. Miller and G.M. Lin: *Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase in the liver. Purification of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and the immunochemical evidence for the induction of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by cholestyramine and circadian rhythm*. Journal of Biological Chemistry. **1990**. 265(7): p. 3889-97.
 53. Glomset, J.A., E.T. Janssen, R. Kennedy and J. Dobbins: *Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins*. Journal of Lipid Research. **1966**. 7(5): p. 638-48.
 54. Anantharamaiah, G.M., Y.V. Venkatachalapathi, C.G. Brouillette and J.P. Segrest: *Use of synthetic peptide analogues to localize lecithin:cholesterol acyltransferase activating domain in apolipoprotein A-I*. Arteriosclerosis. **1990**. 10(1): p. 95-105.
 55. Simard, G., D. Loiseau, A. Girault and B. Perret: *Reactivity of HDL subfractions towards lecithin-cholesterol acyltransferase. Modulation by their content in free cholesterol*. Biochimica et Biophysica Acta. **1989**. 1005(3): p. 245-52.
 56. Norum, K.R. and E. Gjone: *Familial serum-cholesterol esterification failure. A new inborn error of metabolism*. Biochimica et Biophysica Acta. **1967**. 144(3): p. 698-700.
 57. Stokke, K.T., K.S. Bjerve, J.P. Blomhoff, B. Oystese, A. Flatmark, K.R. Norum and E. Gjone: *Familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. Studies on lipid composition and morphology of tissues*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation Suppl. **1974**. 137: p. 93-100.
 58. Gordon, D.J. and B.M. Rifkind: *High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies*. New England Journal of Medicine. **1989**. 321(19): p. 1311-6.
 59. Miller, N.E., D.S. Thelle, O.H. Forde and O.D. Mjos: *The Tromso heart-study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: a prospective case-control study*. Lancet. **1977**. 1: p. 965-8.
 60. Gordon, T., W.P. Castelli, M.C. Hjortland, W.B. Kannel and T.R. Dawber: *High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study*. American Journal of Medicine. **1977**. 62(5): p. 707-14.

61. Gofmann, J.W., O. DeLalla and F. Glazier: *The serum lipid transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis, and coronary artery disease*. Plasma. **1954**. 2: p. 413-484.
62. Lund Katz, S., B. Hammerschlag and M.C. Phillips: *Kinetics and mechanism of free cholesterol exchange between human serum high- and low-density lipoproteins*. Biochemistry. **1982**. 21(12): p. 2964-9.
63. Marcel, Y.L., R. McPherson, M. Hogue, H. Czarnecka, Z. Zawadzki, P.K. Weech, M.E. Whitlock, A.R. Tall and R.W. Milne: *Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipemic subjects*. Journal of Clinical Investigation. **1990**. 85(1): p. 10-7.
64. Whitlock, M.E., T.L. Swenson, R. Ramakrishnan, M.T. Leonard, Y.L. Marcel, R.W. Milne and A.R. Tall: *Monoclonal antibody inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity in the rabbit. Effects on lipoprotein composition and high density lipoprotein cholesteryl ester metabolism*. Journal of Clinical Investigation. **1989**. 84(1): p. 129-37.
65. Brown, M.L., A. Inazu, C.B. Hesler, L.B. Agellon, C. Mann, M.E. Whitlock, Y.L. Marcel, R.W. Milne, J. Koizumi, H. Mabuchi and et al.: *Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins*. Nature. **1989**. 342(6248): p. 448-51.
66. Vilella, E., J. Joven, M. Frenandez, S. Vilaro, J.D. Brunzell, T. Olivecrona and G. Bengtsson-Olivecrona: *Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins*. Journal of Lipid Research. **1993**. 34: p. 1555-1564.
67. Day, J.R., J.J. Albers, C.E. Lofton Day, T.L. Gilbert, A.F. Ching, F.J. Grant, O.H. PJ, S.M. Marcovina and J.L. Adolphson: *Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells*. Journal of Biological Chemistry. **1994**. 269(12): p. 9388-91.
68. Morton, R.E. and D.J. Greene: *Regulation of lipid transfer between lipoproteins by an endogenous plasma protein: selective inhibition among lipoprotein classes*. Journal of Lipid Research. **1994**. 35(5): p. 836-47.
69. Morton, R.E. and D.J. Greene: *Suppression of lipid transfer inhibitor protein activity by oleate. A novel mechanism of cholesteryl ester transfer protein regulation by plasma free fatty acids*. Arteriosclerosis and Thrombosis Vascular Biology. **1997**. 17(11): p. 3041-8.
70. Assmann, G. and H.B. Brewer, Jr.: *Lipid-protein interactions in high density lipoproteins*. Proceeding of the National Academy of Sciences USA. **1974**. 71(3): p. 989-93.
71. Oram, J.F. and S. Yokoyama: *Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids*. Journal of Lipid Research. **1996**. 37(12): p. 2473-91.
72. Morrison, J.R., G.A. McPherson and N.H. Fidge: *Evidence for two sites on rat liver plasma membranes which interact with high density lipoprotein₃*. Journal of Biological Chemistry. **1992**. 267: p. 13205-13209.
73. Hara, H. and S. Yokoyama: *Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol*. Journal of Biological Chemistry. **1991**. 266(5): p. 3080-6.
74. Fielding, C.J., V.G. Shore and P.E. Fielding: *A protein cofactor of lecithin cholesterol acyltransferase*. Biochemical and Biophysical Research Communications. **1972**. 46(4): p. 1493-1498.

75. Nolte, R.T. and D. Atkinson: *Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism*. Biophysical Journal. **1992**. 63: p. 1221-1239.
76. Zannis, V.I., S.K. Karathanasis, H.T. Keutmann, G. Goldberger and J.L. Breslow: *Intracellular and extracellular processing of human apolipoprotein A-I: secreted apolipoprotein A-I isoprotein 2 is a propeptide*. Proceeding of the National Academy of Sciences USA. **1983**. 80: p. 2574-2578.
77. Mishra, V.K., M.N. Palgunachari, S. Lund Katz, M.C. Phillips, J.P. Segrest and G.M. Anantharamaiah: *Effect of the arrangement of tandem repeating units of class A amphipathic alpha-helices on lipid interaction*. Journal of Biological Chemistry. **1995**. 270(4): p. 1602-11.
78. Segrest, J.P., M.K. Jones, H. De Loof, C.G. Brouillette, Y.V. Venkatachalapathi and G.M. Anantharamaiah: *The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function*. Journal of Lipid Research. **1992**. 33: p. 141-166.
79. Segrest, J.P., H. De Loof, J.G. Dohlman, C.G. Brouillette and G.M. Anantharamaiah: *Amphipathic helix motif: Classes and properties*. Proteins. **1990**. 8: p. 103-117.
80. Li, W.H., M. Tanimura, C.C. Luo, S. Datta and L. Chan: *The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution*. Journal of Lipid Research. **1988**. 29: p. 245-271.
81. Boguski, M.S., M. Freeman, N.A. Elshourbagy, J.M. Taylor and J.I. Gordon: *On computer-assisted analysis of biological sequences: proline punctuation, consensus sequences, and apolipoprotein repeats*. Journal of Lipid Research. **1986**. 27: p. 1011-1034.
82. Minnich, A., X. Collet, A. Roghani, C. Cladaras, R.L. Hamilton, C.J. Fielding and V.I. Zannis: *Site-directed mutagenesis and structure-function analysis of the human apolipoprotein A-I*. Journal of Biological Chemistry. **1992**. 267(23): p. 16553-16560.
83. Deeb, S.S., M.C. Cheung, R. Peng, A.C. Wolf, R. Stern, J.J. Albers and R.H. Knoop: *A mutation in the human apolipoprotein A-I gene*. Journal of Biological Chemistry. **1991**. 266(21): p. 13654-13660.
84. Rader, D.J., R.E. Gregg, M.S. Meng, J.R. Schaefer, L.A. Zech, M.D. Benson and H.B. Brewer: *In vivo metabolism of a mutant apolipoprotein, apo A-I Iowa, associated with hypoalphalipoproteinemia and hereditary systemic amyloidosis*. Journal of Lipid Research. **1992**. 33: p. 755-763.
85. Le, N.A. and H.N. Ginsberg: *Heterogeneity of apolipoprotein A-I turnover in subjects with reduced concentrations of plasma high density lipoprotein cholesterol*. Metabolism. **1988**. 37: p. 614-617.
86. Brinton, E.A., S. Eisenberg and J.L. Breslow: *Increased apo A-I and apo A-II fractional catabolic rate in patients with low high density lipoprotein-cholesterol levels with or without hypertriglyceridemia*. Journal of Clinical Investigation. **1991**. 87: p. 536-544.
87. Liu, J.N. and V. Gurewich: *The kinetics of plasminogen activation by thrombin-cleaved pro-urokinase and promotion of its activity by fibrin fragment E-2 and by tissue plasminogen activator*. Blood. **1993**. 81(4): p. 980-7.
88. Rieger, K.J., N. Saez Servent, M.P. Papet, J. Wdzieczak Bakala, J.L. Morgat, J. Thierry, W. Voelter and M. Lenfant: *Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory*

- peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline*. Biochemical Journal. **1993**. 296(Pt 2): p. 373-8.
89. Skidgel, R.A. and F. Tan: *Structural features of two kininase I-type enzymes revealed by molecular cloning*. Agents Actions Suppl. **1992**. 38(Pt 1): p. 359-67.
 90. Ward, P.E., A. Chow and G. Drapeau: *Metabolism of bradykinin agonists and antagonists by plasma aminopeptidase P*. Biochemical Pharmacology. **1991**. 42(4): p. 721-7.
 91. Bojanovski, D., R.E. Gregg, I.A. Zech, M.S. Meng, C. Bishop, R. Ronan and H.B.j. Brewer: *In vivo metabolism of proapolipoprotein A-I in Tangier disease*. Journal of Clinical Investigation. **1987**. 80: p. 1742-1747.
 92. Lins, L., S. Piron, K. Conrath, B. Vanloo, R. Brasseur, M. Rosseneu, J. Baert and J.-M. Ruyschaert: *Enzymatic hydrolysis of reconstituted dimyristoylphosphatidylcholine-apo A-I complexes*. Biochimica et Biophysica Acta. **1993**. 1151: p. 137-142.
 93. Kunitake, S.T., G. Chi Chen, S.-F. Kung, J.W. Schilling, D.A. Hardman and J.P. Kane: *Pre-beta high density lipoprotein. Unique disposition of apolipoprotein A-I increases susceptibility to proteolysis*. Arteriosclerosis. **1990**. 10(1): p. 25-30.
 94. Scanu, A.M.: *Proteolytic enzymes in the biogenesis and metabolism of plasma HDL*. in: Atherosclerosis Reviews (Catapano, A.L. Eds.). Raven Press, New York. **1987**. p. 9-18.
 95. Bausserman, L.L. and P.N. Herbert: *Degradation of serum amyloid A and apolipoproteins by serum proteases*. Biochemistry. **1984**. 23(10): p. 2241-2245.
 96. Shore, V.G., A.S. Sae and B. Shore: *Surface exposure of apolipoproteins in high density lipoproteins. I. Reactivities with agarose-immobilized proteases*. Biochimica et Biophysica Acta. **1978**. 529(3): p. 319-330.
 97. Gregg, H., L.A. Zech and D. Bojanovski: *Tangier disease: Identification of normal and rapidly catabolized forms of plasma apolipoprotein A-I (abstract)*. Circulation. **1985**. 722(suppl III): p. III-364.
 98. Gruenwald, S. and J. Heitz, *Baculovirus Expression Vector System. Procedures and Methods manual*, in PharMingen. **1993**.
 99. Vaughn, J.L., R.H. Goodwin, G.J. Tompkins and P. McCawley: *The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae)*. In Vitro. **1977**. 13(4): p. 213-7.
 100. Markwell, A.K., S.M. Haas, L.L. Biebler and N.E. Tolbert: *A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples*. Analytical Biochemistry. **1978**. 87: p. 206-210.
 101. Whicher, J.T., C.P. Price and K. Spencer: *Immunonephelometric and immunoturbidimetric assay for proteins*. Critical Reviews of Clinical Laboratory Science. **1983**. 18: p. 213-260.
 102. Hughes, T.A., M.A. Moore, P. Neame, M.F. Medley and B.H. Chung: *Rapid quantitative apolipoprotein analysis by gradient ultracentrifugation and reversed-phase high performance liquid chromatography*. Journal of Lipid Research. **1988**. 29: p. 363-376.
 103. Brewer, H.B., R. Ronan, M. Meng and C. Bishop: *Isolation and characterization of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV*. Methods in Enzymology. **1986**. 128: p. 223-246.
 104. Adams, C.W., N.E. Miller, R.S. Morgan and S.N. Rao: *Lipoprotein levels and tissue lipids in fatty-fibrous atherosclerosis induced in rabbits by two years' cholesterol feeding at a low level*. Atherosclerosis. **1982**. 44(1): p. 1-8.

105. Beaumont, J.L. and P. Vivier: *Circulating IgA-Lp complexes in Watanabe heritable hyperlipidemic and cholesterol fed NZW rabbits*. *Atherosclerosis*. **1990**. 82(3): p. 227-235.
106. Carlson, T.L. and B.A. Kottke: *Effect of coconut oil on plasma apoA-I levels in WHHL and NZW rabbits*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1991**. 1083(3): p. 221-229.
107. Carlson, T.L. and B.A. Kottke: *ApoA-I secretion by rabbit intestinal mucosa cell cultures*. *Lipids*. **1991**. 26(9): p. 684-688.
108. Duverger, N., C. Viglietta, L. Berthou, F. Emmanuel, A. Tailleux, L. Parmentier Nihoul, B. Laine, C. Fievet, G. Castro, J.C. Fruchart, L.M. Houbesine and P. Deneffe: *Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein A-I in the liver*. *Arteriosclerosis and Thrombosis Vascular Biology*. **1996**. 16(12): p. 1424-9.
109. Barter, P.J. and K.-A. Rye: *Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport*. *Current Opinion in Lipidology*. **1996**. 7: p. 82-87.
110. Fielding, C.J. and P.E. Fielding: *Molecular physiology of reverse cholesterol transport*. *Journal of Lipid Research*. **1995**. 36: p. 211-228.
111. Schmidt, H.H.-J. and M.P. Manns: *Reverse cholesterol transport*. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. **1996**. 34: p. 386-391.
112. Kannel, W.B., W.P. Castelli, T. Gordon and P.M. McNamara: *Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study*. *Annals of Internal Medicine*. **1971**. 74(1): p. 1-12.
113. Carlson, L.A. and L.E. Bottiger: *Ischaemic heart-disease in relation to fasting values of plasma triglycerides and cholesterol. Stockholm prospective study*. *Lancet*. **1972**. 1(756): p. 865-8.
114. Pomerantz, K.B., L.N. Fleisher, A.R. Tall and P.J. Cannon: *Enrichment of endothelial cell arachidonate by lipid transfer from high density lipoproteins: relationship to prostaglandin I₂ synthesis*. *Journal of Lipid Research*. **1985**. 26(10): p. 1269-76.
115. Fleisher, L.N., A.R. Tall, L.D. Witte, R.W. Miller and P.J. Cannon: *Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins*. *Journal of Biological Chemistry*. **1982**. 257(12): p. 6653-5.
116. Mackness, M.I. and P.N. Durrington: *HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation*. *Atherosclerosis*. **1995**. 115(2): p. 243-53.
117. Parthasarathy, S., J. Barnett and L.G. Fong: *High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1990**. 1044(2): p. 275-83.
118. Parthasarathy, S., L.G. Fong, D. Otero and D. Steinberg: *Recognition of solubilized apoproteins from delipidated, oxidized low density lipoprotein (LDL) by the acetyl-LDL receptor*. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. **1987**. 84(2): p. 537-40.
119. Steinbrecher, U.P., S. Parthasarathy, D.S. Leake, J.L. Witztum and D. Steinberg: *Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids*. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. **1984**. 81(12): p. 3883-7.
120. Brewer, H.B., Jr. and D.J. Rader: *HDL: structure, function and metabolism*. *Progress in Lipid Research*. **1991**. 30(2-3): p. 139-44.
121. Banka, C.L., D.J. Bonnet, A.S. Black, R.S. Smith and L.K. Curtiss: *Localization of an apolipoprotein A-I epitope critical for activation of lecithin-cholesterol acyltransferase*. *Journal of Biological Chemistry*. **1991**. 266(35): p. 23886-92.

122. Emmerich, J., B. Verges, I. Tauveron, D. Rader, S. Santamarina Fojo, J. Shafer, M. Ayrault Jarrier, P. Thieblot and H.B. Brewer, Jr.: *Familial HDL deficiency due to marked hypercatabolism of normal apoA-I*. Arteriosclerosis and Thrombosis. **1993**. 13(9): p. 1299-306.
123. Butt, T.R. and S.K. Karathanasis: *Transcription factors as drug targets: opportunities for therapeutic selectivity*. Gene Expression. **1995**. 4(6): p. 319-36.
124. Sorci Thomas, M. and M.W. Kearns: *Species-specific polymorphism in the promoter of the apolipoprotein A-I gene: restoration of human transcriptional efficiency by substitution at positions -189, -144 and -48 bp*. Biochimica et Biophysica Acta. **1995**. 1256(3): p. 387-95.
125. Tall, A.R.: *Metabolic and genetic control of HDL cholesterol levels*. Journal of Internal Medicine. **1992**. 231(6): p. 661-8.
126. Clay, M.A., H.H. Newnham, T.M. Forte and P.I. Barter: *Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase activity promote shedding of apo A-I from HDL and subsequent formation of discoidal HDL*. Biochimica et Biophysica Acta. **1992**. 1124(1): p. 52-8.
127. Rader, D.J., K. Ikewaki, N. Duverger, I. Feuerstein, L. Zech, W. Connor and H.B. Brewer, Jr.: *Very low high-density lipoproteins without coronary atherosclerosis*. Lancet. **1993**. 342(8885): p. 1455-8.
128. Hayek, T., Y. Ito, N. Azrolan, R.B. Verdery, K. Aalto Setala, A. Walsh and J.L. Breslow: *Dietary fat increases high density lipoprotein (HDL) levels both by increasing the transport rates and decreasing the fractional catabolic rates of HDL cholesterol ester and apolipoprotein (Apo) A-I. Presentation of a new animal model and mechanistic studies in human Apo A-I transgenic and control mice*. Journal of Clinical Investigation. **1993**. 91(4): p. 1665-71.
129. Schultz, J.R., J.G. Verstuyft, E.L. Gong, A.V. Nichols and E.M. Rubin: *Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL in transgenic mice*. Nature. **1993**. 365(6448): p. 762-4.
130. Itakura, K., T. Hirose, R. Crea, A.D. Riggs, H.L. Heyneker, F. Bolivar and H.W. Boyer: *Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin*. Science. **1977**. 198(4321): p. 1056-63.
131. Goeddel, D.V., D.G. Kleid, F. Bolivar, H.L. Heyneker, D.G. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Kraszewski, K. Itakura and A.D. Riggs: *Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin*. Proceeding of the National Academy of Sciences USA. **1979**. 76(1): p. 106-10.
132. Schmidt, H.H.-J., A.T. Remaley, A.J. Stonik, R. Ronan, A. Wellmann, F. Thomas, L.A. Zech, H.B. Brewer and J.M. Hoeg: *Carboxyl-terminal domain truncation alters apolipoprotein A-I in vivo catabolism*. Journal of Biological Chemistry. **1995**. 270(10): p. 5469-5475.
133. Mallory, J.B., P.J. Kushner, A.A. Protter, C.L. Cofer, V.L. Appleby, K. Lau, J.W. Schilling and J.-L. Vigne: *Expression and characterization of human apolipoprotein A-I in chinese hamster ovary cells*. Journal of Biological Chemistry. **1987**. 262(9): p. 4241-4247.
134. Brissette, L., N. Cahuzac-Bec, M. Desforges, J.-L. Bec, Y.L. Marcel and E. Rassart: *Expression of recombinant human apolipoprotein A-I in chinese hamster ovary cells and escherichia coli*. Protein Expression and Purification. **1991**. 2: p. 296-303.
135. Hoeg, J.M., M.S. Meng, R. Ronan, T. Fairwell and H.B.j. Brewer: *Human apolipoprotein A-I : Post-translational modification by fatty acid acylation*. Journal of Biological Chemistry. **1986**. 261: p. 3911-3914.

136. Beg, Z.H., J.A. Stonik, J.M. Hoeg, S.J. Demosky, T. Fairwell and H.B.j. Brewer: *Human apolipoprotein A-I: Post-translational modification by covalent phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry. **1989**. 264: p. 6913-6921.
137. Schmidt, H.H.-J., R. Haas, A. Remaley, J. Genschel, C. Strassburg, C. Büttner and M.P. Manns: *In vivo kinetics as a sensitive method for testing physiologically intact human recombinant apolipoprotein A-I: comparison of three different expression systems*. Clinical Chimica Acta. **1997**. 268: p. 41-60.
138. Luckow, V.A. and M.D. Summers: *Signals important for high-level expression of foreign genes in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus expression vectors*. Virology. **1988**. 167(1): p. 56-71.
139. Pyle, L.E., P. Barton, Y. Fujiwara, A. Mitchell and N.H. Fidge: *Secretion of biologically active human proapolipoprotein A-I in a baculovirus-insect cell system: protection from degradation by protease inhibitors*. Journal of Lipid Research. **1995**. 36: p. 2355-2361.
140. Sorci-Thomas, M., J.S. Parks, M.W. Kearns, G.N. Pate, C. Zhang and M.J. Thomas: *High level secretion of wild-type and mutant forms of human proapoA-I using baculovirus-mediated Sf-9 cell expression*. Journal of Lipid Research. **1996**. 37: p. 673-683.
141. Schmidt, H.H.-J., J. Genschel, R. Haas, C. Büttner and M.P. Manns: *Expression and purification of recombinant human apolipoprotein A-I in chinese hamster ovary cells*. Protein Expression and Purification. **1997**. 10: p. 226-236.
142. Allan, C.M., N.H. Fidge and J. Kanellos: *Antibodies to the carboxyl terminus of human apolipoprotein A-I. The putative cellular binding domain of high density lipoprotein 3 and carboxyl-terminal structural homology between apolipoproteins A-I and A-II*. Journal of Biological Chemistry. **1992**. 267(19): p. 13257-61.
143. Chiang, C.-M. and R.G. Roeder: *Expression and purification of general transcription factors by FLAG epitope-tagging and peptide elution*. Peptide Research. **1993**. 6: p. 62-64.
144. Quig, D.W. and D.B. Zilversmit: *High density lipoprotein metabolism in a rabbit model of hyperalphalipoproteinemia*. Atherosclerosis. **1989**. 76: p. 9-19.
145. Saku, K., K. Yamamoto, T. Sakai, T. Yanagida, K. Hidaka, J. Sasaki and K. Arakawa: *Kinetics of HDL-apo A-I in the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia*. Atherosclerosis. **1989**. 79: p. 225-230.
146. Shames, D.M., N. Yamada and R.J. Havel: *Metabolism of ApoB-100 in lipoproteins separated by density gradient ultracentrifugation in normal and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits*. Journal of Lipid Research. **1990**. 31(5): p. 753-762.
147. Van Nierk, J.L., P.N. Demacker, T. Hendriks and H.H. De Boer: *A comparative study on serum lipids and atherosclerotic plaque formation in diet-induced and familial hypercholeolemia in rabbits, and the effect of partial ileal bypass*. Artery. **1985**. 12(4): p. 263-276.
148. Schreyer, S.A., L.K. Hart and A.D. Attie: *Hypercatabolism of lipoprotein-free apolipoprotein A-I in HDL-deficient mutant chickens*. Arteriosclerosis and Thrombosis. **1994**. 14(12): p. 2053-9.
149. Ji, Y. and A. Jonas: *Properties of an N-terminal proteolytic fragment of apolipoprotein A-I in solution and in reconstituted high density lipoproteins*. Journal of Biological Chemistry. **1995**. 270: p. 11290-11297.
150. Hom, L.G. and L.E. Volkman: *Preventing proteolytic artifacts in the baculovirus expression system*. Biotechniques. **1998**. 25(1): p. 18-20.

151. Guan, C., T. Cui, V. Rao, W. Liao, J. Benner, C.L. Lin and D. Comb: *Activation of glycosylasparaginase. Formation of active N-terminal threonine by intramolecular autoproteolysis.* Journal of Biological Chemistry. **1996.** 271(3): p. 1732-7.
152. Abraham, L.D. and C. Breuil: *Factors affecting autolysis of a subtilisin-like serine proteinase secreted by Ophiostoma piceae and identification of the cleavage site.* Biochimica et Biophysica Acta. **1995.** 1245(1): p. 76-84.
153. Falcone, D.J., W. Borth, T.A. McCaffrey, J. Mathew and K. McAdam: *Regulation of macrophage receptor-bound plasmin by autoproteolysis.* Journal of Biological Chemistry. **1994.** 269(51): p. 32660-6.
154. Forte, T.M., R. Goth-Goldstein, R.W. Nordhausen and M.R. McCall: *Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles.* Journal of Lipid Research. **1983.** 34: p. 317-324.
155. Forte, T.M., M.R. McCall, S. Amacher, R.W. Nordhausen, J.-L. Vigne and J.B. Mallory: *Physical and chemical characteristics of apolipoprotein A-I-lipid complexes produced by chinese hamster ovary cells transfected with the human apolipoprotein A-I gene.* Biochimica et Biophysica Acta. **1990.** 1047: p. 11-18.
156. Westerlund, J.A. and K.H. Weisgraber: *Discrete carboxyl-terminal segments of apolipoprotein E mediate lipoprotein association and protein oligomerization.* Journal of Biological Chemistry. **1993.** 268: p. 15745-15750.
157. Garber, D.W., Y.V. Venkatachalapathi, K.B. Gupta, J. Ibdah, M.C. Phillips, J.B. Hazelrig, J.P. Segrest and G.M. Anantharamaiah: *Turnover of synthetic class A amphipathic peptide analogues of exchangeable apolipoproteins in rats. Correlation with physical properties.* Arteriosclerosis and Thrombosis. **1992.** 12(8): p. 886-94.
158. Sparks, D.L., S. Lund-Katz and M.C. Phillips: *The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles.* Journal of Biological Chemistry. **1992.** 267 No 36: p. 25839-25847.
159. Vanloo, B., L. Demoor, C. Boutillon, L. Lins, R. Brasseur, J. Baert, J.C. Fruchart, A. Tartar and M. Rosseneu: *Association of synthetic peptide fragments of human apolipoprotein A-I with phospholipids.* Journal of Lipid Research. **1995.** 36(8): p. 1686-96.
160. Hammer, R.E., V.G. Pursel, C.E. Rexroad, Jr., R.J. Wall, D.J. Bolt, K.M. Ebert, R.D. Palmiter and R.L. Brinster: *Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection.* Nature. **1985.** 315(6021): p. 680-3.
161. Fisher, W.R., V. Venkatakrishnan, L.A. Zech, C.M. Hall, L.L. Kilgore, P.W. Stacpoole, M.R. Diffenderfer, K.E. Friday, A.E. Sumner and J.B. Marsh: *Kinetic evidence for both a fast and a slow secretory pathway for apolipoprotein A-I in humans.* Journal of Lipid Research. **1995.** 36: p. 1618-1628.
162. Ikewaki, K., D.J. Rader, T. Sakamoto, M. Nishiwaki, N. Wakimoto, J.R. Schaefer, T. Ishikawa, T. Fairwell, L.A. Zech, H. Nakamura and et al.: *Delayed catabolism of high density lipoprotein apolipoproteins A-I and A-II in human cholesteryl ester transfer protein deficiency.* Journal of Clinical Investigation. **1993.** 92(4): p. 1650-8.
163. Zech, L.A., E.J. Schaefer, T.J. Bronzert, R.L. Aamodt and H.B. Brewer, Jr.: *Metabolism of human apolipoproteins A-I and A-II: compartmental models.* Journal of Lipid Research. **1983.** 24(1): p. 60-71.

164. Roma, P., R.E. Gregg, M.S. Meng, R. Ronan, L.A. Zech, G. Franceschini, C.R. Sirtori and H.B. Brewer: *In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A-I, apo A-I Milano, associated with familial hypoalphalipoproteinemia*. Journal of Clinical Investigation. **1993**. 91: p. 1445-1452.
165. Schaefer, E.J., L.A. Zech, L.L. Jenkins, T.J. Bronzert, E.A. Rubalcaba, F.T. Lindgren, R.L. Aamodt and H.B. Brewer, Jr.: *Human apolipoprotein A-I and A-II metabolism*. Journal of Lipid Research. **1982**. 23(6): p. 850-62.
166. Glass, C.K., R.C. Pittman, G.A. Keller and D. Steinberg: *Tissue Sites of Degradation of Apolipoprotein in Rat*. Journal of Biological Chemistry. **1983**. 258: p. 7161-7167.
167. Glass, C., R.C. Pittman, M. Civen and D. Steinberg: *Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat in vivo and by adrenal cells and hepatocytes in vitro*. Journal of Biological Chemistry. **1985**. 260: p. 744-750.
168. Saku, K., R. Liu, T. Ohta, S. Jimi, I. Matsuda and K. Arakawa: *Plasma HDL levels are regulated by the catabolic rate of large particles of lipoprotein containing apo-A-I*. Biochemical and Biophysical Research Communications. **1994**. 200: p. 557-561.

Danksagungen

Zuerst danke ich Herrn Professor M. Manns für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie und die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Abteilung anfertigen zu können. Ich danke ihm auch für die Übernahme des Koreferats.

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. W. Müller für die fachliche Betreuung dieser Arbeit und für die Übernahme des Referats als mein Doktorvater.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. H.H.-J. Schmidt, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand. Vor allem schätzte ich seine engagierte und motivierende Betreuung und die Möglichkeit, mich jederzeit mit Fragen und Diskussionspunkten an ihn wenden zu können. Dankbar bin ich ihm auch für die persönliche und freundschaftliche Unterstützung, die mir über die Arbeit hinausgehend zuteil wurde.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Gastroenterologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima. Insbesondere bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der "AG Schmidt", d.h. Sanne, Regina, Monika, Kerstin, Janine und Marcus, möchte ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken. Den Doktorandinnen und Doktoranden Carsten, Mevlüt, Sybilla, Peter und Nicole danke ich für ihre tatkräftige Mithilfe bei so mancher "Kaninchenkinetik".

Ich danke Herrn Dr. Gielow, Frau Krull und Frau Messerschmidt für die Unterstützung bei den Radiomarkierungen. Bei Herrn Dr. M. Raida (Institut für Peptidforschung, Hannover) möchte ich mich sehr herzlich für die Proteinsequenzierungen bedanken. Herrn Dr. N. Duverger (Rhône-Poulenc Rorer-Gencell, Vitry, Frankreich) danke ich für die transgenen Kaninchen. Der Firma Bayer und insbesondere Herrn Dr. R. Grützmann möchte ich für die Überlassung diverser monoklonaler Antikörper danken.

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die mir während meiner Promotion zur Seite gestanden und mich begleitet haben: Bei meinen Freundinnen und Freunden und vor allen Dingen bei Herrn Uwe Voges.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, die mich bei meinem Berufswunsch stets ohne Vorbehalt und Zögern unterstützt haben.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, im Dezember 1998

Regina Haas

Regina Haas
Stolzestraße 12
30171 Hannover

Tabellarischer Lebenslauf

Geburtsdatum:	18. Juni 1968	
Geburtsort:	Hanau	
Familienstand:	ledig	
Schulbesuch:	1974-1987	Einhardtschule in Seligenstadt
	1987	Abitur
Ausbildung:	1987-1989	Ausbildung zur landwirtschaftlich-technischen Assistentin in Göttingen
Studium:	1989	Beginn des Studiums der Biochemie an der Universität in Regensburg
	1992	zum Sommersemester Studienortswechsel an die Universität Hannover
	Okt. 1994	Diplomprüfung an der Universität Hannover in den Fächern Biochemie, Biophysikalische Chemie und Tierphysiologie
	Okt. 1994- Mai 1995	Anfertigung der Diplomarbeit in der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover
	08.05.1995	Diplom an der Universität Hannover
Promotion:	August 1995	Beginn der Promotion in der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover