

# **Expression, Anreicherung und Charakterisierung von rekombinantem Apolipoprotein A-I in CHO-Zellen**

Von dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Chem. Janine Genschel

geboren am 09.08.1967 in Hannover

1998

Referent: Privat-Dozent der Biochemie  
Dr. rer. nat. Walter Müller

Koreferent: Professor der Molekularpharmakologie  
Dr. med Klaus Resch

Datum der Promotion: 13. 01. 1998

Für meine Mutter

Hannover, im November 1997

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben.

Aus Prioritätsgründen wurde Auszüge dieser Arbeit bereits in folgenden Zeitschriften veröffentlicht:

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.

Schmidt, H.H.-J., J. Genschel, R. Haas, and M.P. Manns, Preparative electrophoresis: An improved method for the isolation of human recombinant apolipoprotein A-I. *Biotechniques*, **1997**: in press.

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 physiological intact human recombinant apolipoprotein A-I: comparing three different expression systems. *Clinical Chimica Acta*, **1997**:in press.

## **DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. P. Manns, Leiter der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover, für die Möglichkeit, in seiner Abteilung diese Dissertation anfertigen zu dürfen.

Ebenso möchte ich mich besonders bei Herrn PD Dr. W. Müller für die Betreuung dieser Arbeit als mein Doktorvater bedanken, der mir immer mit Rat und Tat zur Verfügung stand.

Herrn Prof. Dr. K. Resch danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Für die kompetente und ausführliche fachliche Betreuung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. H. H.-J. Schmidt bedanken, in dessen Arbeitsgruppe diese Dissertation entstand und ohne dessen Anregungen und Hilfestellungen eine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso möchte ich an dieser Stelle den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Klinische Diätetik der MHH für die zahllosen kleinen und großen Hilfestellungen danken (besonderen Dank an Carsten, Regina, Regina, Marcus, Beate, Monika, Sanne und Kerstin).

## ABSTRACT

High Density Lipoproteine (HDL) spielen als antiatherogener Faktor infolge der Funktion im reversen Cholesterintransport eine besondere physiologische Rolle. Das Hauptstrukturprotein der HDL, das Apolipoprotein A-I (ApoA-I), determiniert die Serumkonzentration der HDL-Fraktion im Plasma. Eine gesteigerte Synthese von ApoA-I führt zu erhöhten Serumkonzentrationen der HDL-Fraktion, während ein gesteigerter ApoA-I Katabolismus typischerweise zu einer erniedrigten HDL-Fraktion führt. Der katabole Weg von ApoA-I ist bisher nicht näher charakterisiert worden. Mutationen im ApoA-I können drastische Störungen im ApoA-I- und HDL-Stoffwechsel bewirken. Eine Punktmutation des ApoA-I (ApoA-I<sub>Iowa</sub>, Gly<sub>26</sub>→Arg) führt zu einem deutlich veränderten Metabolismus; die Folge sind ApoA-I<sub>(1-83)</sub> Fragmente, die aggregiert im Gewebe nachzuweisen sind.

Gegenstand dieser Arbeit war die Optimierung der Genexpression von rekombinantem humanem ApoA-I und r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> in CHO-Zellen sowie die nachfolgende Anreicherung und Charakterisierung der rekombinanten Proteine. Als optimales Expressionsmedium erwies sich CHO-S-SFM II (Gibco, Life Technologies, Berlin, Deutschland) bei einer Zinkkonzentration von 80 µM und einer Kultivierungsdauer von 72 Stunden (Expressionsrate 20-30 µg/ml ApoA-I). Interessanterweise wurden sowohl bei der Expression als auch bei Aufreinigungsschritten ApoA-I Fragmente nachgewiesen. Zur Minimierung der Fragmentbildung wurde der Einfluß verschiedener Proteaseinhibitoren während der Proteinexpression getestet. Eine verminderte Degradation sowie eine Erhöhung der exprimierten ApoA-I Menge konnte unter dem Einfluß des Inhibitors Pepstatin festgestellt werden. Als Standardverfahren zur quantitativen Isolation der rekombinanten Proteine wurde die Reversed Phase Chromatographie etabliert. Mit Hilfe der präparativen Elektrophorese konnte zusätzlich ein Verfahren entwickelt werden, mit dem sich ApoA-I Fragmente von wenigen kDa Unterschied im Molekulargewicht voneinander trennen ließen. Mit massenspektroskopischen Methoden und Aminosäuresequenzanalyse konnten zwei N-terminal intakte apoA-I Fragmente identifiziert werden.

Zur Untersuchung des physiologischen Verhaltens wurden stoffwechselkinetische Untersuchungen im Kaninchenmodell durchgeführt. Hier wurde zunächst rekombinant exprimiertes r-ApoA-I<sub>WT</sub> mit ApoA-I isoliert aus humanen HDL (h-ApoA-I) verglichen. Für beide Proteine konnte ein identischer *in vivo* Metabolismus und eine vergleichbare Lipidassoziation nachgewiesen werden. Die *in vivo* Charakterisierung von r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> ergab im Vergleich zu r-ApoA-I<sub>WT</sub> einen deutlich beschleunigten Katabolismus des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>. Außerdem konnte eine höhere Affinität des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> zu dichteren HDL-Partikeln nachgewiesen werden. Die veränderte Lipidassoziation von r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> ist bedingt durch die Punktmutation und die daraus wahrscheinlich resultierenden strukturellen Veränderungen des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>. Eine Hypothese zur Erklärung dieser Daten ist, daß das mit dichteren HDL-Fraktionen assoziierte r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> schneller in einen lipidfreien Zustand übergeht, dort einer Degradation unterliegt und somit schneller katabolisiert wird. Inwieweit bei der Degradation spezifische Proteasen beteiligt sind bzw. eine Autoproteolyse vorliegt oder eine mechanische Instabilität eine Rolle spielt, konnte noch nicht geklärt werden.

## KEYWORDS

High Density Lipoproteine (HDL)

Apolipoprotein A-I

Proteinexpression

## ABSTRACT

Because of its function in the reverse cholesterol transport high density lipoproteins (HDL) play an important physiological role as an antiatherogenic factor. Apolipoprotein A-I (apoA-I) is the major protein component of HDL and determines the serum concentration of HDL. An increased synthesis of apoA-I leads to an increased concentration of HDL. In contrast, a decreased catabolism leads to an decreased HDL level. The catabolism of apoA-I is not known in detail. Mutations of apoA-I leads to dramatically disfunctions in apoA-I and HDL metabolism. A point mutation in apoA-I (apoA-I<sub>Iowa</sub>, Gly<sub>26</sub>→Arg) causes distinct alterations in metabolism. Fragments of apoA-I (apoA-I<sub>1-83</sub>) were found as amyloid deposits in the tissue.

Here we optimized the expression and purification of human recombinant apoA-I and apoA-I<sub>Iowa</sub> in CHO-cells. The best expression rate (20-30 µg/ml apoA-I) was detected using the medium CHO-S-SFM II (Gibco, Life Technologies, Berlin, Germany) with a zinc concentration of 80 µM and 72 hours of culture. The best method to purify the recombinant proteins was reversed phase chromatography. Interestingly, during expression and purification procedures we detected almost apoA-I fragments. To minimize the generation of fragments we tested the influence of protease inhibitors during the protein expression. A decrease in degradation and an increased amount of the expressed apoA-I was detected using the inhibitor pepstatin. Using preparative electrophoresis we established a method to purify apoA-I fragments with only a few kDa difference in their molecular weight. Two N-terminal intact apoA-I fragments could be identified by amino acid sequence analysis and mass spectroscopy. To get more insights in the physiological behavior of the recombinant proteins we performed *in vivo* studies with rabbits as an animal model. First we compared recombinant r-apoA-I<sub>wildtype</sub> with apoA-I derived from human HDL (h-apoA-I). The *in vivo* studies showed an identical metabolism and a comparable association with lipids. The *in vivo* characterization of r-apoA-I<sub>Iowa</sub> showed a decreased catabolism of r-apoA-I<sub>Iowa</sub> and a lipid association with more dense HDL particles compared to r-apoA-I<sub>wildtype</sub>. The altered lipid association of r-apoA-I<sub>Iowa</sub> is caused by the point mutation and the resulting conformational change in protein structure. The apoA-I<sub>Iowa</sub>, associated with the more dense HDL fraction, presumably is released easily from the particles. Then the lipid free apoA-I was faster degraded and catabolized. If specific proteases causes the degradation, an autoproteolysis occur, or mechanical instability plays an important role remains to be elucidated.

## KEYWORDS

High density lipoproteins (HDL)  
Apolipoprotein A-I  
Protein expression



# INHALTSVERZEICHNIS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1 LIPOPROTEINE.....  | 5         |
| 1.2 APOLIPOPROTEINE.....   | 8         |
| 1.3 STOFFWECHSEL DER LIPOPROTEINE .....                                    | 9         |
| 1.4 HIGH-DENSITY-LIPOPROTEINE .....  | 10        |
| 1.5 APOLIPOPROTEIN A-I .....   | 12        |
| 1.6 APOLIPOPROTEIN A-I VARIANTEN.....                                      | 15        |
| 1.7 APOLIPOPROTEIN A-I UND AMYLOIDOSE .....                                | 16        |
| 1.8 AUFGABENSTELLUNG .....   | 18        |
| <b>2 METHODEN.....</b>   | <b>19</b> |
| 2.1 ZELLKULTUR.....  | 19        |
| 2.1.1 Zellen .....   | 19        |
| 2.1.2 Auftauen der Zellen.....   | 20        |
| 2.1.3 Kultivierung der Zellen .....  | 20        |
| 2.1.4 Passagieren von Zellen .....   | 20        |
| 2.1.5 Induktion der ApoA-I Expression .....                                | 20        |
| 2.1.6 Einfrieren von Zellen .....  | 21        |
| 2.1.7 Bestimmung der Zellzahl .....  | 21        |
| 2.1.8 Isolation des „High expression clone“ .....                          | 22        |
| 2.1.9 Bestimmung des optimalen serumfreien Expressionsmedium .....         | 22        |
| 2.1.10 Medien .....  | 23        |
| 2.1.11 Konzentrierung von Zellkulturüberständen .....                      | 24        |
| 2.1.12 Expression von r-ApoA-I mit der MiniPerm® .....                     | 24        |
| 2.1.13 Proteaseinhibitoren .....   | 25        |
| 2.2 QUANTITATIVE METHODEN .....  | 26        |
| 2.2.1 Proteinbestimmung nach Lowry.....                                    | 26        |
| 2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford .....                                | 27        |
| 2.2.3 Nephelometrische Quantifizierung von Proteinen.....                  | 28        |
| 2.3 ELEKTROPHORETISCHE METHODEN.....                                       | 32        |
| 2.3.1 Acetonfällung .....  | 32        |
| 2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAAGE)..... | 32        |
| 2.3.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF) .....                              | 34        |
| 2.3.4 Färbung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau .....         | 34        |
| 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 Präparative Elektrophorese mit der Modell 491 PrepCell® .....                     | 38        |
| <b>2.4 CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN .....</b>  | <b>39</b> |
| 2.4.1 Size Exclusion Chromatographie (Gelfiltration) .....                              | 39        |
| 2.4.1.1 Superose 6 .....  | 40        |
| 2.4.1.2 HiLoad Superdex 75.....   | 40        |
| 2.4.2 Anionenaustauschchromatographie .....   | 41        |
| 2.4.3 Affinitätschromatographie .....   | 42        |
| 2.4.4 Reversed Phase Chromatographie.....   | 43        |
| <b>2.5 ISOLATION VON HUMANEM APOLIPOPROTEIN A-I AUS SERUM.....</b>                      | <b>44</b> |
| <b>2.6 STOFFWECHSELKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN .....</b>                                  | <b>45</b> |
| 2.6.1 Kaninchen .....   | 45        |
| 2.6.2 Kaninchenhaltung .....  | 45        |
| 2.6.3 Radioiodmarkierung von Apolipoprotein A-I .....                                   | 45        |
| 2.6.3.1 Iod-Mono-Chlorid-Methode.....   | 45        |
| 2.6.4 Isolation der HDL-Fraktion .....  | 47        |
| 2.6.4.1 Isolation der HDL-Fraktion mittels Ultrazentrifugation.....                     | 47        |
| 2.6.4.2 Superose 6 .....  | 47        |
| 2.6.5 Stoffwechselkinetische Untersuchungen .....                                       | 48        |
| 2.6.6 FPLC-Analyse.....   | 48        |
| 2.6.7 Dichtegradienten-Ultrazentrifugations-Analyse.....                                | 48        |
| 2.6.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAAGE).....                               | 50        |
| <b>2.7 BESTIMMUNG DER N-TERMINALEN PROTEINSEQUENZ.....</b>                              | <b>50</b> |
| <b>2.8 MASSENSPEKTROSKOPISCHE ANALYSEN .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>3 ERGEBNISSE.....</b>  | <b>51</b> |
| <b>3.1 EXPRESSION VON HUMANEM, REKOMBINANTEN APOLIPOPROTEIN A-I IN CHO-ZELLEN .....</b> | <b>51</b> |
| 3.1.1 Isolation eines „High Expression Clone“ .....                                     | 51        |
| 3.1.2 Optimierung der Expressionsbedingungen.....                                       | 52        |
| 3.1.3 Expression von r-ApoA-I mit der MiniPerm® .....                                   | 58        |
| 3.1.4 Proteaseinhibitoren .....   | 62        |
| <b>3.2 ANREICHERUNG UND ISOLIERUNG VON REKOMBINANTEM APOLIPOPROTEIN A-I .....</b>       | <b>67</b> |
| 3.2.1 Chromatographische Methoden.....  | 67        |
| 3.2.1.1 Gelfiltrationschromatographie.....  | 67        |
| 3.2.1.1.1 Superose 6 .....  | 67        |
| 3.2.1.1.2 HiLoad Superdex 75 .....  | 68        |
| 3.2.1.2 Ionenaustauschchromatographie .....   | 70        |
| 3.2.1.3 Affinitätschromatographie.....  | 75        |
| 3.2.1.4 Reversed Phase Chromatographie .....  | 77        |
| 3.2.2 Elektrophoretische Methoden .....   | 81        |
| 3.2.2.1 Elektroelution.....   | 81        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.2.2.2 Modell 491 PrepCell® .....   | 82         |
| 3.2.2.3 Analyse der r-ApoA-I Fragmente.....                                    | 85         |
| 3.2.2.3.1 N-terminale Proteinsequenzierung .....                               | 85         |
| 3.2.2.3.2 Massenspektroskopische Untersuchungen .....                          | 87         |
| <b>3.3 CHARAKTERISIERUNG DES REKOMBINANTEN APOLIPOPROTEIN A-I .....</b>        | <b>89</b>  |
| 3.3.1 Isoelektrische Fokussierung .....  | 89         |
| 3.3.2 Stoffwechselkinetische Untersuchungen im Kaninchenmodell.....            | 90         |
| 3.3.2.1 Vergleich humanes ApoA-I versus rekombinantes ApoA-I.....              | 90         |
| 3.3.2.1.1 Radioiodmarkierung.....  | 90         |
| 3.3.2.1.2 Stoffwechselkinetik .....  | 90         |
| 3.3.2.1.3 FPLC- und Dichtegradienten-Ultrazentrifugations-Analyse .....        | 91         |
| 3.3.2.1.4 Inkubationen in Humanserum .....                                     | 93         |
| 3.3.2.2 Vergleich r-ApoA-I <sub>WT</sub> versus r-ApoA-I <sub>Iowa</sub> ..... | 95         |
| 3.3.2.2.1 Radioiodmarkierung.....  | 95         |
| 3.3.2.2.2 Abtrennung der HDL-Fraktion.....                                     | 95         |
| 3.3.2.2.3 Stoffwechselkinetik .....  | 98         |
| 3.3.2.2.4 FPLC- und Dichtegradienten-Ultrazentrifugations-Analyse .....        | 100        |
| 3.3.2.2.5 Inkubationen in Humanserum .....                                     | 105        |
| <b>4 DISKUSSION.....</b>   | <b>109</b> |
| <b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>121</b> |
| <b>6 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....</b>                                      | <b>123</b> |
| <b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>125</b> |



# 1 EINLEITUNG

Lipide stellen einen wichtigen Bestandteil aller lebenden Organismen dar. Sie sind wasserunlöslich und deshalb müssen in der sonst wäßrigen Umgebung geeignete Transportmöglichkeiten existieren. Für manche Moleküle (z.B. Steroidhormone) gibt es spezifische Transportproteine, andere wiederum bilden mizellare Komplexe mit Proteinen [1].

Lipide lassen sich in amphiphile und hydrophobe Lipide einteilen. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Lipidklassen und deren wichtigste Funktionen.

| Lipid  | Funktion   |
|--|--|
| <i>Neutrallipide (hydrophob):</i>  |  |
| • Glyzeride<br>(Mono-, Di-, Triglyzeride)  | Energieversorgung  |
| • Cholesterinester   | Transportform des Cholesterins   |
| <i>polare Lipide (amphiphil):</i>  |  |
| • Phospholipide (Lecithin,<br>Sphingomyelin, Lysolecithin,<br>Phosphatidyl- Ethanol- | Lösungsvermittler, Oberflächenlipide   |
| • amin, Phosphatidyl-Serin)  |  |
| • Cholesterin  | Baustein von Zellmembranen,<br>metabolische Vorstufe von Gallensäuren<br>und Steroidhormonen |
| • freie Fettsäuren   | Bausteine zusammengesetzter Lipide,<br>Energieversorgung                                     |
| <i>Vitamine (A, K, D, E):</i>  | u.a. Antioxidantien  |

Tabelle 1: Lipidklassen des Plasmas [2]

## 1.1 Lipoproteine

Lipoproteine sind Molekülkomplexe, die sich aus Triglyzeriden, Phospholipiden, Cholesterin, Cholesterinestern und Apolipoproteinen zusammensetzen. Sie sind für die Aufnahme, den Transport und die Verstoffwechslung der Nahrungsfette und des Cholesterins sowie der körpereigenen Lipide verantwortlich. Diese Komplexe bestehen aus einem hydrophoben Kern (Triglyzeride, Cholesterinester) und einem hydrophilen Mantel (Apolipoproteine, Cholesterin, Phospholipide). In dieser Form werden die Lipide im hydrophilen Blut transportiert [3-9].

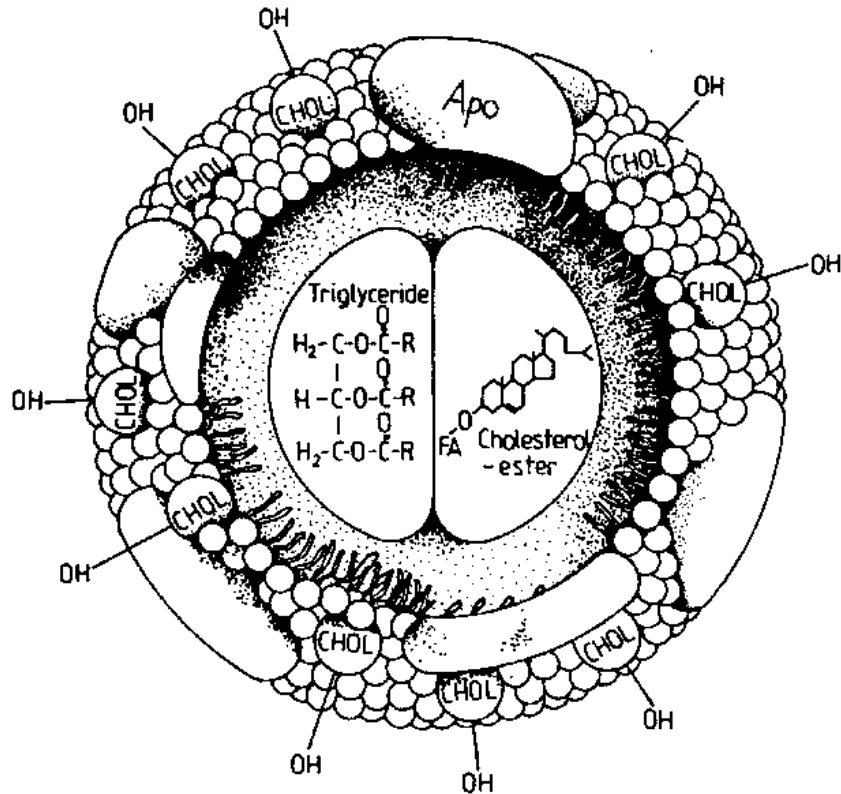


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Lipoproteinpartikel [1]

Lipoproteine sind keine streng definierten Komplexe, sondern variieren in Struktur und Zusammensetzung über einen weiten Bereich. Die Bestimmung der hydratisierten Dichte sowie die elektrophoretische Mobilität werden für die Charakterisierung und Klassifizierung der Plasmalipoproteine verwendet, so daß verschiedene Lipoproteinklassen unterscheidbar sind. Auf der Basis der Trennung durch Flotation (Gofmann *et al.*) unterscheidet man fünf Hauptklassen, Chylomikronen (CM), Very Low Density- (VLDL), Low Density-(LDL), High Density- (HDL) und Very High Density-Lipoproteins (VHDL), die wiederum in verschiedene Subklassen unterteilt werden (Tabelle 2 und Tabelle 3) [10].

|                      | Chylomikronen | VLDL   | IDL             | LDL             | HDL              |                  |
|----------------------|---------------|--------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
|                      |               |        |                 |                 | HDL <sub>2</sub> | HDL <sub>3</sub> |
| Partikelgröße (nm)   | 80-1200       | 28-80  | 25-30           | 19-25           | 8-11             | 6-9              |
| Dichtebereich (g/ml) | 0,95          | <1,006 | 1,006-<br>1,019 | 1,019-<br>1,063 | 1,063-<br>1,125  | 1,125-<br>1,21   |
| Zusammensetzung %    |               |        |                 |                 |                  |                  |
| Triglyzeride         | 90-95         | 50-65  | 25-40           | 6-12            | 3-8              | 3-5              |
| Cholesterinester     | 2-4           | 8-14   | 20-35           | 35-45           | 15-20            | 10-18            |
| Cholesterin          | 1             | 5-8    | 7-11            | 6-10            | 4-6              | 1-3              |
| Phospholipide        | 2-6           | 12-18  | 16-24           | 22-26           | 30-40            | 25-35            |
| Apolipoproteine      | 1-2           | 5-10   | 12-16           | 20-25           | 36-40            | 45-55            |
| A-I                  | 33            | -      | -               | -               | 65               | 62               |
| A-II                 | -             | -      | -               | -               | 10               | 23               |
| A-IV                 | 14            | -      | -               | -               | Spuren           | -                |
| B48                  | 5-8           | -      | -               | -               | -                | -                |
| B100                 | -             | 30-40  | 60-80           | 95              | -                | -                |
| C                    | 32            | 40-50  | 10-20           | Spuren          | 10-15            | 5                |
| E                    | 10            | 15     | 10-15           | Spuren          | 3                | 1                |

Tabelle 2: Struktur und Zusammensetzung der Lipoproteine [1]

| Dichteklasse | Subklasse         | Dichte (g/ml) |
|--------------|-------------------|---------------|
| VLDL         |                   | < 1,006       |
| LDL          |                   | 1,006-1,063   |
|              | LDL <sub>1</sub>  | 1,006-1,019   |
|              | LDL <sub>2</sub>  | 1,019-1,063   |
| HDL          |                   |               |
|              | HDL <sub>2</sub>  | 1,063-1,125   |
|              | HDL <sub>2a</sub> | 1,100-1,125   |
|              | HDL <sub>2b</sub> | 1,063-1,100   |
|              | HDL <sub>3</sub>  | 1,125-1,21    |

Tabelle 3: Dichtesubklassen der Lipoproteine [1]

## 1.2 Apolipoproteine

Die Proteinkomponenten der Lipoproteine werden als Apolipoproteine bezeichnet. Neben den strukturellen Funktionen können sie als Liganden für spezifische, in der Plasmamembran lokalisierte Lipoproteinrezeptoren und/oder als Effektoren von Enzymen wirken. Zwischen den verschiedenen Lipoproteinklassen können die Apolipoproteine rasch ausgetauscht werden. In Tabelle 4 sind die wichtigsten Apolipoproteine, ihr Vorkommen und ihre Funktion zusammengefaßt.

| <b>Apolipo-<br/>protein</b> | <b>Dichteklasse</b>                 | <b>Masse<br/>(kDa)</b> | <b>Funktion</b>  |
|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------|--|
| A-I                         | HDL                                 | 28                     | Strukturprotein, Aktivierung der LCAT, Bindung an HDL-Rezeptoren   |
| A-II                        | HDL                                 | 17                     | Aktivierung der hepatischen Lipase ?   |
| A-IV                        | CM, HDL                             | 46                     | Triglyzeridstoffwechsel, Aktivierung der LCAT  |
| 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   |
| C-II                        | CM, VLDL                            | 8,8                    | Aktivierung der Lipoproteinlipase  |
| C-III                       | CM, VLDL                            | 8,9                    | Inhibierung der Lipoproteinlipase und Interferenz mit Lipoproteinen an Leberrezeptoren   |
| D (A-III)                   | HDL <sub>3</sub>                    | 29                     | Aktivierung und Stabilisierung der LCAT  |
| E                           | CM, VLDL                            | 34                     | Ligand für den B/E- sowie E-Rezeptor, Ausschleusung von Cholesterin aus peripheren Zellen  |
| F                           | HDL                                 | 30                     | unbekannt  |
| G                           | VLDL                                | 72                     | unbekannt  |
| H                           | CM, d>1,21 kg/l                     | 55                     | unbekannt  |
| (a)                         | Lp(a)                               | 350-900<br>(variabel)  | unbekannte Funktion in Blutgerinnung und Fibrinolyse   |
| J                           | HDL <sub>2</sub> , HDL <sub>3</sub> | 70                     | unbekannt  |

*Tabelle 4: Vorkommen und Funktion der Apolipoproteine [2]*

Ein besonderes strukturelles Merkmal der Apolipoproteine ist das Vorkommen von sog. amphiphatischen Helixregionen. Auf der einen Seite dieser Helix sind hydrophobe Aminosäuren lokalisiert, während auf der anderen Seite bevorzugt polare Aminosäuren auftreten. Mit der hydrophoben Seite können die Helices mit der hydrophoben Oberfläche der Lipoproteinpartikel interagieren und so die Wechselwirkung zwischen Protein- und Lipidkomponenten herstellen. Die hydrophobe Seite dient als Lösungsvermittler im wässrigen Milieu des Blutes [11-14].



Die meisten Gene der humanen Apolipoproteine sind auf den Chromosomen 11 und 19 lokalisiert, lediglich die Gene für ApoA-II und ApoB liegen auf den Chromosomen 1 und 2. Die Apolipoproteine A-I, A-II, A-IV, E, C-II und C-III weisen in ihrer Gensequenz sehr starke Homologien auf, so daß man auf einen gemeinsamen Vorläufer in der Evolution schließen kann [1].

### 1.3 Stoffwechsel der Lipoproteine

Im Darm (Darmmucosa) werden aus Nahrungsfetten und Nahrungscholesterin triglyzeridreiche Chylomikronen hergestellt. Das Blut transportiert sie zu den Kapillaren im Muskel- und Fettgewebe, wo die Triglyzeride der Chylomikronen durch die Lipoproteinlipase (LPL) in freie Fettsäuren hydrolysiert werden. Die Teilchen nehmen dabei an Größe ab und an Dichte zu. Die Fettsäuren werden verstoffwechselt bzw. (nach erneuter Veresterung mit Glycerin) im Fettgewebe gespeichert. Zurück bleiben die Chylomikronen-Remnants (CM-R) (angereichert mit verbleibendem Cholesterin), die von der Leber über spezifische Rezeptoren aufgenommen werden (exogener Weg).

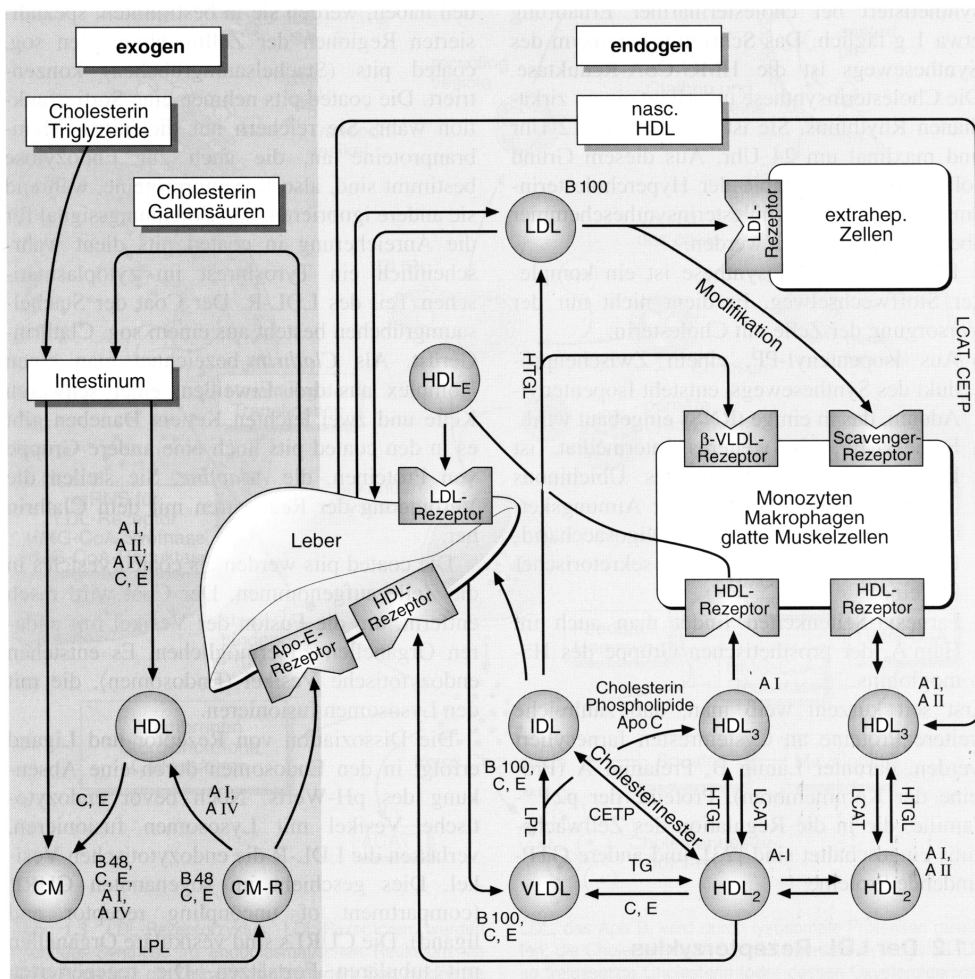


Abbildung 2: Stoffwechsel der Lipoproteine [2]

In der Leber werden Cholesterin und Triglyzeride zu VLDL verpackt, sezerniert und in die Blutbahn eingeschleust. Auch hier findet eine Lipolyse mittels LPL statt. Der Triglyzeridanteil der VLDL verringert sich dabei stetig, damit erhöht sich die Dichte des Teilchens, es resultieren erst die IDL (Intermediate-Density-Lipoprotein) und nach weiterer Lipolyse die LDL. Die verschiedenen Apolipoproteine können während des Umbaus der Lipoproteine per Diffusion untereinander ausgetauscht werden. Die entstandenen LDL-Partikel werden über LDL-Rezeptor vermittelte Endozytose in die Leber bzw. anderes Gewebe aufgenommen. Die Cholesterinester (CE) können hier durch eine Lipase gespalten werden und das Cholesterin in die Zellmembran eingeschleust werden.

Für den Rücktransport des Cholesterins aus den peripheren Geweben zur Leber sind die HDL-Partikel verantwortlich. Die Leber ist das einzige Organ, welches Cholesterin verstoffwechseln und ggf. in Form von Gallensäuren bzw. als freies Cholesterin oder Cholesterinester mit der Galle ausscheiden kann.

#### 1.4 High-Density-Lipoproteine

Den HDL-Partikeln kommt im Stoffwechsel eine besondere Stellung zu, da sie die Partikel sind, welche das Cholesterin aus den peripheren Zellen zur Leber zurücktransportieren können (reverser Cholesterintransport) [14-21]. Dieser Mechanismus erklärt die epidemiologische Beobachtung, daß die Serumkonzentration der HDL negativ mit dem Risiko korreliert ist, an einer koronaren Herzerkrankung zu erkranken.

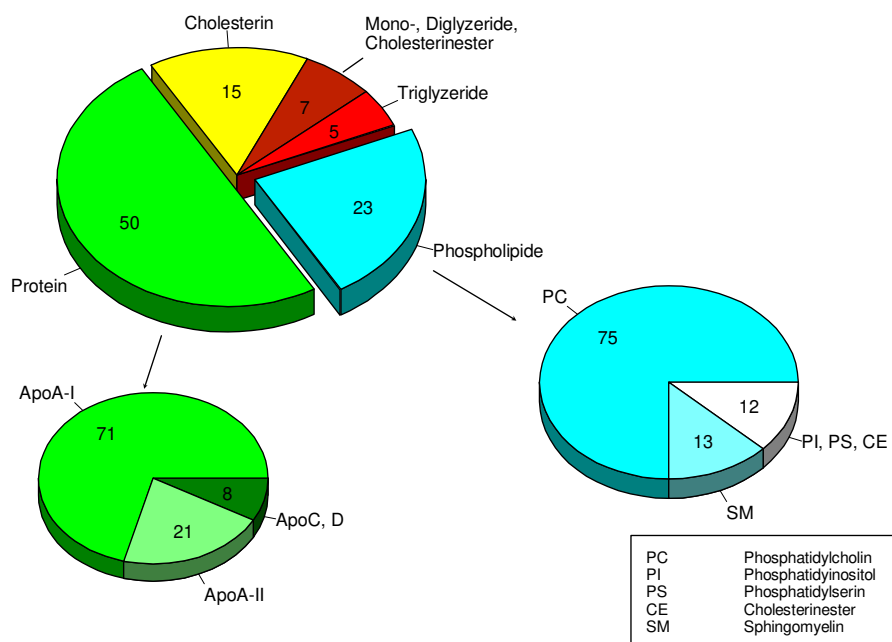


Abbildung 3: Zusammensetzung der HDL [22]

Bei der Entstehung der HDL-Partikel bilden sich zunächst in Darm und Leber kleine lipidarme HDL (auch prä- $\beta$ -1 HDL genannt). Diese HDL-Subfraktion hat ein Molekulargewicht von ca. 60-70 kDa (5-6 nm) und besitzt als Proteinkomponente ein einziges ApoA-I Molekül. Die prä- $\beta$ -1 HDL nehmen von den peripheren Zellen Cholesterin auf und wandeln sich dabei in die scheibenförmige (nascierende) HDL-Subfraktion (prä- $\beta$ -2 HDL), die reich an freiem Cholesterin und Phospholipiden ist und drei ApoA-I Moleküle angelagert hat [23-25]. Unter dem Einfluß der LCAT wandern immer mehr Cholesterinester ins Innere des Teilchens, es bilden sich reife kugelförmige (sphärische) HDL-Partikel (auch  $\alpha$ -HDL). Die sphärischen HDL (9-12 nm), welche den überwiegenden Anteil an der Gesamt-HDL-Fraktion ausmachen, lassen sich bei ultrazentrifugeller Auftrennung noch in zwei Unterfraktionen aufteilen (HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub>), die sich in Größe und Dichte geringfügig unterscheiden (siehe Tabelle 2). Die Übergänge zwischen den einzelnen HDL-Subfraktionen sind fließend [22, 26-29].

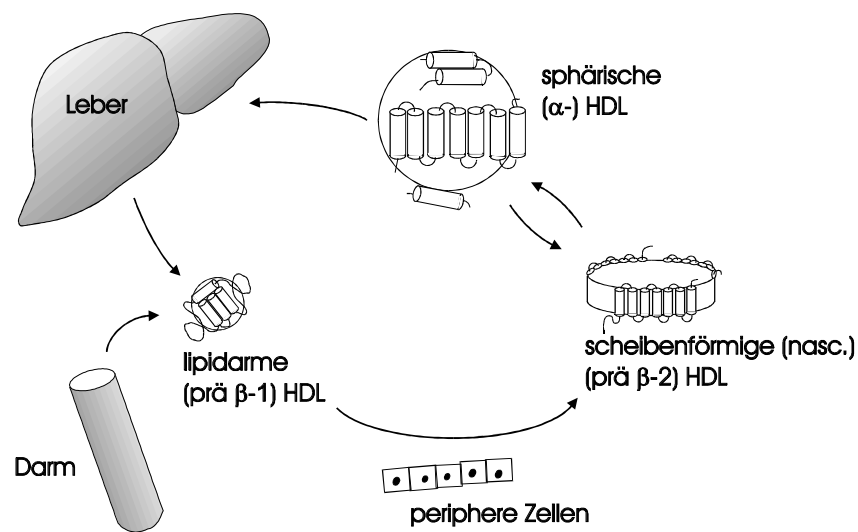


Abbildung 4: Verschiedene Zustandsformen der HDL und des ApoA-I [17]

Für den Austausch des Cholesterins zwischen Zellen und HDL liegen mehrere Erklärungsmodelle vor. Das eine Modell geht von einem Konzentrationsgradienten zwischen Zellmembran und HDL-Partikel aus, der Austausch des Cholesterins ist damit diffusionsgesteuert [24, 25, 30]. Das andere Modell geht von einem rezeptorgesteuerten Mechanismus aus. Erst kürzlich konnte z.B. der Scavenger Rezeptor SR-B1 als einer von zahlreichen Rezeptoren mit einer hohen Affinität zu HDL identifiziert werden [21, 31-34].



Die primäre Aminosäuresequenz beinhaltet vermutlich hoch konservierte Wiederholungen von elf Aminosäuren, die jeweils amphiphatische  $\alpha$ -Helices formen, die wiederum verantwortlich für die Interaktion mit der lipophilen Oberfläche der Lipoprotein-Partikel sind [43-47].

Durch Blockierung mit verschiedenen Antikörpern konnten einige Epitope des ApoA-I hinsichtlich ihrer Funktion identifiziert werden. Abbildung 6 zeigt eine Auswahl der Antikörper, durch deren Einsatz die Epitope identifiziert wurden.

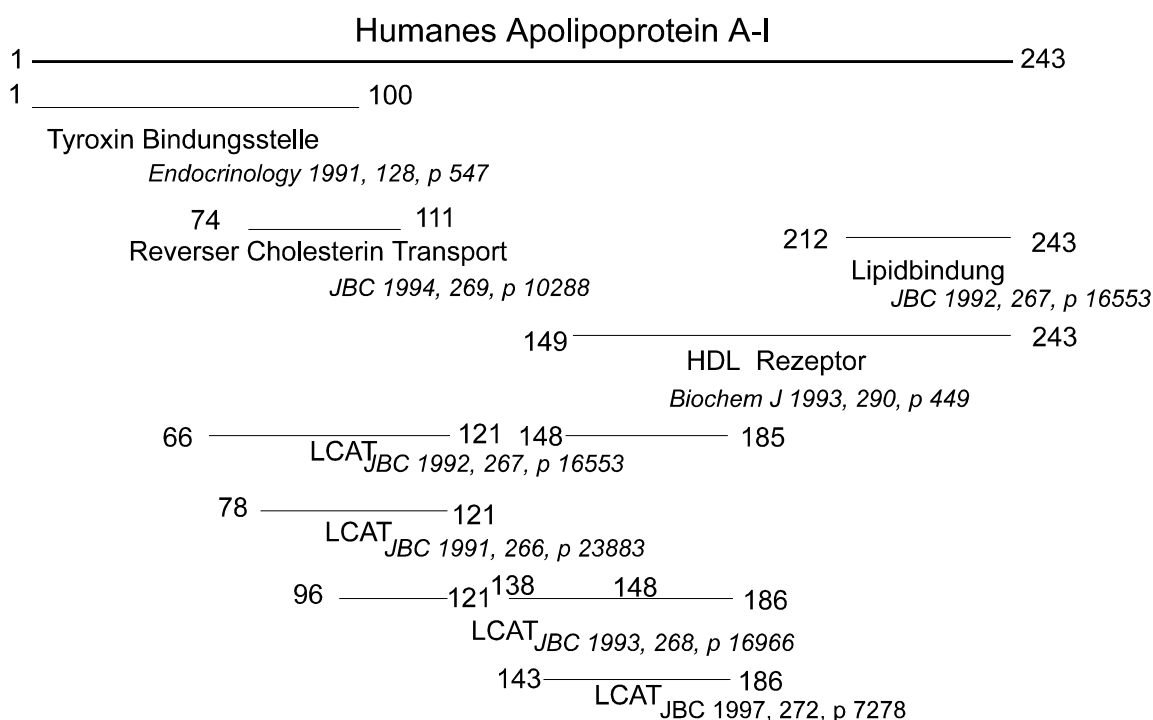


Abbildung 6: Identifizierung verschiedener Epitope des Apolipoprotein A-I mit Hilfe verschiedener Antikörper

In Abbildung 7 sind diese funktionellen Bereiche anhand der Sekundärstruktur des ApoA-I dargestellt. Bindungsstudien mit Thyroxin (T<sub>4</sub>) ergaben eine erhöhte Bindungsaffinität zum N-terminalen Bereich von ApoA-I, die physiologische Bedeutung dieser Ergebnisse ist allerdings noch ungeklärt [48]. Der Bereich der Aminosäuren 71 bis 111 konnte als essentiell für den reversen Cholesterin-Transport identifiziert werden [20, 33, 49].

Blockierungen im Bereich der Aminosäuren 66 bis 186 hatten eine Reduktion der LCAT-Aktivität zur Folge [50-52]. Als potentielle HDL-Rezeptor-Bindungsstelle wurde der Bereich der Aminosäuren 149-243 beschrieben [32]. Die Aminosäuren 212 bis 243 gelten für die Lipidbindung als essentiell [52].

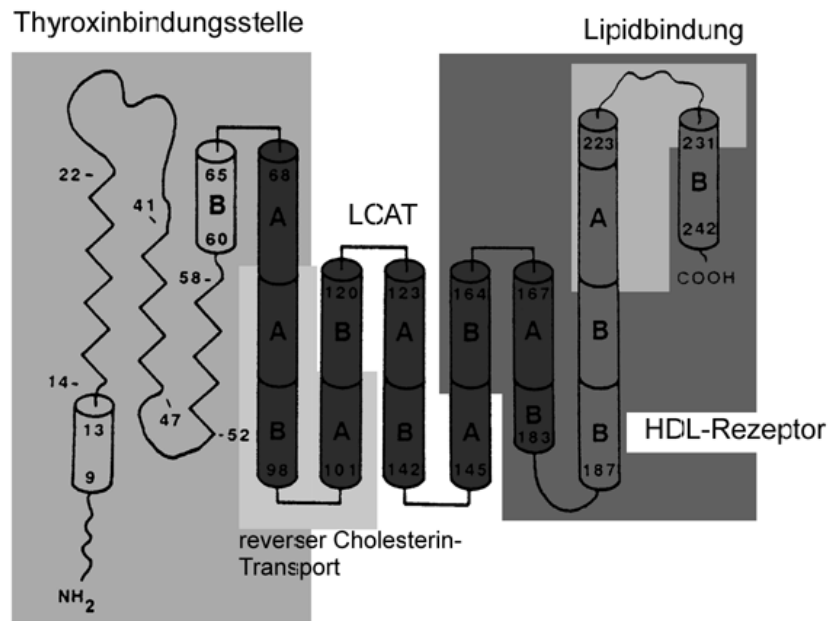


Abbildung 7: Darstellung der Sekundärstruktur des ApoA-I mit funktionellen Domänen

Apolipoprotein A-I hat neben seinen strukturgebenden Eigenschaften auch die Fähigkeit, als Kofaktor der Lecithin:Cholesterin Acyltransferase (LCAT) zu fungieren. Diese überträgt eine Fettsäure des Lecithin auf das Cholesterin. Es entstehen Lysolecithin und Cholesterinester [49, 51, 53, 54].

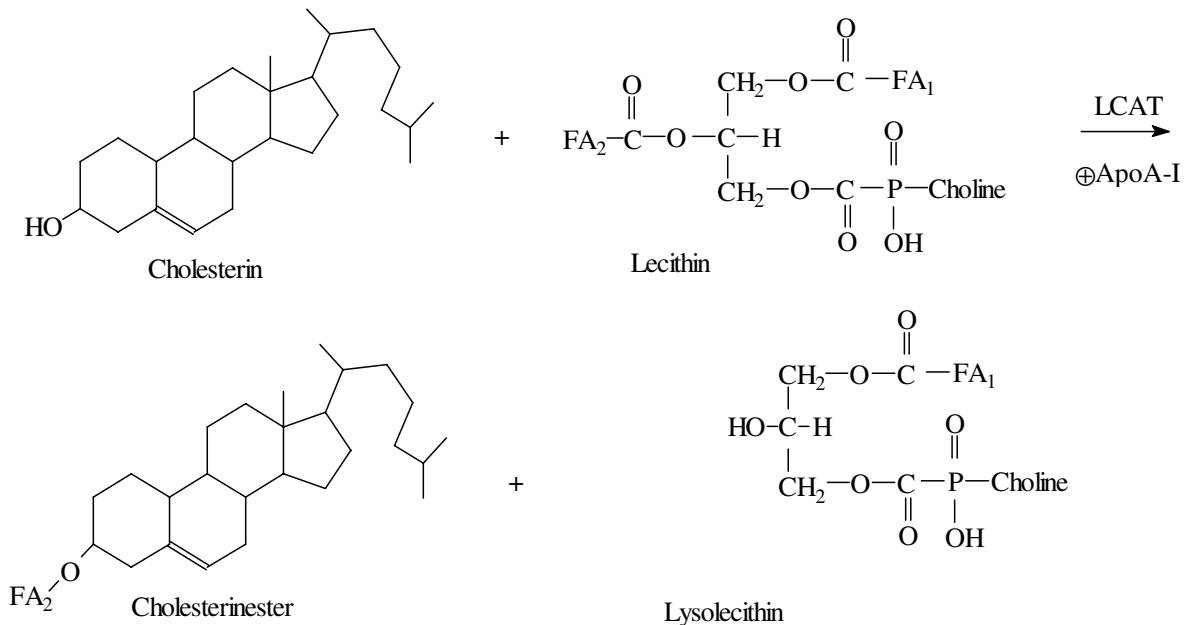


Abbildung 8: Reaktionsmechanismus der Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase

## 1.6 Apolipoprotein A-I Varianten

Vom Apolipoprotein A-I sind zahlreiche Mutationen bekannt. Häufig handelt es sich um Punktmutationen, die zum Austausch einer einzelnen Aminosäure führen. Bekannt sind aber auch Deletions-/Insertions-Mutationen, bei denen ganze Bereiche fehlen oder substituiert sind, sowie Trunkationsmutationen, bei denen die Sequenz vorzeitig beendet ist. In vielen Fällen führen diese Mutationen bei den Betroffenen zu mehr oder minder stark ausgeprägten Krankheitssymptomen. Tabelle 5 zeigt eine Auswahl der bekannten ApoA-I Mutationen.

| Mutation   | Variante                       | Pathobiochemie   | Literatur |
|--|--------------------------------|--|-----------|
| Pro <sub>3</sub> →Arg                              |                                | Konversion proApoA-I zu ApoA-I gestört                             | [55]      |
| Pro <sub>3</sub> →His                              | ApoA-I <sub>Münster3C</sub>    | Konversion proApoA-I zu ApoA-I gestört                             | [56]      |
| Pro <sub>4</sub> →Arg                              | ApoA-I <sub>Münster 3B</sub>   |  | [56]      |
| Arg <sub>10</sub> →Leu                             | ApoA-I <sub>Baltimore</sub>    | HDL erniedrigt, Atherosklerose                                     | [57]      |
| Gly <sub>26</sub> →Arg                             | ApoA-I <sub>Iowa</sub>         | familiäre polyneuropathische Amyloidose                            | [58-60]   |
| Trp <sub>50</sub> →Arg                             |                                | familiäre nicht neuropathische Amyloidose                          | [56, 61]  |
| Leu <sub>60</sub> →Arg                             |                                | familiäre nicht neuropathische Amyloidose                          | [62]      |
| Deletion 60-71<br>Insertion Val Thr                |                                | familiäre nicht neuropathische Amyloidose                          | [63]      |
| Gln <sub>84</sub> →Stop                            | ApoA-I <sub>Komatsushima</sub> | Atherosklerose, Xanthome   | [2]       |
| Lys <sub>107</sub> →0                              | ApoA-I <sub>Marburg</sub>      | HDL erniedrigt, red. LCAT-Aktivierung,<br>verminderte Lipidbindung | [64, 65]  |
| Glu <sub>136</sub> →Lys                            | ApoA-I <sub>Norway</sub>       |  | [66]      |
| Pro <sub>143</sub> →Arg                            | ApoA-I <sub>Giessen</sub>      | red. LCAT-Aktivierung, erniedrigte ApoA-I<br>Konzentration         | [67]      |
| Deletion<br>Glu <sub>146</sub> -Arg <sub>160</sub> | ApoA-I <sub>Seattle</sub>      | Arcus lipoides, HDL-Cholesterin erniedrigt                         | [68]      |
| Ala <sub>158</sub> →Glu                            | ApoA-I <sub>Münster2B</sub>    | erniedrigte Konzentration des ApoA-I                               | [2]       |
| Leu <sub>159</sub> →Arg                            | ApoA-I <sub>Fin</sub>          | HDL erniedrigt   | [69]      |
| Leu <sub>160</sub> →Arg                            | ApoA-I <sub>Oslo</sub>         | HDL erniedrigt   | [70]      |
| Pro <sub>165</sub> →Arg                            |                                | HDL und ApoA-I Konzentrationen erniedrigt                          | [71]      |
| Arg <sub>173</sub> →Cys                            | ApoA-I <sub>Milano</sub>       | HDL erniedrigt   | [72-75]   |
| Glu <sub>198</sub> →Lys                            | ApoA-I <sub>Vienna</sub>       |  | [76]      |

Tabelle 5: Apolipoprotein A-I Mutationen

Hervorzuheben ist, daß Mutationen in bestimmten Bereichen ähnliche metabolische Konsequenzen mit sich bringen. So haben Mutationen zu Beginn der Aminosäuresequenz einen Einfluß auf die Konversion von ProApoA-I zu ApoA-I, während z.B. Mutationen im zentralen Bereich des Proteins häufig mit einer veränderten LCAT-Kofaktor-Aktivität korrelieren.

## 1.7 Apolipoprotein A-I und Amyloidose

Als Amyloidosen werden Krankheiten bezeichnet, deren primäres Merkmal Protein- bzw. Amyloidablagerungen in den Organen sind. Häufig handelt es sich bei den Proteinablagerungen um amphiphile Proteine mit einem hohen Anteil  $\beta$ -Faltblattstruktur [77-80]. Protein- bzw. Amyloidablagerungen treten im natürlichen Alterungsprozeß des Menschen auf. Bestimmte Erkrankungen wie die Creutzfeldt-Jakob- und die Alzheimer-Krankheit zeigen frühzeitige Proteinablagerungen im Nervensystem. Die chronische Hämodialyse niereninsuffizienter Patienten, führt ebenfalls zu lebenslimitierenden Amyloidablagerungen.

Die Familiäre Amyloid Polyneuropathie (FAP) ist ein Beispiel dieser Proteinablagerungen, deren Defekt genetisch bekannt ist. FAP wird autosomal-dominant vererbt und durch Punktmutationen im Bereich der Transthyretin-(Präalbumin)-Genregion auf Chromosom 18 verursacht. Das synthetisierte Protein ist ein strukturverändertes Transthyretin (TTR), welches zu progredienten Ablagerungen von Amyloidfibrillen in zentralen und peripheren Nervenbahnen sowie inneren Organen führt [81]. Ein Beispiel ist das TTR-Met<sup>30</sup>, bei dem eine Punktmutation zum Austausch der Aminosäure Valin gegen Methionin an Aminosäureposition 30 führt [82, 83]. Da das Transthyretin zu 90% in der Leber synthetisiert wird, ist derzeit die Lebertransplantation der einzige therapeutisch mögliche Ansatz.

Vom Apolipoprotein A-I sind inzwischen vier Varianten bekannt, die mit einer Amyloidose korreliert sind. Diese Mutationen sind alle am N-terminalen Ende der ApoA-I Sequenz innerhalb der ersten 80 Aminosäuren lokalisiert. Die Folge sind Ablagerungen N-terminaler 83 bis 93 Aminosäuren langer Fragmente des mutierten Apolipoprotein A-I im Gewebe der betroffenen Patienten. Die Ablagerungen betreffen meist Leber und Nieren, können aber auch in anderen Geweben vorhanden sein. Identifiziert sind bisher die Mutationen Gly<sub>26</sub>→Arg (ApoA-I<sub>Iowa</sub>), Trp<sub>50</sub>→Arg, Leu<sub>60</sub>→Arg sowie die Deletions-Insertions-Mutante Leu<sub>60</sub>-Phe<sub>71</sub>→Val Thr [58-63].

Die Mutation ApoA-I<sub>Iowa</sub> wurde erstmals 1969 von Van Allen *et al.* beschrieben [80]. Ursache der Mutation ist eine Punktmutation von Guanin zu Cytosin im Codon 26 des ApoA-I Gen, die letztendlich den Austausch der Aminosäure Gly<sub>26</sub> durch Arg bewirkt. Die Patienten sind alle bezüglich der Mutation heterozygot, d.h. neben der mutierten Form des ApoA-I liegt auch normales ApoA-I vor. Klinische Symptome sind Neuropathien der unteren Extremitäten, Magengeschwüre und Nierenversagen. Ursache sind hierfür



Ablagerungen von Amyloidfibrillen. Analysen dieser Fibrillen identifizierten diese als Ansammlungen eines N-terminalen (AS 1-83) Fragmentes des ApoA-I<sub>Iowa</sub>. Normales ApoA-I war in diesen Fibrillen nicht nachzuweisen. Im Serum der betroffenen Patienten ist ein um ca. 10% erniedrigter HDL-Spiegel nachweisbar. Als Ursache für diesen erniedrigten HDL-Spiegel wird ein beschleunigter Katabolismus des ApoA-I<sub>Iowa</sub> postuliert [58-60].

Auch die anderen Mutationen des ApoA-I, die mit Amyloidose korrelieren, sind am N-terminalen Ende der Aminosäuresequenz lokalisiert (siehe Abbildung 9). Bei den drei bekannten Punktmutationen ist jeweils eine neutrale Aminosäure gegen Arginin ausgetauscht, was eine Erhöhung der Gesamtladung des Proteins um +1 zur Folge hat. Die Deletion der Aminosäuren 60-71 mit der Insertion der Aminosäuren Val und Thr haben ebenfalls eine Änderung der Nettoladung des Proteins um +1 zur Folge. Später in der Sequenz auftauchende Substitutionen der gleichen Art (z.B. ApoA-I<sub>Fin</sub>, ApoA-I<sub>Oslo</sub>, ApoA-I<sub>Giessen</sub>) führen jedoch nicht zu einer Amyloidose. Offensichtlich scheinen die entsprechenden Mutationen das ApoA-I strukturell dahingehend zu verändern, daß es bezüglich einer proteolytischen Spaltung sensibel wird. Der Mechanismus der Proteinspaltung sowie die Ursachen der Ablagerungen sind bislang vollkommen ungeklärt.

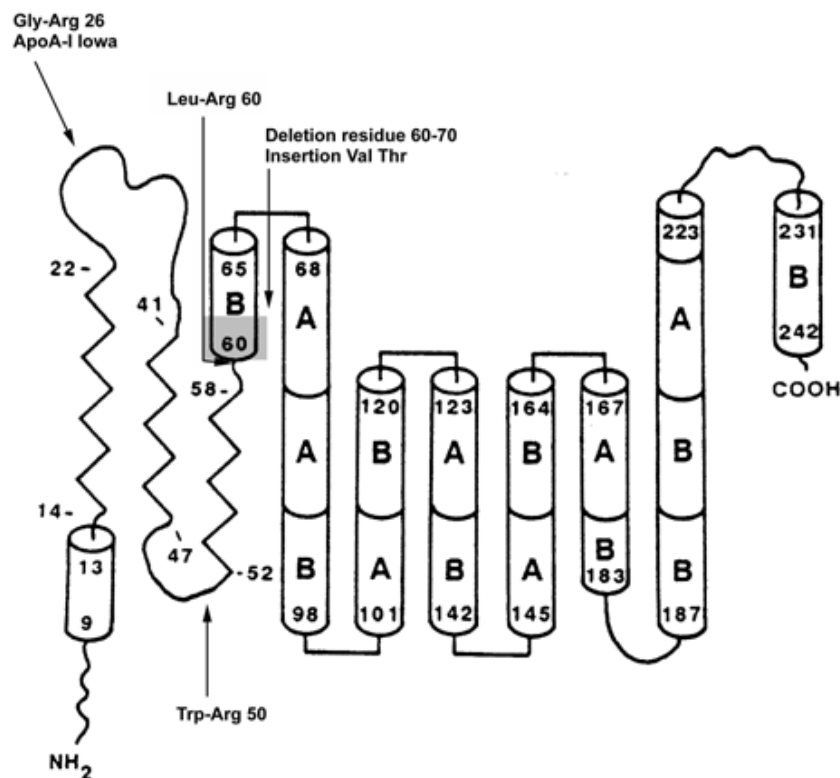


Abbildung 9: Mutationen des Apolipoprotein A-I, die eine Amyloidose bedingen

## 1.8 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Expression von rekombinantem Apolipoprotein A-I<sub>WT</sub> (Wildtyp) und der Mutation r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> in CHO-Zellen, sowie die nachfolgende Anreicherung und Charakterisierung der exprimierten Proteine. Dazu sollten die Expressionsbedingungen optimiert werden und eine günstige Anreicherungsmethode für die rekombinanten Proteine gefunden werden. Das physiologische Verhalten der rekombinant exprimierten Proteine sollte anschließend im Kaninchenmodell untersucht werden und mit dem des humanen ApoA-I verglichen werden.

## 2 METHODEN

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Zellen

Chinese Hamster Ovary(CHO)-Zellen wurden erstmals 1957 von T.T. Puck aus einer Ovarienbiopsie eines weiblichen chinesischen Hamsters isoliert [84]. Die derzeit im Handel befindliche permanente CHO-Zelllinie sind CHO-K1-Zellen, eine Zelllinie, die nicht mehr in der Lage ist, die Aminosäure Prolin zu synthetisieren [85]. Dies bedeutet einen Schutzmechanismus gegen die ungewollte Vermehrung der Zellen bei Freisetzung in die Umwelt, was besonders bei gentechnisch veränderten Zelllinien von Bedeutung ist.

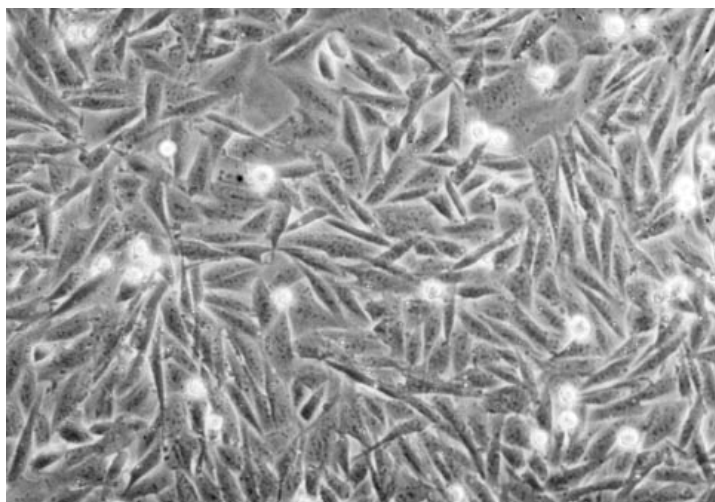


Abbildung 10: CHO-Zellen in Kultur bei 100% Konfluenz

CHO-Zellen, transfiziert mit dem humanen ApoA-I Gen unter der Kontrolle eines Metallothioninpromotors wurden freundlicherweise von Dr. Remaley und Dr. Hoeg (National Heart, Lung and Blood Institute, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt [86]. Das verwendete Plasmid enthält den pLen Expressionsvektor mit einer BamHI Schnittstelle, in welche die vollständige cDNA für das präproApoA-I Gen eingefügt wurde, flankiert von einem Start- und Stopcodon [42].

Bei dem Promotor handelt es sich um den humanen Metallothionin II Promotor. Der Promotor läßt sich durch die Kationen der zweiten Nebengruppe (Zn, Cd, Hg) sowie durch Kupfer stimulieren. Eine weitere Stimulation ist durch Steroidhormone möglich [87].

Zur Verfügung stand die Zelllinie CHOApoA-I<sub>WT</sub>, die die Sequenz für normales humanes Apolipoprotein A-I enthielt, sowie die Zelllinie CHOApoA-I<sub>Iowa</sub>, welche die Sequenz für humanes Apolipoprotein A-I<sub>Iowa</sub> mit der entsprechenden Punktmutation integriert hatte.

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer sterilen Werkbank der Sicherheitsklasse zwei durchgeführt ( LaminAir HB2472, Heraeus, Hanau, Deutschland).

### **2.1.2 Auftauen der Zellen**

Die Zellen wurden in 1,5 ml Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen schnell im 37°C Wasser erwärmt und sofort in ca. 20 ml Kultivierungsmedium überführt. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert (Beckmann CS 15R Centrifuge, Beckmann, Californien, USA), der Überstand dekantiert und die Zellen in frischem Kultivierungsmedium suspendiert. Je nach weiterer Verwendung wurden die Zellen dann in die entsprechenden Kulturschalen überführt.

### **2.1.3 Kultivierung der Zellen**

Die Zellen wurden in Ham's F-12, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco BRL Life Technologies, Berlin, Deutschland) bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert (Heraeus Begasungsbrutschrank). Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht.

### **2.1.4 Passagieren von Zellen**

Zum Subkultivieren der Zellen wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS (Phosphat buffered saline w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), (Gibco BRL Life Technologies, Berlin, Deutschland) gewaschen. Dann wurde zu den Zellen 1,5 ml (je 75 cm<sup>2</sup> Kulturfläche) Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, Seromed, Berlin) gegeben und für ca. 5 min bei 37°C bis zum Abrunden der Zellen inkubiert. Sofort nach Ablösen der Zellen wurden 5 ml frisches Kulturmedium zugegeben und die Suspension auf frische Zellkulturflaschen verteilt.

Trypsin/EDTA-Lösung:

0,05 % Trypsin  
0,02 % EDTA  
in PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>

### **2.1.5 Induktion der ApoA-I Expression**

Bei 90% Konfluenz wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in serumfreiem Medium kultiviert. Die Expression des humanen ApoA-I wurde durch Zugabe von ZnSO<sub>4</sub> induziert.

### **2.1.6 Einfrieren von Zellen**

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese trypsiniert und die Suspension bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium suspendiert und in 1,5 ml Kryoröhrchen aliquotiert. Dann wurde die Zellen langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium:

Grundmedium Ham's F12, Glutamin, Pen/Strep

25% Fötale Rinderserum (v/v)

12% DMSO (v/v)

### **2.1.7 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  $\mu\text{l}$  Zellsuspension

20  $\mu\text{l}$  Trypanblau

mischen und in Zählkammer geben

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

0,4% Trypan-Blau

in 0,81% NaCl und 0,06%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

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

Berechnung:

1 Quadrat einer Zählkammer enthält ein Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$

$\Rightarrow$  Zellzahl in 0,1  $\mu\text{l}$

x Verdünnung 1,25

x 10.000  $\Rightarrow$  Zellzahl /ml

### 2.1.8 Isolation des „High expression clone“

Zur Isolation eines besonders gut exprimierenden Zellklons wurden die Zellen in 96-Well Platten in einer Verdünnung mit weniger als einer Zelle pro Well in Ham's F-12, 10% FCS ausgesät. Nach einigen Tagen konnten die entstandenen Einzelzellkolonien in 6-Well Platten passagiert werden und nach weiteren 4 Tagen zur ApoA-I Expression induziert werden. Der am höchsten exprimierende Klon wurde weiter subkultiviert und fortan zur Expression verwendet.

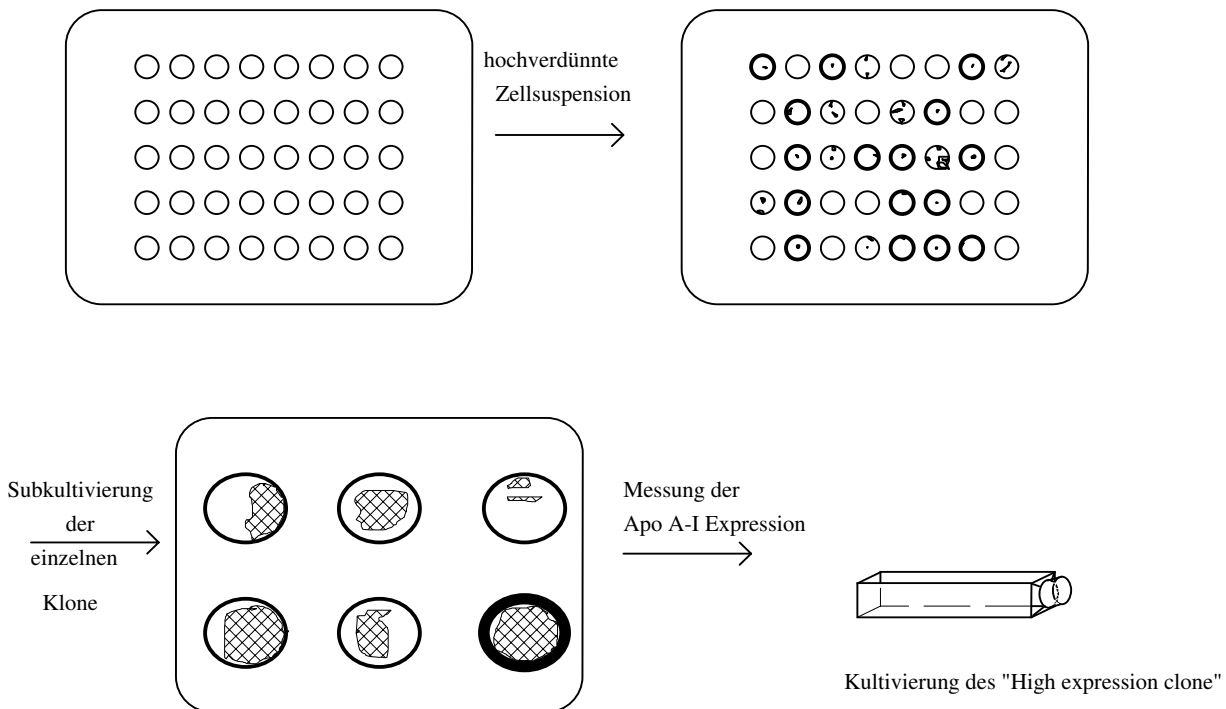


Abbildung 11: Prinzip des "limiting dilution"

### 2.1.9 Bestimmung des optimalen serumfreien Expressionsmedium

Da zur Expression rekombinanter Proteine serumfreie Kultivierungsbedingungen notwendig sind, wurden verschiedene Medien auf ihre Einsatzfähigkeit als serumfreies Kulturmedium hin untersucht. Um das optimale serumfreie Expressionsmedium zu finden, wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 185 cm<sup>2</sup> Monolayerflaschen ausgesät und wie zuvor beschrieben bis zur 90%igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und in serumfreie Kulturbedingungen umgesetzt. Für jeden Ansatz wurde ein spezielles Medium verwendet. Zusätzlich wurde für jedes Medium die optimal stimulierende Zinkkonzentration ermittelt. Dazu wurde für jedes Medium Zinksulfat in den folgenden Konzentrationen zugesetzt: 0, 30, 50, 80, 100  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub>. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden jeweils Proben entnommen,

zentrifugiert und auf ihren ApoA-I Gehalt hin untersucht.

### **2.1.10 Medien**

#### Ham's F-12:

Ham's F-12 versetzt mit 10% FCS, L-Glu, Pen/Strep (Gibco) ist das empfohlene Kultivierungsmedium für CHO Zellen bei Zusatz von Serum [88].

#### DMEM/Ham's F-12:

Dieses Medium ist eine Mischung aus DMEM/Ham's F-12 (Gibco BRL Life Technologies, Berlin, Deutschland) im Verhältnis 1:1 supplementiert mit L-Glu und Pen/Strep.

#### HyQ CCM-5:

Dieses serumfreie Spezialmedium wurde für das Wachstum von CHO-Zellen entwickelt. Die Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht bekannt gegeben (HyClone Laboratories, Cramlington Northumberland, Großbritannien). Zur Kultivierung wurde das Medium mit L-Glu und Pen/Strep supplementiert.

#### HybridoMed DIF1000 (Biochrom, Berlin, Deutschland):

Dieses Medium wurde für das Wachstum eines weiten Spektrums an Säugerzellen entwickelt. Es basiert auf einer 1:1-Mischung aus Iscove DMEM und Ham's F-12. Als Proteine sind ausschließlich Albumin, Insulin und Transferrin enthalten [89, 90]. HybridoMed DIF 1000 wurde ebenfalls mit L-Glu und Pen/Strep supplementiert.

#### CHO-S-SFM-II (Gibco BRL Life Technologies, Berlin, Deutschland):

Dieses Medium wurde speziell für die Kultivierung von CHO Zellen in Suspension entwickelt. Die niedrige Proteinzusammensetzung (< 400 µg/ml) des CHO-S-SFM II unterstützt die Reinigung der rekombinant produzierten Proteine. Es enthält keine humanen Apolipoproteine, die vollständige Zusammensetzung des Mediums ist jedoch nicht veröffentlicht [91, 92]. Das Medium wurde ebenfalls mit L-Glu und Pen/Strep versetzt.

### 2.1.11 Konzentrierung von Zellkulturüberständen

Die Konzentrierung von Zellkulturüberständen und verdünnten Proteinlösungen wurde mit Ultrafree 15 Zentrifugentereinsätzen (Millipore, USA) durchgeführt. Dabei konnten bis zu 15 ml Proteinlösung in einen Filtereinsatz gefüllt werden und bei ca. 2000xg zentrifugiert werden (Beckmann CS 15R Centrifuge). Die Proteinlösungen konnten dabei bis auf ein Volumen von 200 µl eingeeengt werden.

### 2.1.12 Expression von r-ApoA-I mit der MiniPerm®

Die MiniPerm® (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) ist ein kleiner Bioreaktor, ursprünglich entwickelt für die Kultivierung von Hybridomzellen zur Produktion monoklonaler Antikörper [93]. Sie besteht aus einem sog. Produktionsmodul, welches die Zellen enthält und aus einem Versorgungsmodul, welches mit Medium befüllt wird. Beide Module sind über eine semipermeable Membran verbunden, welche einen Gas- und Nährstoffaustausch ermöglicht, für Zellen und höhermolekulare Proteine aber undurchlässig ist.

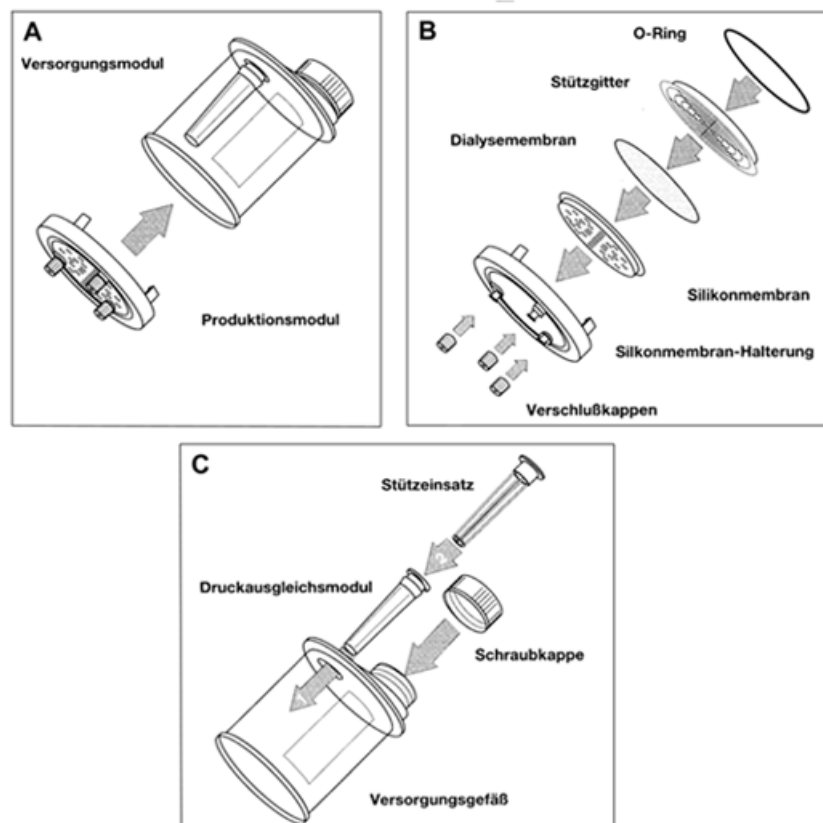


Abbildung 12: Modularer Aufbau der MiniPerm®, A: Versorgungs- und Produktionsmodul, B: Aufbau des Produktionsmoduls, C: Aufbau des Versorgungsmoduls

Mit der MiniPerm® ist es möglich eine sehr hohe Zellzahl in einem relativ kleinen Volumen zu erreichen, ohne eine Unterversorgung oder Vergiftung mit



Stoffwechselprodukten der Zellen befürchten zu müssen. Zum Befüllen wurden ca.  $10^8$  Zellen in 35 ml frischem Medium suspendiert und möglichst luftblasenfrei mit einer Spritze in das Produktionsmodul gegeben. In das Versorgungsmodul wurden 400 ml frisches Medium gegeben. Produktions- und Versorgungsmodul wurden durch Aufeinanderstecken miteinander verbunden. Die MiniPerm<sup>®</sup> wurde auf der Rollvorrichtung mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 10 U/min im Brutschrank bei 37°C installiert. Eine Stunde nach dem Befüllen oder nach Mediumwechsel mußte nochmals ein Druckausgleich vorgenommen werden. Zum Wechseln des Mediums konnte einfach das Versorgungsmodul oben geöffnet werden, das Medium abgegossen und frisches Medium eingefüllt werden. Zur Bestimmung der Proteinexpressionsrate wurde das Produktionsmodul geöffnet und mit einer Spritze eine Probe entnommen. Die Volumendifferenz wurde mit frischem Medium ausgeglichen. In den entnommenen Proben wurde jeweils die Zellzahl und die exprimierte Menge an Apo A-I bestimmt.

### 2.1.13 Proteaseinhibitoren

Zehn verschiedene Protease-Inhibitoren wurden auf ihren Einfluß im Kultivierungsmedium untersucht (Antipain-Dihydrochlorid, Aprotinin, Bestatin, Chymostatin, E-64, EDTA-Na<sub>2</sub>, Leupeptin, Pefabloc<sup>®</sup> SC, Pepstatin, Phosphoramidon) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland). Jeder Protease-Inhibitor wurde in einer Verdünnungsreihe eingesetzt.  $5 \times 10^4$  Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät, bei 90% Konfluenz mehrfach gewaschen und zur ApoA-I Expression für 96 Stunden induziert, jeweils mit einer spezifischen Protease-Inhibitor-Konzentration. Das exprimierte ApoA-I wurde anschließend mit SDS-PAAGE und Immunoblot analysiert.

| Inhibitor                | Spezifität   | empf. Konzentration |
|--------------------------|--|---------------------|
| Antipain-Dihydrochlorid  | Papain, Trypsin, Cathepsin A und B                           | 50 µg/ml            |
| Aprotinin                | Serinproteasen   | 0,06-2 µg/ml        |
| Bestatin                 | Aminopeptidasen  | 40 µg/ml            |
| Chymostatin              | α-, β-, γ-, δ- Chymotrypsin                                  | 6-60 µg/ml          |
| E-64                     | Cystein-Proteasen  | 0,5-10 µg/ml        |
| EDTA                     | Metalloproteasen   | 0,2-0,5 mg/ml       |
| Leupeptin                | Serin- und Cystein-Proteasen (Plasmin, Trypsin, Cathepsin B) | 0,5 µg/ml           |
| Pefabloc SC <sup>®</sup> | Serinproteasen   | 0,5 µg/ml           |
| Pepstatin                | Aspartatproteasen  | 0,7 µg/ml           |
| Phosphoramidon           | Metalloendopeptidasen, spez. Thermolysin                     | 4-330 µg/ml         |

Tabelle 6: Proteaseinhibitoren

## 2.2 Quantitative Methoden

### 2.2.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Gesamtproteinmenge wurde mit einer modifizierten Methode nach Lowry, mit BSA als Standard, bestimmt [94].

#### Lösung 1:

2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,1M NaOH  
(500 ml 0,1M NaOH + 10g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

#### Lösung 2:

0,5 % CuSO<sub>4</sub> in 0,1 % Na-tatrat  
( Lösung muß vor Gebrauch frisch hergestellt werden.  
Dazu 1% CuSO<sub>4</sub> und 0,2% Na-tatrat 1:1 mischen)

#### Lösung 3:

Lösung 1 + 2 50/1 mischen

#### Lösung 4:

Folin - Ciocalteau - Reagenz (gebrauchsfertig)  
Reagenz                    0,1% NaOH                    dH<sub>2</sub>O  
50                    :                    50                    :                    6

#### Lösung 5:

BSA -Standard Lösung 1mg/ml

|                      | <b>Std.1</b><br><b>0µg</b>     | <b>Std.2</b><br><b>50µg</b> | <b>Std.3</b><br><b>100µg</b> | <b>Std.4</b><br><b>200µg</b> | <b>Std.5</b><br><b>300µg</b> | <b>Std.6</b><br><b>400µg</b> | <b>Proben</b> |
|----------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------|
| <b>BSA</b>           | 0 µl                           | 50 µl                       | 100 µl                       | 200µl                        | 300 µl                       | 400 µl                       | 50-200 µl     |
| <b>Triton 1%</b>     | 200 µl                         | 200 µl                      | 200 µl                       | 200 µl                       | 200 µl                       | 200 µl                       | 200 µl        |
| <b>SDS 10%</b>       | 800 µl                         | 750 µl                      | 700 µl                       | 600 µl                       | 500µl                        | 400 µl                       | 600-750 µl    |
| <b>Lösung 3</b>      | 5 ml                           | 5 ml                        | 5 ml                         | 5 ml                         | 5 ml                         | 5 ml                         | 5 ml          |
|                      | gut mischen, 10 min inkubieren |                             |                              |                              |                              |                              |               |
| <b>Folin-Reagenz</b> | 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 545nm 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 ; 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, < 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 Bestimmung 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 [95].

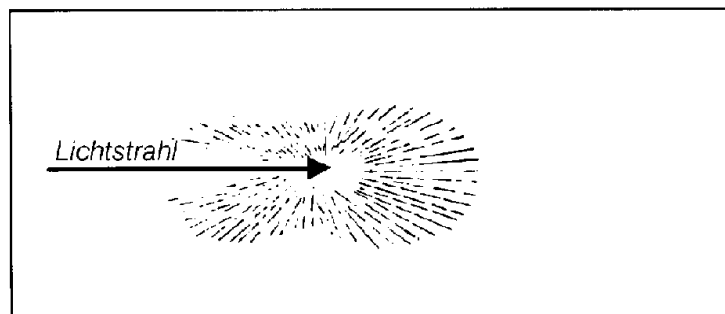


Abbildung 13: Rayleigh-Streuung des Lichtes an einem Partikel

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).

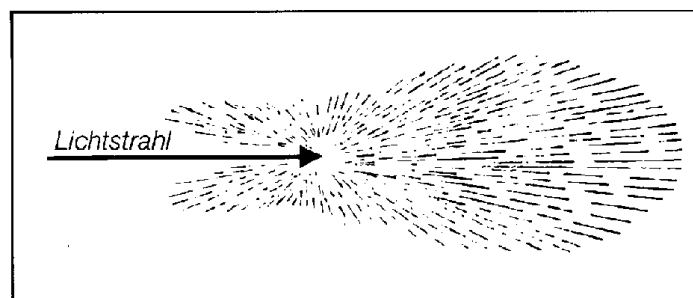


Abbildung 14: Mie-Streuung des Lichtes an einem Partikel

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 Reflektion 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.

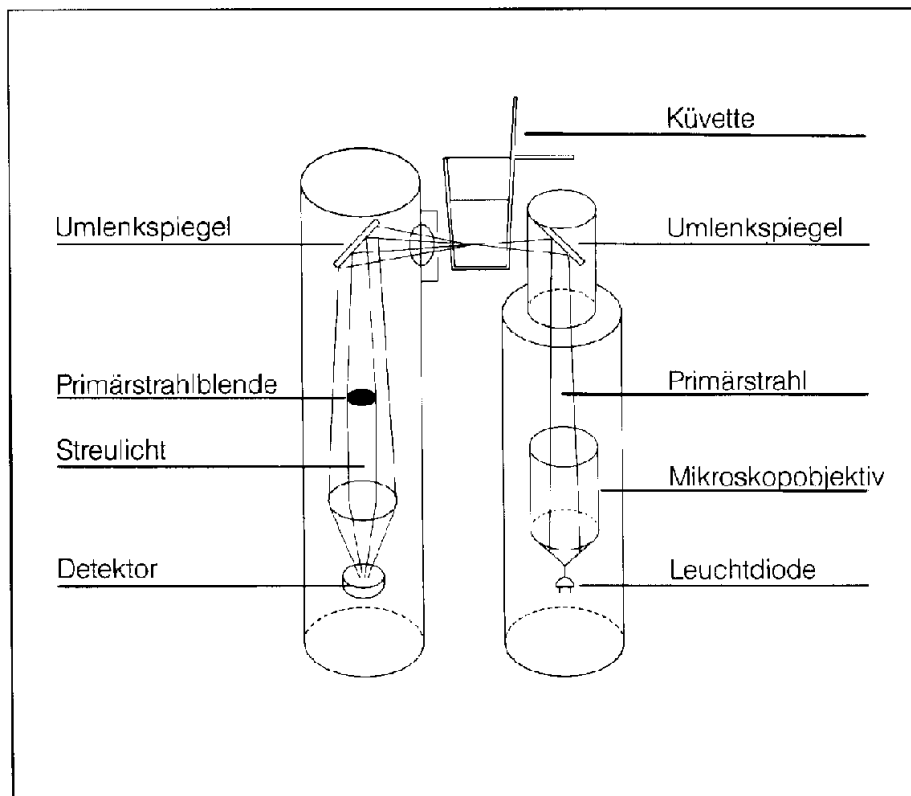


Abbildung 15: Optischer Strahlengang im Nephelometer

Reaktionspuffer:

- 11,6 g/l Polyethylenglycol
- 11,6 g/l NaCl
- 0,05 M Phosphatpuffer
- < 1 g/l  $\text{NaN}_3$

Diluens:

- Phosphat-Buffered-Saline
- < 1 g/l  $\text{NaN}_3$

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.

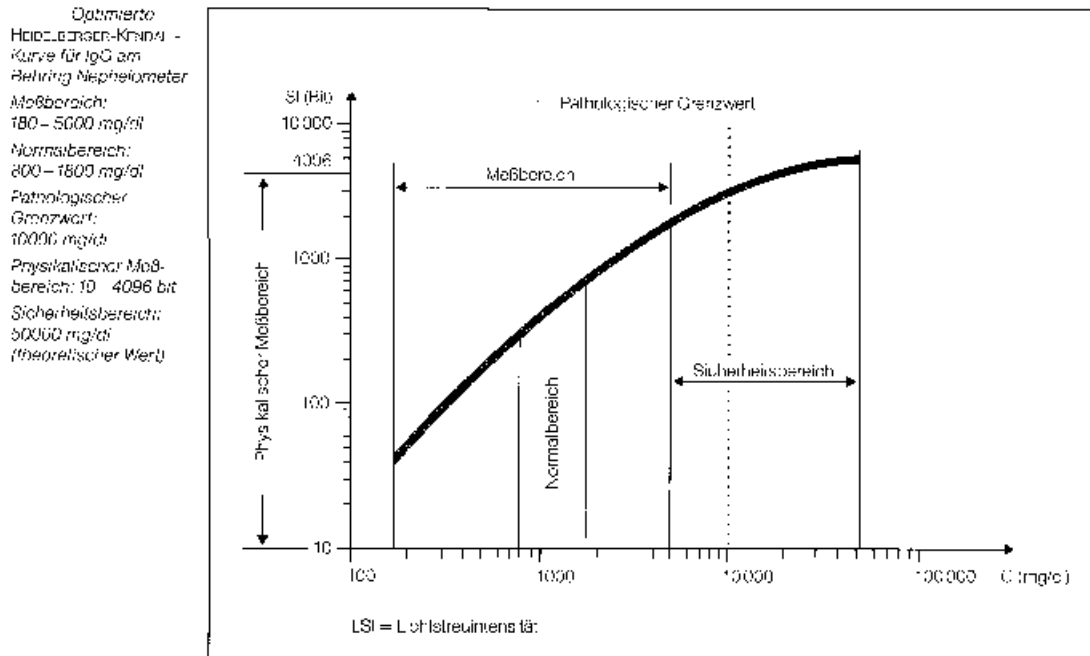


Abbildung 16: Heidelberger-Kendall-Kurve

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:

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

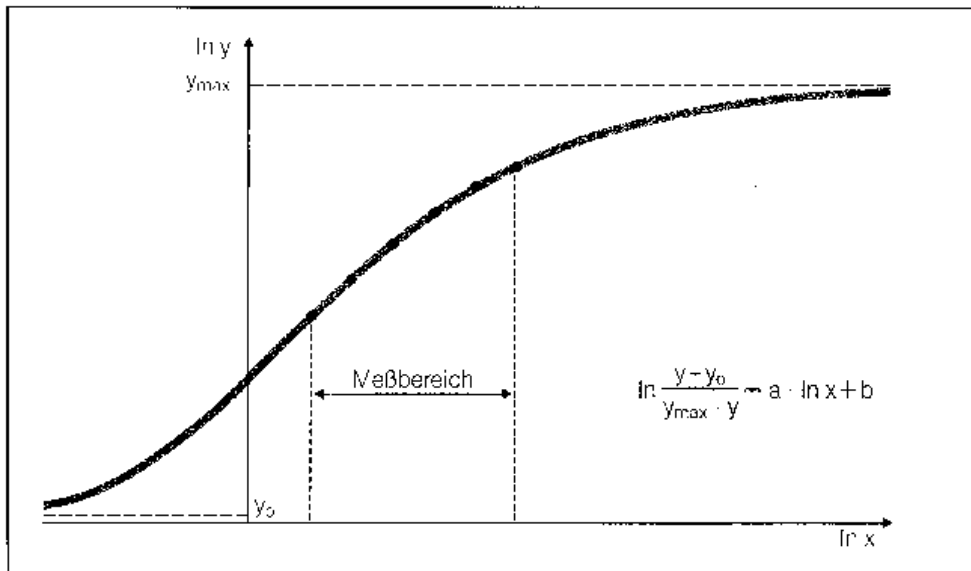


Abbildung 17: Logit-Log-Funktion

Der Referenzkurvenverlauf ändert sich zu einer Geraden, wenn auf der Y-Achse anstelle von  $Y$  der Ausdruck  $\ln \frac{Y - Y_0}{Y_{\max} - Y}$  aufgetragen wird. Die Parameter  $a$  und  $b$  beschreiben dann die Steigung bzw. den Ordinatenabschnitt und werden durch schrittweise Vorgabe von  $Y_0$  und  $Y_{\max}$  mittels linearer Regression aus den Wertepaaren der Referenzkurve berechnet.

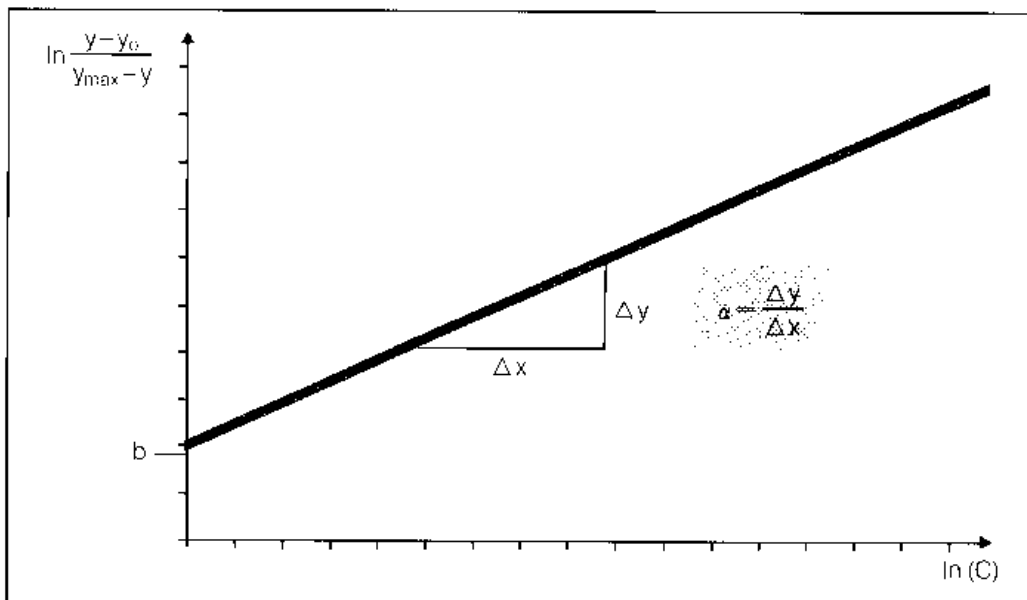


Abbildung 18: Lineare Regression der Logit-Log-Funktion

## 2.3 Elektrophoretische Methoden

### 2.3.1 Acetonfällung

Bei niedrig konzentrierten Proben empfiehlt sich vor weiteren Analysen eine Anreicherung der Proteine z.B. mit der Acetonfällung.

Fällung:                   0,2 ml Probe  
                              1,0 ml Aceton (eiskalt)  
                              10 min bei -20°C inkubieren

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 Glycerin  
                              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 <sub>2</sub> 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. H<sub>2</sub>O 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% Glycerin (75%ig) (v/v)

Kathodenpuffer:

0,02 M NaOH

Anodenpuffer:

0,01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

### **2.3.4 Färbung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau**

Die Proteingele wurden nach der Elektrophorese mit Coomassie-Blau angefärbt, in dem 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  $\mu\text{g}$  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 H<sub>2</sub>O  
100 ml Methanol  
20 ml Essigsäure

Sensitizing (30 min):

105 ml Ultra Pure H<sub>2</sub>O  
100 ml Methanol  
5 ml Sensitizer (Glutaraldehyd)

Waschen:

2 mal 5 min mit 200 ml Ultra Pure H<sub>2</sub>O

Färben (15 min):

5 ml Stainer A (Silbernitrat)  
5 ml Stainer B (Ammoniumhydroxid)  
90 ml Ultra Pure H<sub>2</sub>O

Waschen:

2 mal 5 min mit 200 ml Ultra Pure H<sub>2</sub>O

Entwickeln:

5 ml Entwickler (Formaldehyd)  
95 ml Ultra Pure H<sub>2</sub>O

Stoppen:

5 ml Stopplösung (Zitronensäure)

Waschen:

3 mal 5 min mit 200 ml Ultra Pure H<sub>2</sub>O

### 2.3.6 Westernblot und Immunfärbung

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

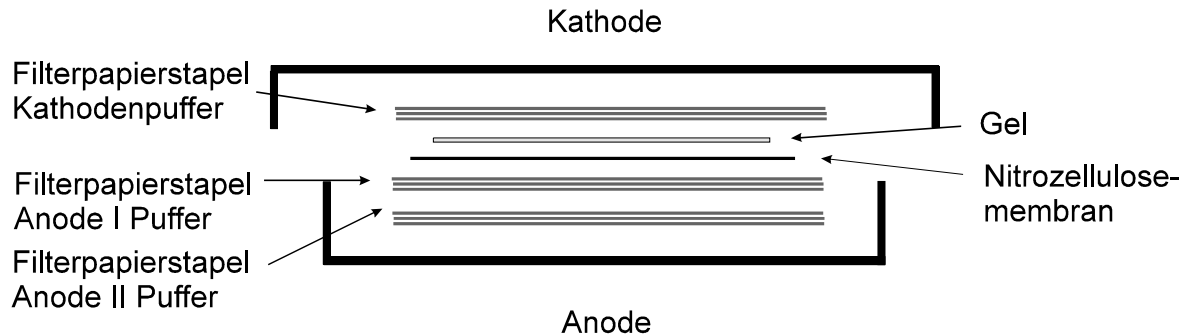


Abbildung 19: Semi-Dry-Verfahren

Dazu wurde das Elektrophorese-Gel 20 min im Kathodenpuffer equilibriert, die Nitrozellulose im Anode I Puffer. Anschließend wurde der Blot gemäß Abbildung 19 zusammengesetzt 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 Apolipoprotein A-I diente ein spezifischer primärer Antikörper (Goat-anti-human-ApoA-I, eigene Herstellung), der keine Kreuzreaktion mit anderen humanen Apolipoproteinen zeigte. Als Zweitantikörper diente ein entsprechender Biotinmarkierter, affinitätsgereinigter Antikörper (biotinylierter Rabbit-anti-Goat Ig(H+L)). Nach Inkubation mit biotinyliertem Streptavidin-Peroxidase-Komplex aus Meerrettich (Amersham, Buckinghamshire, UK) wurde der Blot mit 4-Chloro-1-Naphthol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS gefärbt.

Inkubationen:

1. Blocken mind. 1 Stunde oder über Nacht in 3% BSA in PBS

2. Primärantikörper Goat-anti human ApoA-I 1:1000 in 3% BSA in PBS, 1 Stunde
3. Sekundärantikörper Rabbit-anti-goat Ig(H+L) (Dianova) 1:2000 in PBS, 1 Stunde
4. Biotinylierter Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Amersham) 1:3000 in PBS, 40 Min.
5. Färbung mit 4-Chloro-1-naphthol (30 mg in 10 ml Methanol, mischen mit 50 ml PBS, 100µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.

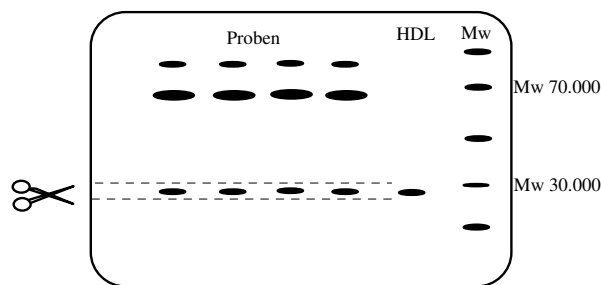


Abbildung 20: Prinzip der präparativen Elektrophorese

Zur Elektroelution wurden die ausgeschnittenen Gelbanden zerkleinert und in die Röhrcchen der Elektroelutionskammer überführt (BioRad, Hercules, CA). Der Boden dieser Röhrcchen wurde mit einer Dialysemembran mit einer molekularen Ausschlußgröße von 3,5 kDa verschlossen. Die Kammer wurde mit 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gefüllt und die Proteine für 4 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 10-15 mA pro Röhrcchen bei 4°C elektroeluiert. Anschließend wurden alle Eluate lyophilisiert und bei -80°C tiefgefroren.

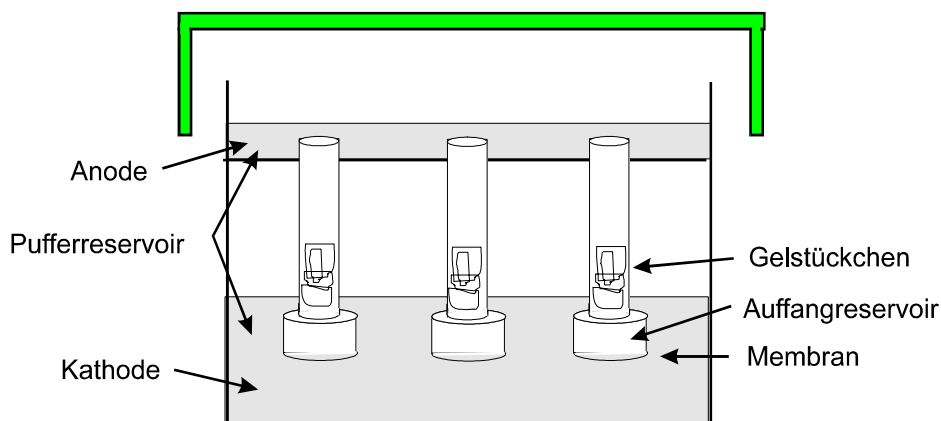


Abbildung 21: Prinzip einer Elektroelutionskammer

### 2.3.8 Präparative Elektrophorese mit der Modell 491 PrepCell®

Als weiterentwickelte Methode zur präparativen Gelelektrophorese wurde die Modell 491PrepCell®, verwendet (BioRad, München, Deutschland).

Prinzipiell besteht die Prep Cell aus einer Zylindergelelektrophoresekammer an deren unteren Zylinderende die Proteine beim Verlassen des Gels kontinuierlich fortgespült werden und anschließend fraktioniert werden können.

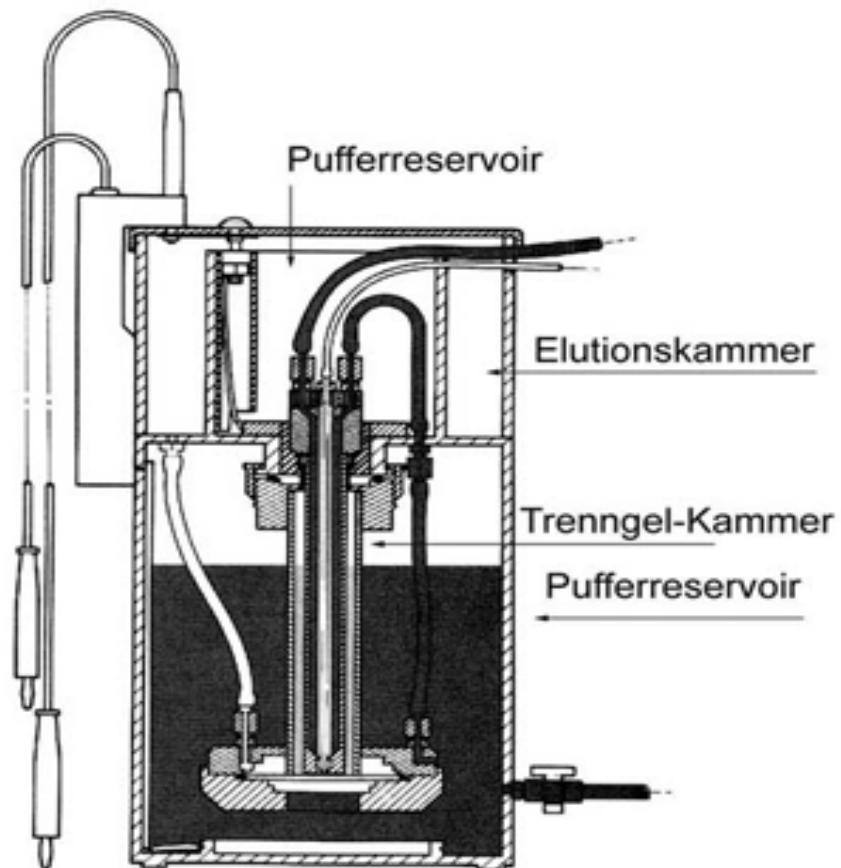


Abbildung 22: Modell 491 PrepCell®

Zur Elektrophorese wurde ein 4-5 cm hohes 12%iges SDS-Polyacrylamid Trenngel sowie ein ca. 0,5 cm hohes 3,5%iges Sammelgel im 28 bzw. 37 mm ID-Tube der Apparatur vorbereitet. Konzentrierter Zellkulturüberstand wurde 2:1 mit Probenpuffer verdünnt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. 1-3 ml der Mischung wurden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 12 W konstanter Leistung für 6 Stunden durchgeführt. Der Elutionspuffer wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,7-0,8 ml/min durch das System gepumpt. Sobald die Bromphenolblaubande das Ende des Gels

erreicht hatte, wurden 3-ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen wurden anschließend mittels SDS-PAAGE und Silberfärbung (Novex, San Diego, USA) sowie Immunoblot analysiert.

Probenpuffer:

252 mM Tris/HCl, pH 6,8  
 40% Glyzerin  
 8% SDS  
 0,01% Bromphenolblau  
 15% 2-Mercaptoethanol

Elutionspuffer:

25 mM Tris  
 200 mM Glycin  
 0,1% SDS

## 2.4 Chromatographische Methoden

### 2.4.1 Size Exclusion Chromatographie (Gelfiltration)

Bei der Gelfiltrationschromatographie können Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Partikelgröße getrennt werden. Die Trennungsmitteln sind meist kugelförmige Partikel mit einem definierten Porenvolumen. Kleinere Moleküle des zu trennenden Gemisches können in die Poren eindringen, größere Moleküle bleiben außerhalb. So ergibt sich je nach Größe des Moleküls eine unterschiedliche Verweildauer auf der Säule.

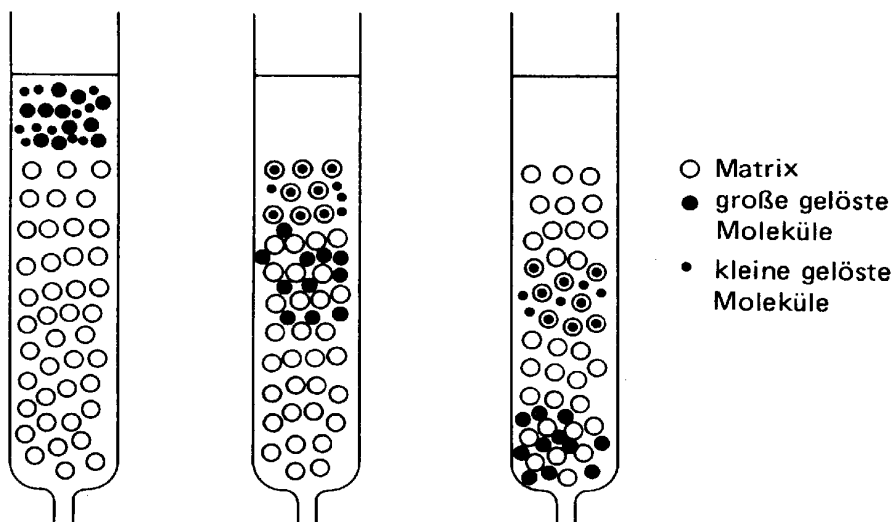


Abbildung 23: Trennprinzip einer Gelfiltrationssäule

Für diese Arbeit standen zwei verschiedene Gelfiltrationssäulen zur Verfügung.

#### 2.4.1.1 Superose 6

Dieses Material besteht aus quervernetzten Agarosemolekülen mit einer Partikelgröße von 11-15 µm und trennt Moleküle im Bereich von 5 bis 5000 kDa.

Zur Aufreinigung von ApoA-I wurden jeweils 0,5 ml konzentrierter Zellkulturüberstand auf die Superose 6-Säule (1 x 30 cm) (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gegeben und mit verschiedenen Puffersystemen mit einer Flußrate von 0,3-0,5 ml/min eluiert.

##### System A [96]:

6 M Guanidinhydrochlorid

##### System B [97]:

10 mM Phosphat, 0,5 M NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,0

##### System C:

20 mM Tris, 5 mM DTT, pH 8,2

##### System D:

50 mM Tris, pH 7,9

##### System E:

50 mM Tris, 5% Ethanol, pH 7,9

#### 2.4.1.2 HiLoad Superdex 75

Dieses Material besteht aus quervernetzter Agarose mit kovalent gebundenem Dextran bei einer Partikelgröße von 24-44 µm. Der Trennbereich dieser Säule für globuläre Proteine liegt bei 3-70 kDa.

Auf die HiLoad Superdex 75 Säule (1,6 x 60 cm) (Pharmacia) wurden bis zu 1 ml konzentrierter Zellkulturüberstand aufgetragen und mit 50 mM Tris, pH 7,9 und einer Flußrate von 0,3-0,5 ml/min eluiert.



## 2.4.2 Anionenaustauschchromatographie

Ionenaustauscher sind Materialien, die auf natürlichen oder synthetischen Polymeren basieren. Diese Polymere sind chemisch modifiziert und tragen, kovalent gebunden, verschieden stark negativ und/oder positiv geladene funktionelle Gruppen, die in Lösung durch frei bewegliche Gegenionen entsprechend ihrer Ladung neutralisiert werden können. Ein Kationenaustauscher besitzt demnach in einem bestimmten pH-Wert-Bereich negativ geladene Gruppen, die Kationen zu binden vermögen, während die positiv geladenen Gruppen eines Anionenaustauschers durch Anionen neutralisiert werden. Die Gegenionen am neutralisierten Ionenaustauscher können wiederum durch gleichgeladene andere Ionen oder Moleküle verdrängt werden. Es kommt zu einem Ionenaustausch an der geladenen Matrix. Da Ionen und geladene Moleküle um die Bindung am Ionenaustauscher konkurrieren, ist die Bindung von Molekülen an eine geladene Matrix umso fester, je geringer die Ionenkonzentration bzw. die Ionenstärke ist. Eine Erhöhung der Ionenstärke bewirkt somit ein ladungsabhängiges schrittweises Ablösen der an der Matrix gebundenen Moleküle. Die meisten Biopolymere tragen sowohl positive wie auch negative Ladungen. Es sind also amphotere Substanzen, deren Nettoladung vom jeweiligen pH-Wert ihrer Lösung abhängt. Der pH-Wert, der die Nettoladungen gleich Null werden läßt, wird als isoelektrischer Punkt bezeichnet. Am isoelektrischen Punkt können Moleküle an keinen Ionenaustauschertyp gebunden werden, bzw. werden von diesem wieder abgelöst. Somit besteht die Möglichkeit, Moleküle nicht nur durch die Erhöhung der Ionenstärke vom Ionenaustauscher zu verdrängen, sondern auch durch die Änderung des pH-Wertes des Elutionsmittels unter Beibehaltung oder gleichzeitiger Erhöhung der Ionenstärke.

Für die chromatographischen Eigenschaften eines Ionenaustauschers sind die Art und die Anzahl der funktionellen Gruppen sowie die Natur der Matrix ausschlaggebend.

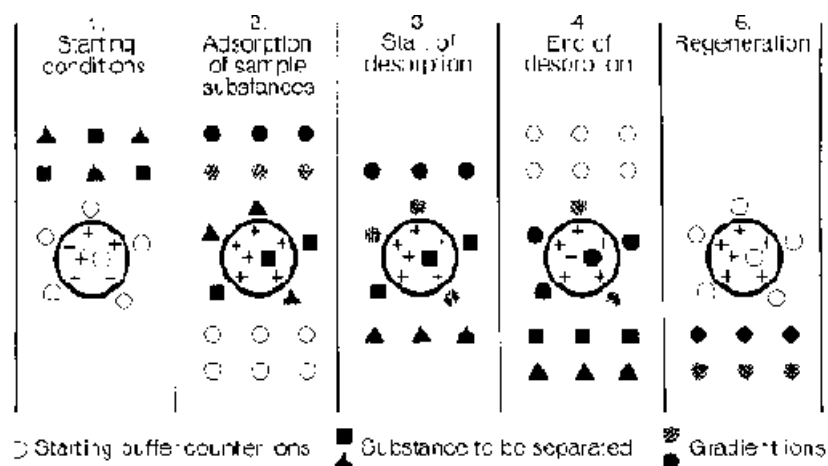


Abbildung 24: Prinzip der Ionenaustauschchromatographie

Für diese Arbeit standen zwei verschiedene Säulen zur Verfügung, die aber beide den gleichen Liganden trugen und sich sonst nur in den Dimension der Säule unterschieden (Mono Q 2,0 ml, Pharmacia; Marcoprep High Q Anion Exchange Support, 10,0 ml BioRad).

Der Ligand des Ionenaustauschermaterials ist ein quartäres Amin.

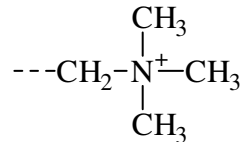


Abbildung 25: quartärer Ammoniumligand der Anionenaustauschersäulen

Eine MacroPrep HighQ Anionenaustauscher Säule (BioRad) (1 x 3 cm) wurde in Puffer A equilibriert und mit 0,5-1,0 ml konzentriertem Zellkulturüberstand beladen. Die Proteine wurden mit einem Stufengradienten (Puffer B) bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert.

Puffer A:

20 mM Tris, pH 7,9

Puffer B:

20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7,9

### 2.4.3 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 Lösung von Liganden erfolgen. Die Trennung eines Makromoleküls von anderen beruht also auf der biologischen Funktion und somit auf der spezifischsten Eigenschaft eines biologischen Moleküls.

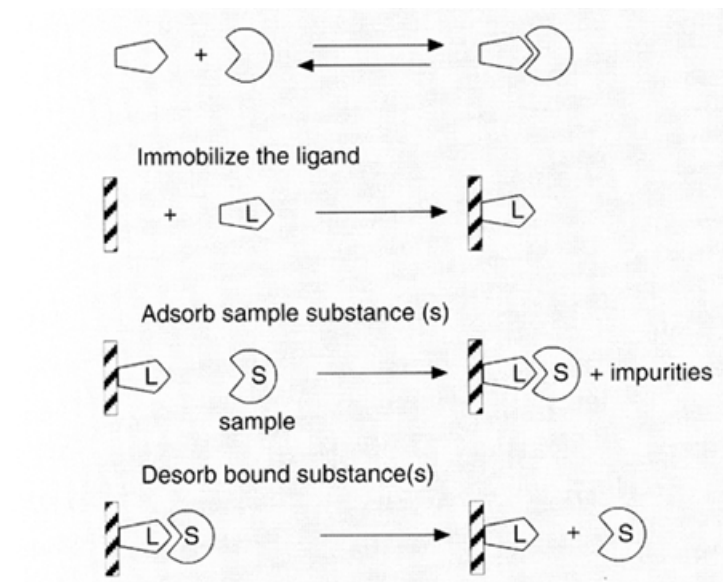


Abbildung 26: Prinzip der Affinitätschromatographie:

Eine mit anti-humanem ApoA-I Antikörper gekoppelte Sepharose 4b Säule (3,5 x 6,7 cm) wurde in 0,015 M Tris, 0,15 NaCl, pH 7,4 equilibriert. Der Zellkulturüberstand wurde auf die Säule gegeben und bei einer Flußrate von 0,3 ml/min mit 0,1 M Essigsäure bzw. 3 M Natriumthiocyanat (NaSCN) eluiert [98, 99].

#### 2.4.4 Reversed Phase Chromatographie

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

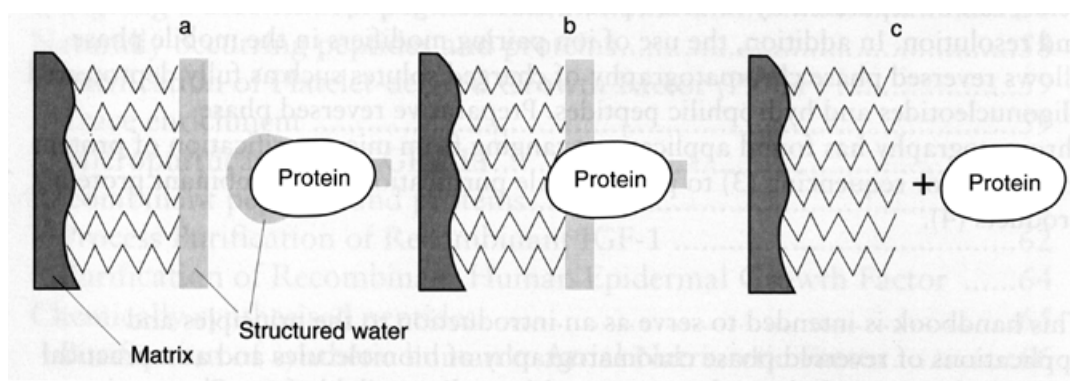


Abbildung 27: Prinzip der Reversed Phase Chromatographie

Die SOURCE 15RPC (Pharmacia) Reversed Phase Chromatographie Säule (2 x 9,4 cm) wurde in 10% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure equilibriert [100]. 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 0 - 60% Puffer B (95% Acetonitril, 0,1% TCA).

## 2.5 Isolation von humanem Apolipoprotein A-I aus Serum

Ein Standardverfahren zur Isolation der Lipoproteine aus Serum ist die fraktionierte Ultrazentrifugation [101]. 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.

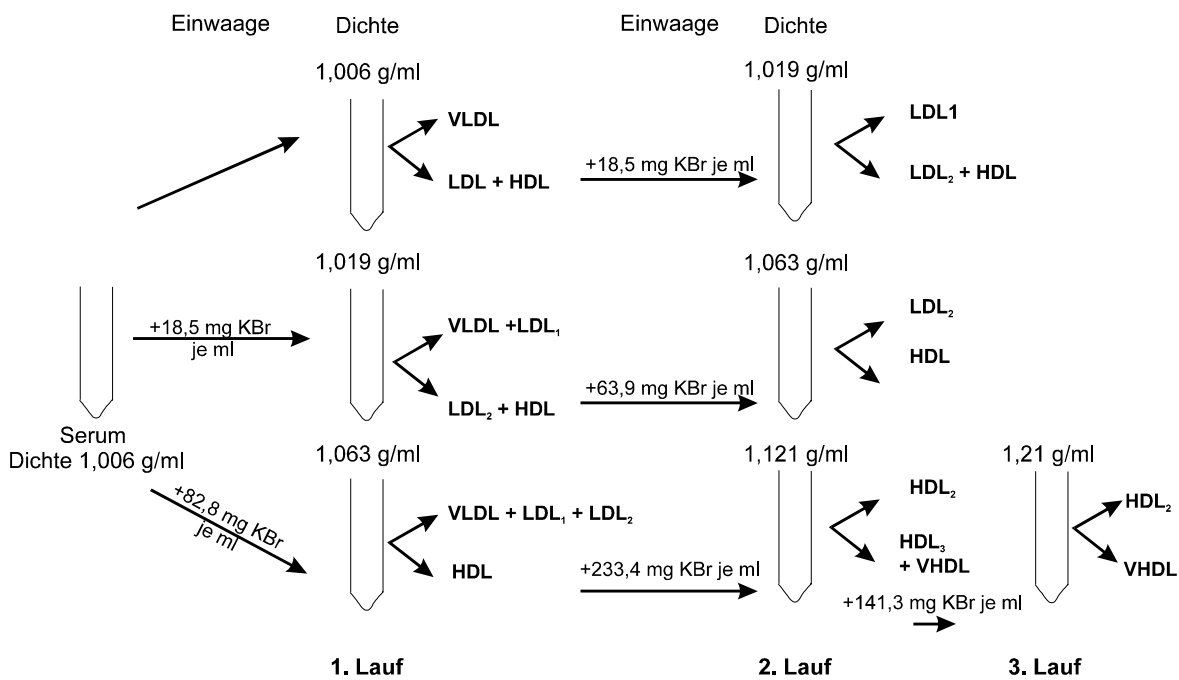


Abbildung 28: Allgemeines Schema zur Isolation der Lipoproteine mittels fraktionierter Ultrazentrifugation

Für die Isolation des humanen Apolipoprotein A-I wurde normolipämischen Patienten mit einer Monovette (Braun, Melsungen) Blut abgenommen und nach Gerinnung bei 3000 rpm für 10 min abzentrifugiert (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, Californien, USA). 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, und für spätere Anwendungen aliquotiert und eingefroren.

## **2.6 Stoffwechselkinetische Untersuchungen**

### **2.6.1 Kaninchen**

Der Lipidstoffwechsel der Kaninchen ist dem des Menschen recht ähnlich. Aus diesem Grund eignet sich das Kaninchen als hervorragendes Modell für den humanen Lipidstoffwechsel [102-107]. Der Dichtebereich der Kaninchen-HDL-Fraktion wird analog dem des Menschen definiert. (HDL<sub>2</sub>,  $d = 1,063-1,125$  g/ml und HDL<sub>3</sub>,  $d = 1,125-1,210$  g/ml).

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

### **2.6.2 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 Stoffwechselkäfigen gehalten. Diese Käfige ermöglichen die gesonderte Sammlung von Urin und Kot. Die Nahrungszufuhr erfolgte über automatische Futter- und Wasserspender.

### **2.6.3 Radioiodmarkierung von Apolipoprotein A-I**

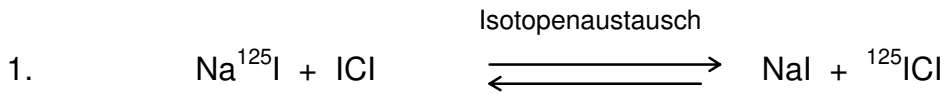
#### **2.6.3.1 Iod-Mono-Chlorid-Methode**

Für Radioiodmarkierungen wurden die beiden Isotope <sup>125</sup>I ( $t_{1/2}$ : 60 Tage,  $\gamma$ -Strahler) sowie <sup>131</sup>I ( $t_{1/2}$ : 8 Tage,  $\gamma$ - und  $\beta^-$ -Strahler) verwendet.

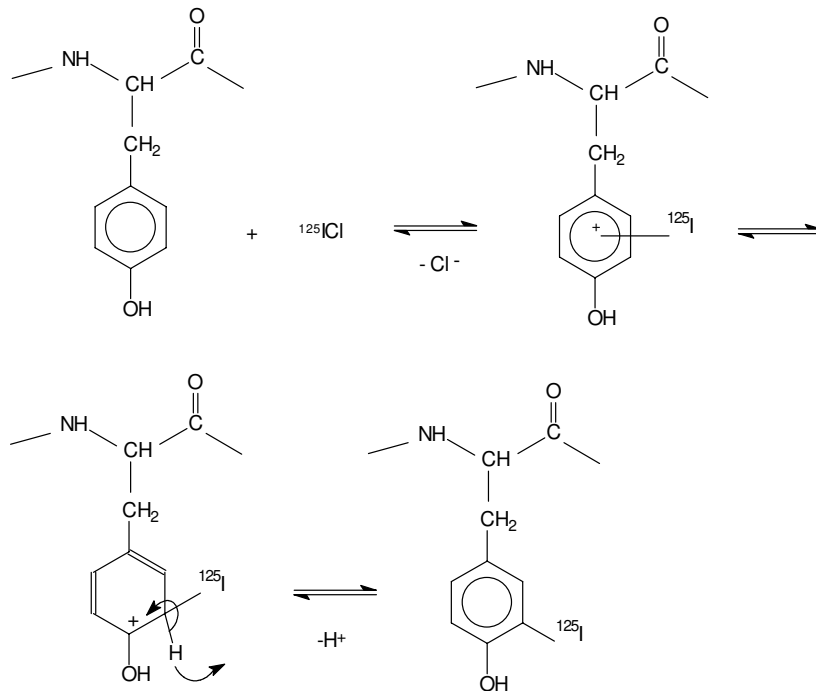
Für die Markierung wird folgender Reaktionsmechanismus angenommen:

Im ersten Schritt erfolgt ein schneller Isotopenaustausch zwischen Na<sup>125/131</sup>I und

Iodmonochlorid (ICl). Im zweiten Schritt greift das positiv polarisierte Iod aus dem ICl 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.

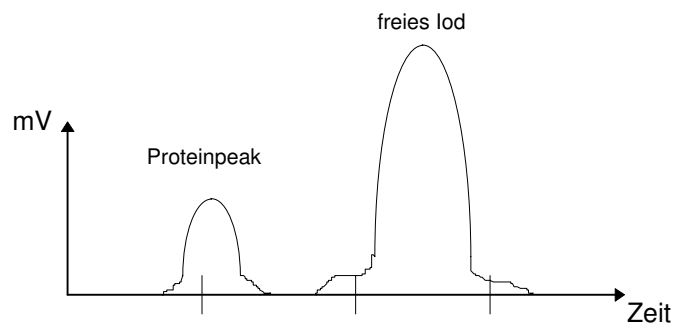


2.



Zur Iodierung der Apolipoproteine wurden  $\text{Na}^{125}\text{I}$  bzw.  $\text{Na}^{131}\text{I}$  mit einer Aktivität von ca. 2,7 mCi (100 MBq) eingesetzt. 100  $\mu\text{g}$  lyophilisiertes Apolipoprotein wurde in 100  $\mu\text{l}$  Guanidin-Puffer gelöst (6 M Guanidinhydrochlorid, 1 M Glycin, pH 8,5) und mit der entsprechenden Menge  $\text{Na}^{125}\text{I}$  bzw.  $\text{Na}^{131}\text{I}$  versetzt. Zu dieser Mischung wurde Iodmonochlorid gegeben. Das molare Verhältnis von Protein zu ICl 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 dünnschichtchromatographisch überprüft (Gelman ITLC SG, PBS-Puffer, 1  $\mu$ l Probe, 7,5 cm Laufstrecke).

## **2.6.4 Isolation der HDL-Fraktion**

### 2.6.4.1 Isolation der HDL-Fraktion mittels Ultrazentrifugation

Nach der Radioiodmarkierung wurden die Proteine sofort mit autologem Kaninchenserum inkubiert. Mit KBr wurde eine Dichte von 1,063 g/ml eingestellt. Das Serum wurde in 1 ml Röhrcchen (Beckmann, Ultraclear) eingefüllt und in der Minifuge (Beckmann TL-100) bei 100.000 rpm für 2,5 Stunden zentrifugiert. Anschließend wurden die Röhrcchen ca. auf der Hälfte geschnitten und der Überstand verworfen. Der Unterstand wurde mit festem KBr auf eine Dichte von 1,21 g/ml eingestellt, erneut in 1 ml Röhrcchen eingefüllt und 2,5 Stunden bei 100.000 rpm zentrifugiert. Die Röhrcchen wurden wieder ca. auf der Hälfte geschnitten. Der Überstand wurde gesammelt und gegen isotonische Kochsalzlösung dialysiert. Das Dialysat wurde sterilfiltriert und zur Injektion verwendet.

### 2.6.4.2 Superose 6

Ein weiteres Verfahren zur Isolation der HDL-Fraktion war die Auftrennung der Seren über eine Superose 6-Säule (Pharmacia). Dazu wurden 0,8 ml Markierungslösung mit 0,2 ml Kaninchenserum gemischt und 10 min bei Raumtemperatur 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.

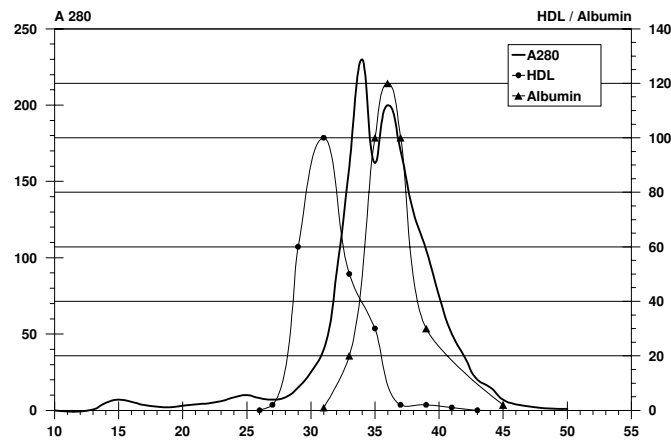


Abbildung 29: Elutionsprofil einer Superose 6-Säule, Abtrennung der HDL-Fraktion aus Kaninchenserum

### 2.6.5 Stoffwechselkinetische Untersuchungen

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

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

500  $\mu\text{l}$  Aliquots dieser Seren wurden anschließend im Gamma-Counter (Compu-Gamma, Pharmacia) auf ihre Aktivität hin untersucht.

Während der Kinetik wurde der Urin der Kaninchen ebenfalls gesammelt, aliquotiert und die Aktivität bestimmt.

Die während der Kinetik erhaltenen Seren wurden mittels FPLC-Analyse und Dichtegradienten-Ultrazentrifugation bezüglich ihrer Aktivitätsverteilung untersucht.

### 2.6.6 FPLC-Analyse

0,2-0,5 ml Serum wurden auf eine Superose 6-Säule (1x30 cm, Pharmacia) gegeben und mit PBS-Puffer, 1mM EDTA, 0,1%  $\text{NaN}_3$  eluiert. 0,5 ml Fraktionen wurden gesammelt und ihre Aktivität untersucht.

### 2.6.7 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 sammeln sich in dem ihrer eigene Dichte entsprechenden Bereich.



|                            | Density (g/ml)     |       |       |       |       |
|----------------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
|                            | 1.006 <sup>a</sup> | 1.019 | 1.063 | 1.210 | 1.386 |
| NaBr (g) <sup>b</sup>      | 4.5                | 13.51 | 42.46 | 141.7 | 262.4 |
| 10% EDTA (ml) <sup>c</sup> | 2.5                | 2.5   | 2.5   | 2.5   | 2.5   |
| Final volume (ml)          | 500                | 500   | 500   | 500   | 500   |

Tabelle 7: Zusammensetzung der verschiedenen Dichtelösungen

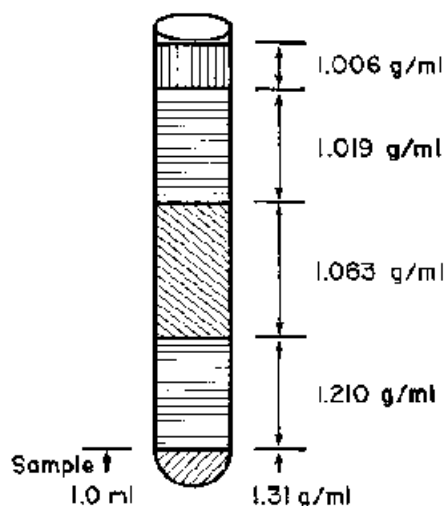


Abbildung 30: Einstellung des Dichtegradienten

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. leicht    | 2. schwer    |
|---------------|--------------|--------------|
| 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          |
|               | 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 wurden die Fraktionen auf ihre Aktivität hin untersucht.

### **2.6.8 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) exponiert und anschließend entwickelt.

## **2.7 Bestimmung der N-terminalen Proteinsequenz**

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

## **2.8 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 wurden in Kooperation mit dem Niedersächsischen Institut für Peptidforschung (IPF) in Hannover durchgeführt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Expression von humanem, rekombinanten Apolipoprotein A-I in CHO-Zellen

##### 3.1.1 Isolation eines „High Expression Clone“

Bei Transfektionen von Zellkulturen mit DNA ist die Transfektionseffizienz von Zelle zu Zelle unterschiedlich. Die Menge an aufgenommener und integrierter Fremd-DNA kann über einen weiten Bereich schwanken. Für die Expression rekombinanter Proteine mit Hilfe stabil transfizierter Zelllinien ist es von Interesse, solche Zellen ausfindig zu machen, die möglichst viel Fremd-DNA integriert haben und somit in der Lage sind, rekombinantes Protein in hohen Konzentrationen zu exprimieren.

Mit Hilfe der Methode des „*Limiting dilution*“ wurde für beide verwendeten Zelllinien (CHOApoA-I<sub>WT</sub> und CHOApo A-I<sub>Iowa</sub>) ein sogenannter „High expression clone“ isoliert.

Nach „*Limiting dilution*“ wurden die einzeln wachsenden Klone separat kultiviert und zur r-ApoA-I Expression induziert. Die exprimierte Menge r-ApoA-I wurde nephelometrisch bestimmt. Abbildung 31 zeigt verschiedene Klone mit den entsprechenden r-ApoA-I Konzentrationen.

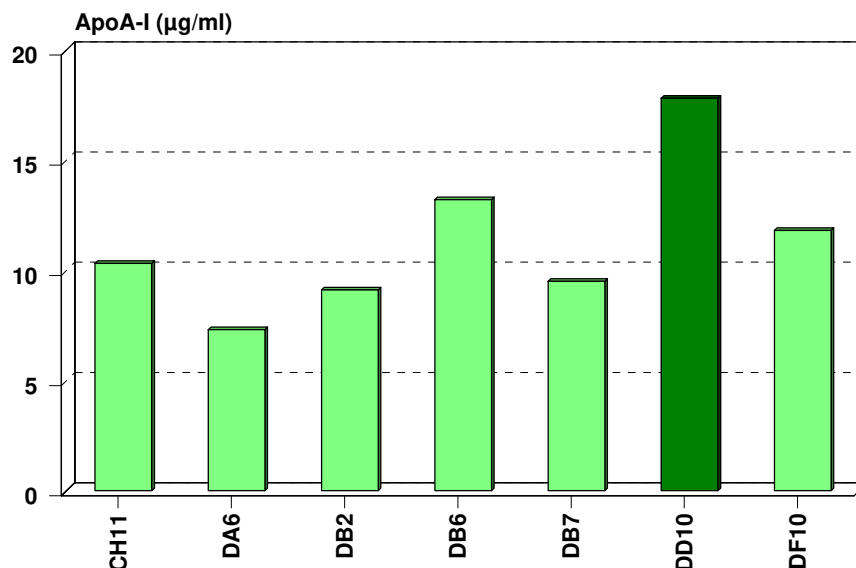


Abbildung 31: r-ApoA-I Expression der verschiedenen Klone nach „*Limiting dilution*“

Für die Zelllinie CHOApoA-I<sub>WT</sub> konnte ein Klon mit dem ca. 10-fachen Expressionsvermögen isoliert werden (DD10) verglichen mit den Zellen vor „*Limiting dilution*“. Für die Zelllinie CHOApoA-I<sub>Iowa</sub> wurde ein Klon mit dem ca. 7-fachen Expressionsvermögen (Iowa 7/3, Ergebnisse nicht abgebildet) isoliert.

### 3.1.2 Optimierung der Expressionsbedingungen

Zur erfolgreichen Proteinexpression müssen in der Regel die Kultivierungsbedingungen für die verwendete Zelllinie sowie die Expressionsbedingungen für das gewünschte Protein optimiert werden. In diesem Fall war es notwendig, für die Expression des rekombinanten Apolipoprotein A-I serumfreie Kultivierungsbedingungen herzustellen, da gängige Serumzusätze (z.B. fötales Rinderserum) ebenfalls Apolipoproteine enthalten, die von den humanen kaum oder gar nicht zu trennen waren. Ebenfalls war es notwendig, eine optimal stimulierende Zinkkonzentration für den Metallothionin-Promotor zu ermitteln.

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Ergebnisse zahlreicher Expressionsansätze mit verschiedenen Medien illustriert. Kultiviert wurde jeweils in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen über einen Zeitraum von 96 Stunden. Eine längere Expressionsdauer kam aufgrund sonst eintretender Unterversorgung der Zellen bzw. eintretender Zellyse nicht in Frage. Verschiedene Zinkkonzentrationen zwischen 0 und 100 µM Zink wurden dabei ausgetestet. Täglich wurden Proben entnommen und die r-ApoA-I Konzentration bestimmt.

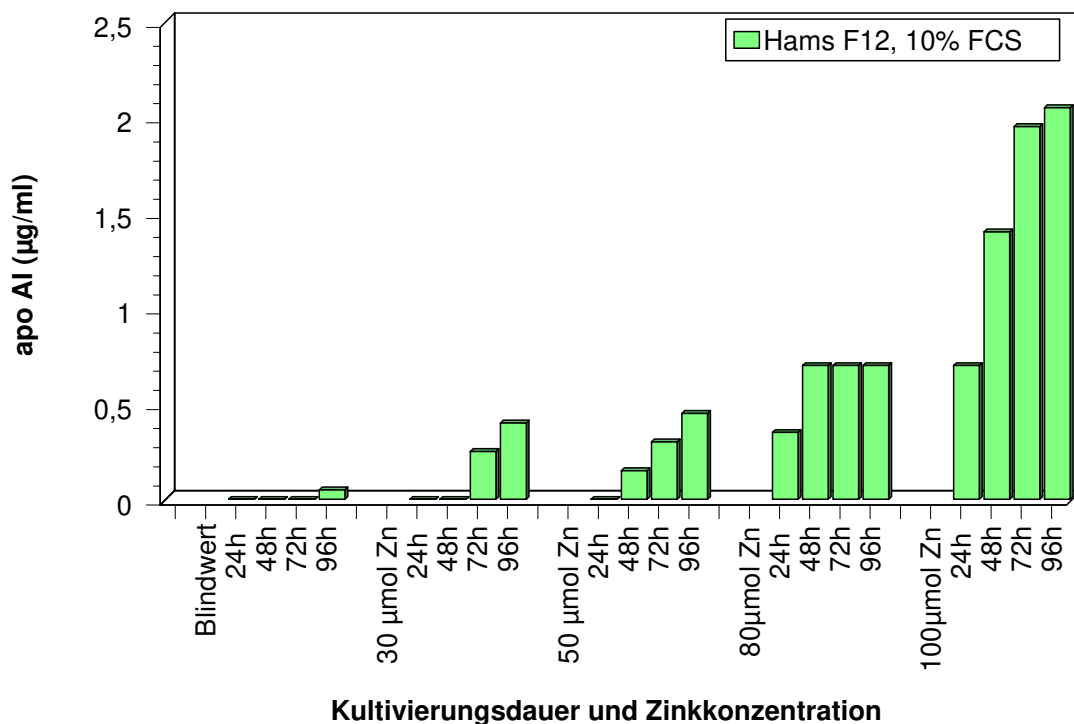


Abbildung 32: Kultivierung von CHO<sub>ApoA-I<sub>WT</sub></sub> mit Hams F-12, 10% FCS und verschiedenen Zinkkonzentrationen

Abbildung 32 zeigt die Kultivierung mit dem Medium Hams F-12 und Serumzusatz. Die Werte für r-ApoA-I wurden jeweils um den Anteil des Rinder-ApoA-I aus dem Serum korrigiert. Ein Maximum der r-ApoA-I Konzentration von 2,0  $\mu\text{g/ml}$  ergab sich bei einer Zinkkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  und einer Kultivierungsdauer von 96 Stunden.

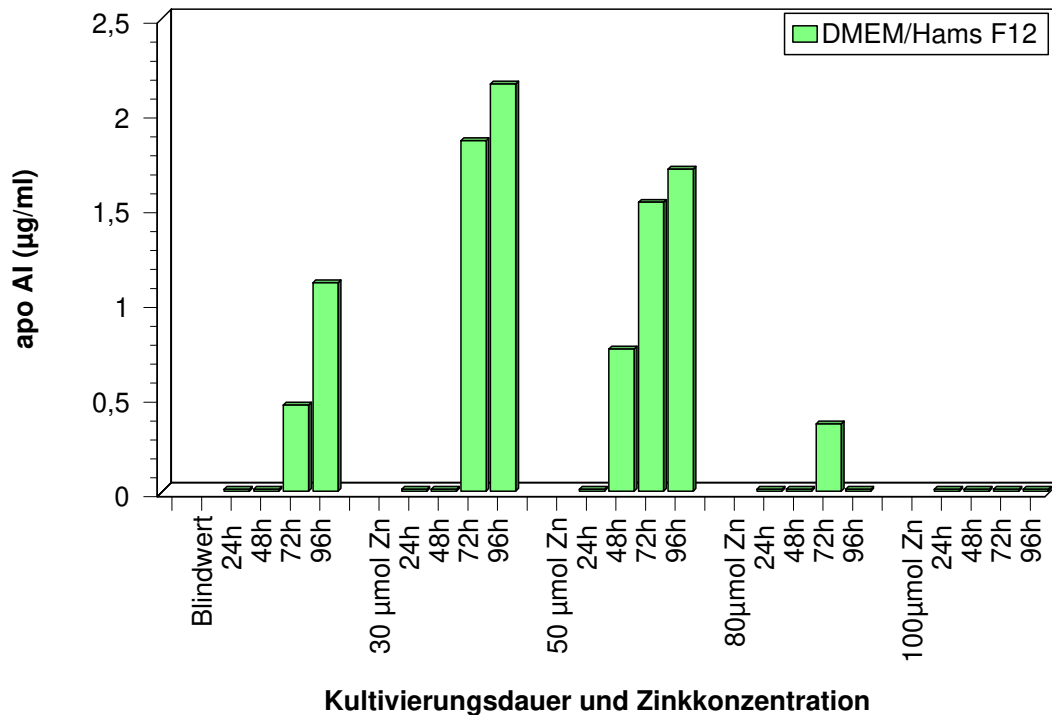


Abbildung 33: Kultivierung von CHO $\text{ApoA-I}_{\text{WT}}$  mit DMEM/Hams F-12 und verschiedenen Zinkkonzentrationen

Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse einer Kultivierung mit einer 1:1-Mischung von DMEM und Hams F-12 ohne die Addition von Serum. Hier ergab sich ein Maximalwert der r-ApoA-I Konzentration von 2,15  $\mu\text{g/ml}$  bei einer Zinkkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  Zink. Mit steigender Zinkkonzentration nahmen die r-ApoA-I Werte wieder ab.

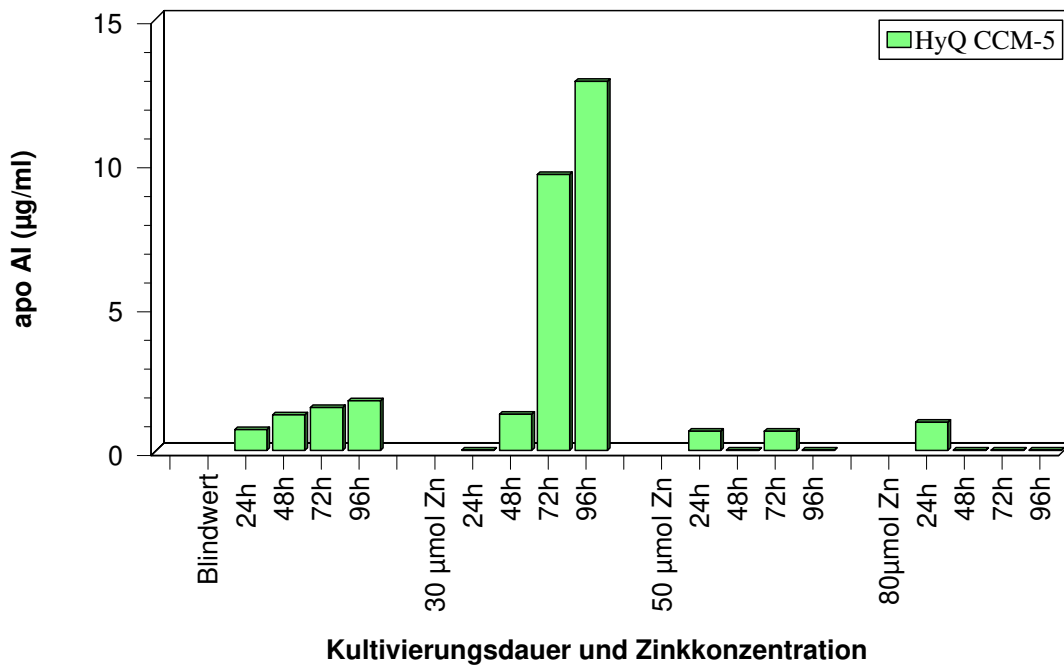


Abbildung 34: Kultivierung von CHO $ApoA-I_{WT}$  mit HyQ CCM-5 und verschiedenen Zinkkonzentrationen

Die Kultivierung mit dem Medium HyQ CCM-5 ist in Abbildung 34 dargestellt. Ein Maximum von 12,8 µg/ml r-ApoA-I wurde bei 30 µM Zink und einer Kultivierungsdauer von 96 Stunden erreicht. Bei höheren Zinkkonzentrationen nahm die r-ApoA-I Konzentration wieder ab.

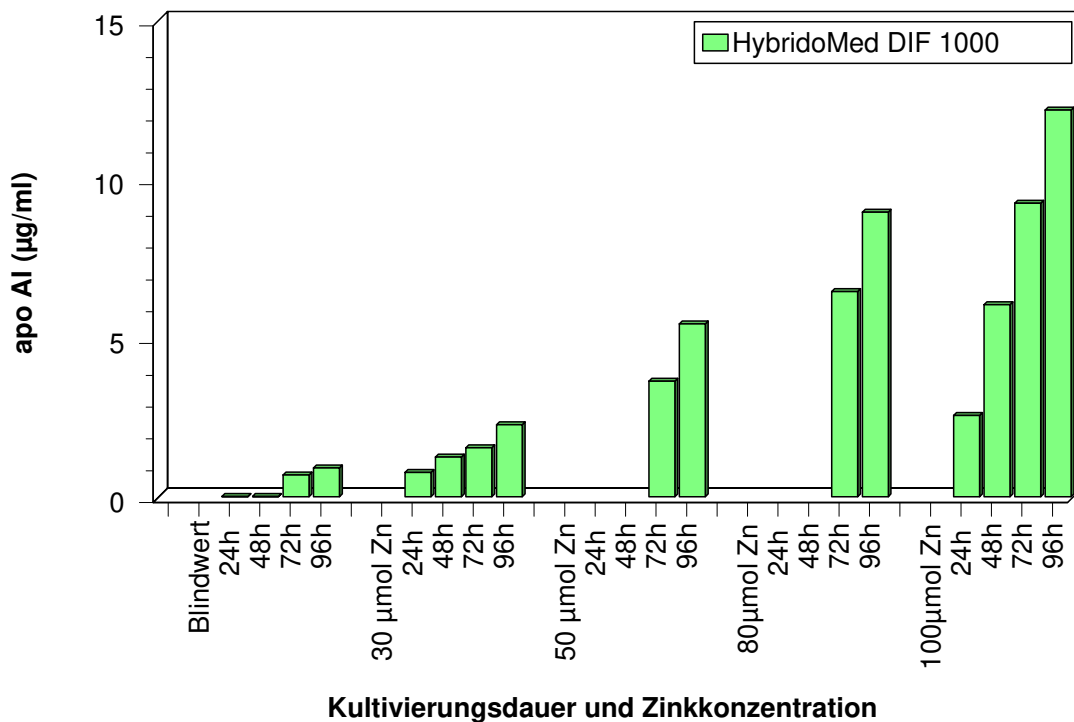


Abbildung 35: Kultivierung von CHO $ApoA-I_{WT}$  mit Hybridomed DIF 1000 und verschiedenen Zinkkonzentrationen

Die Kultivierung mit dem Medium HybridoMed DIF 1000 ist in Abbildung 35 illustriert. Bei einer Zinkkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  und einer Kultivierungsdauer von 96 Stunden wurde ein Optimum der r-ApoA-I Konzentration von 12,2  $\mu\text{g/ml}$  erreicht.

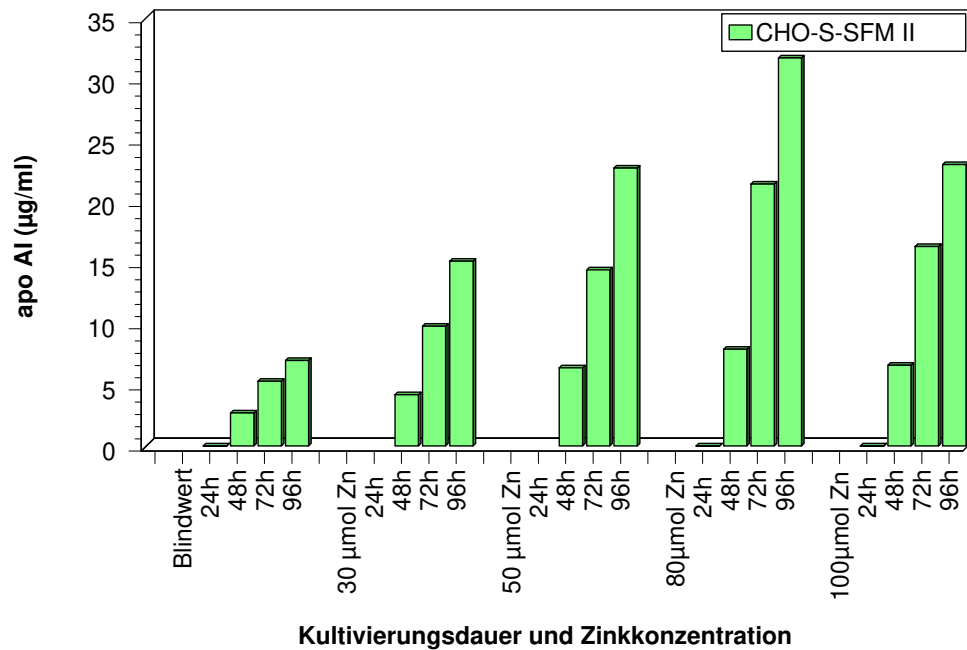


Abbildung 36: Kultivierung von CHOApoA-I<sub>WT</sub> mit CHO-S-SFM II und verschiedenen Zinkkonzentrationen

Abbildung 36 stellt die Ergebnisse einer Kultivierung mit dem Medium CHO-S-SFM II dar. Der Maximalwert der r-ApoA-I Konzentration lag hier bei einer Zinkkonzentration von 80  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  und 96 Stunden Kultivierungsdauer. Es wurde eine Konzentration von 32  $\mu\text{g/ml}$  r-ApoA-I erreicht.

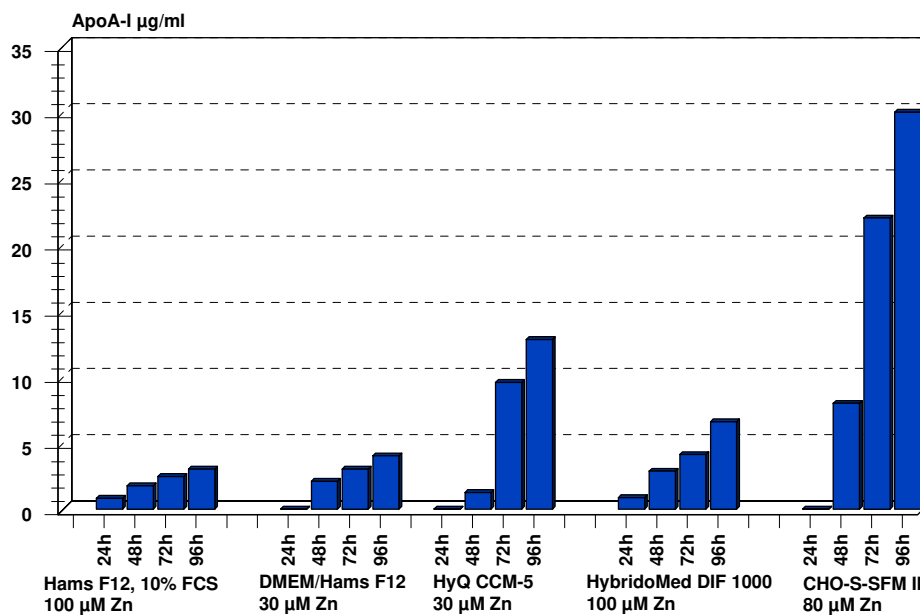


Abbildung 37: Expression von r-ApoA-I mit verschiedenen Medien bei jeweils optimal stimulierender Zinkkonzentration

In Abbildung 37 sind noch einmal die Werte für jedes Medium bei der jeweils optimal stimulierenden Zinkkonzentration dargestellt. Abbildung 38 zeigt dieselben Proben nach Immunoblotanalyse. Auf die Darstellung der Werte für das Medium HyQ CCM-5 wurde hier verzichtet. Vorangegangene Analysen hatten bereits gezeigt, daß das Medium geringe Mengen eines im Immunoblot mit humanem ApoA-I kreuzreagierenden Proteins enthielt. Nachfragen beim Hersteller bezüglich der Zusammensetzung dieses Mediums ergaben, daß zwar direkt keine humanen Apolipoproteine zugesetzt wurden, wohl aber aus humanem Serum gewonnenes Cholesterin, welches nun wiederum mit Apolipoproteinen kontaminiert sein konnte. Aus diesem Grund fand dieses Medium nachfolgend keine weitere Verwendung.

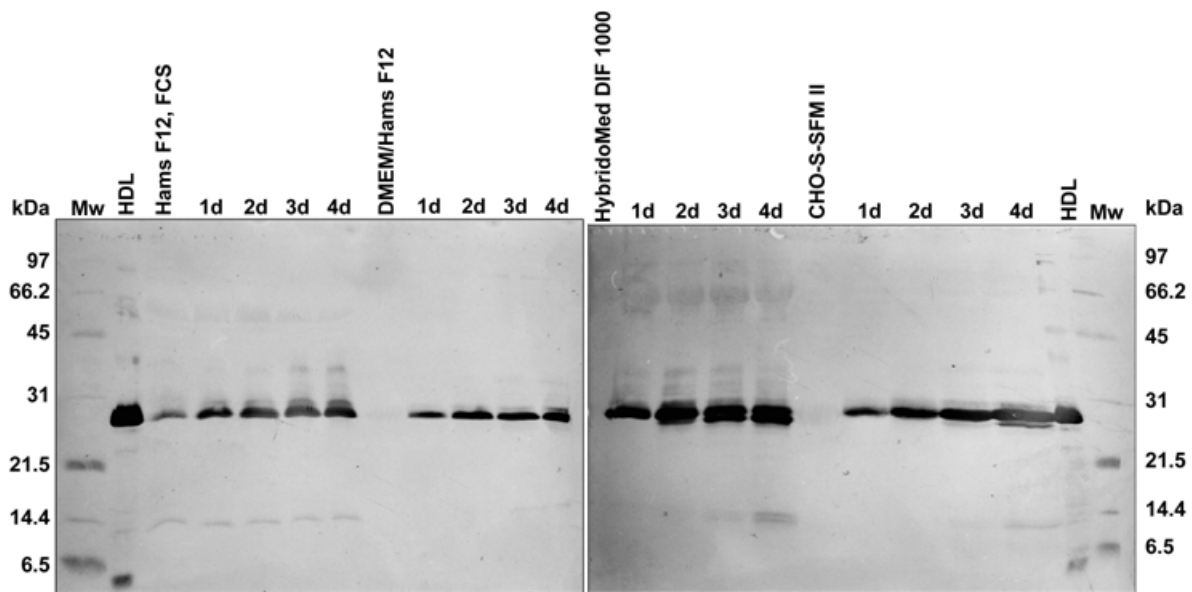


Abbildung 38: Immunoblotanalyse der r-ApoA-I Expression mit verschiedenen Medien bei optimal stimulierender Zinkkonzentration

Der Westernblot zeigt von links nach rechts jeweils das verwendete Medium mit den Proben von 24 bis 96 Stunden Expressionsdauer für das entsprechende Medium. Bei allen verwendeten Medien erkennt man deutliche Banden des exprimierten Proteins bei 28 kDa. Desweiteren erkennt man, in unterschiedlicher Ausprägung, zusätzliche Banden (ca. 26 kDa und schwächer ca. 14 kDa), bei denen es sich um Degradationsprodukte des r-ApoA-I handelte. Am deutlichsten ausgeprägt war dies für das Medium HybridoMed DIF 1000. Weniger ausgeprägt erschien diese Degradation beim Medium DMEM/Hams F-12. Allerdings konnten mit diesem Medium keine hohen Expressionsraten erzielt werden (siehe Abbildung 33). Am günstigsten erschien die Expression mit dem Medium CHO-S-SFM II. Hier traten erst nach 96 Stunden deutlich Degradationsprodukte auf. Gleichzeitig konnten mit diesem Medium die höchsten r-ApoA-I Konzentrationen erzielt werden.



So ergaben sich als optimale Kultivierungsbedingungen die Verwendung des CHO-S-SFM II mit einem Zinkzusatz von  $80 \mu\text{M Zn}^{2+}$  und einer maximalen Expressionsdauer von 72 Stunden.

Abschließend wurde noch der Einfluß der eingesetzten Zinkkonzentration auf die Vitalität der kultivierten Zellen über einen Expressionszeitraum von 96 Stunden ermittelt. Dazu wurden 50% der Ansätze in CHO-S-SFM II kultiviert und mit  $80 \mu\text{M Zn}$  induziert, die anderen 50 % dienten als Kontrollen und wurden nicht induziert. Täglich wurden Proben entnommen und die Zahl der lebenden sowie der toten Zellen bestimmt.

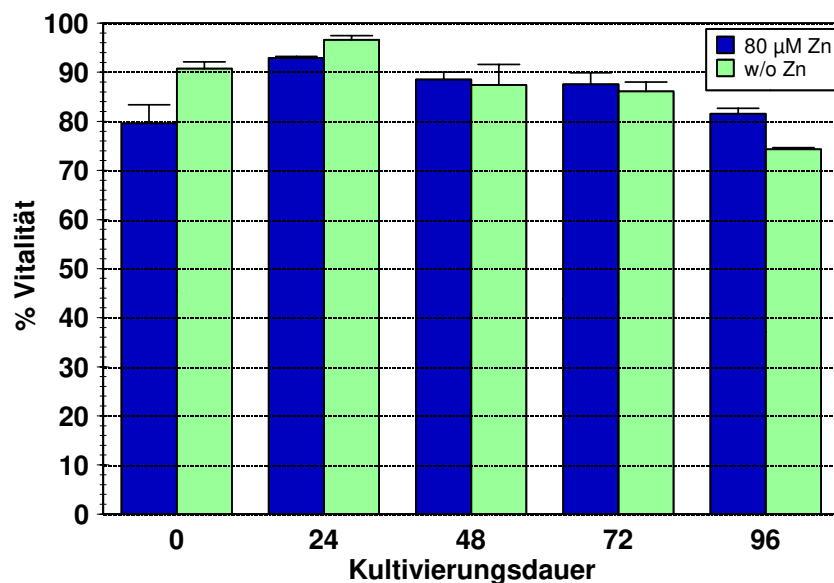


Abbildung 39: Vitalität der CHO-Zellen während einer Kultivierungsperiode

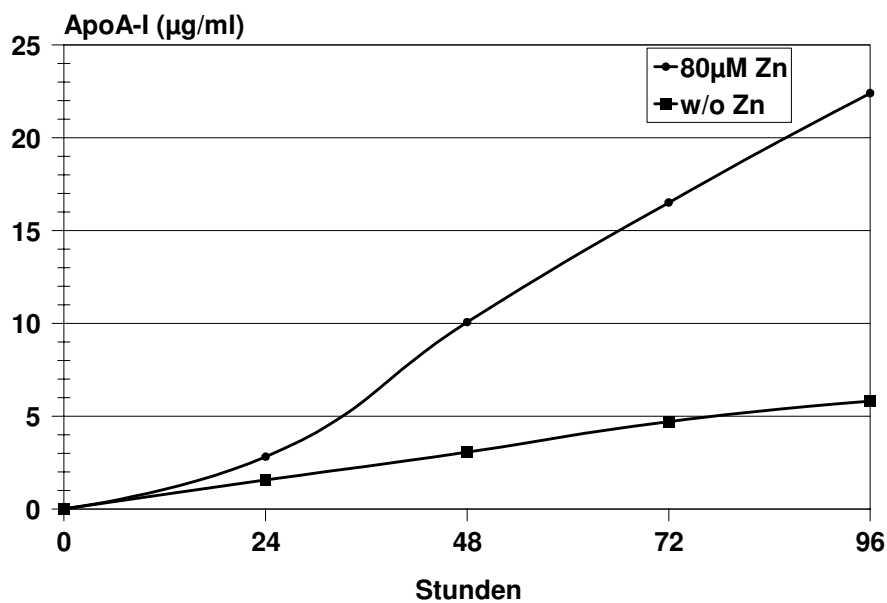


Abbildung 40: Verlauf der r-ApoA-I Expression über 96 Stunden Kultivierungsdauer mit und ohne Zinkinduktion

Abbildung 39 zeigt den Verlauf der Vitalitätsprüfung. Zwischen dem induzierten und dem nicht-induzierten Ansatz waren hinsichtlich der Lebensfähigkeit der Zellen keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen. Ersichtlich wurde aber auch, daß nach 72 Stunden Kulturdauer die Vitalität der Zellen absank. Es resultierte auch hier eine optimale Kultivierungsdauer von 72 Stunden (vergleiche Abbildung 38). Abbildung 40 illustriert die r-ApoA-I Expression im induzierten und nicht-induzierten Ansatz. Deutlich ist der Unterschied hinsichtlich der r-ApoA-I Konzentration mit und ohne Zinkinduktion zu erkennen. Während beim nicht-induzierten Ansatz eine ApoA-I Konzentration von 6 µg/ml erreicht wurde, stieg der Wert für den induzierten Ansatz auf 22 µg/ml nach 96 Stunden Kultivierungsdauer.

### 3.1.3 Expression von r-ApoA-I mit der MiniPerm®

Die MiniPerm® ist ein hervorragendes System, möglichst viele Zellen auf einem relativ kleinen Raum zu kultivieren und dabei eine optimale Versorgung der Zellen über einen langen Zeitraum zu garantieren. Bei der Anwendung zur Expression von rekombinantem Apolipoprotein A-I sollte versucht werden, auf diese Weise möglichst viel rekombinantes Protein im Produktionsmodul anzureichern und somit die Ausbeute erheblich zu erhöhen.

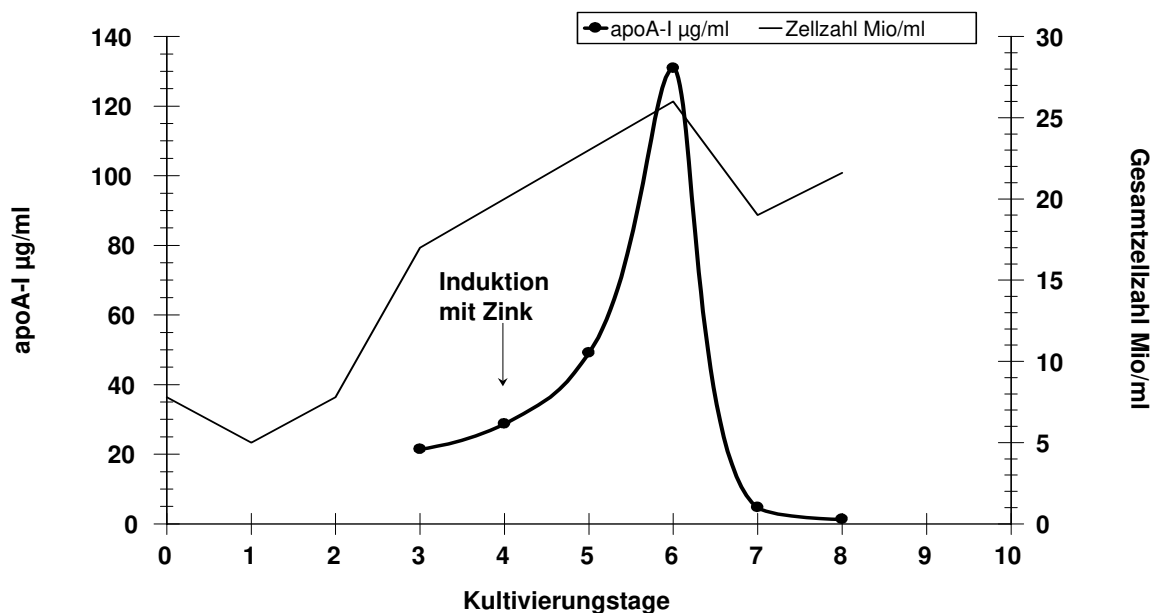


Abbildung 41: Expression von r-ApoA-I mit der MiniPerm®

Abbildung 41 zeigt den Verlauf von Gesamtzellzahl sowie exprimierter Menge r-ApoA-I einer Kultivierung mit der MiniPerm<sup>®</sup> über 8 Tage mit dem Medium CHO-S-SFM II. Die ersten drei Tage wurde zur Anzucht der Zellen mit Medium ohne Zinkzusatz kultiviert. Am vierten Tag wurde im Versorgungsmodul das Medium gegen frisches Medium mit einer Zinkkonzentration von 80  $\mu\text{mol}$  ausgetauscht. Am 6. Tag der Kultivierung erreichten Zellzahl und r-ApoA-I Konzentration ein Maximum. Danach sank die r-ApoA-I Konzentration deutlich, während die Zellzahl annähernd konstant blieb. Während der Kultivierung wurden täglich Proben entnommen und mittels SDS-PAAGE mit anschließendem Westernblot analysiert.

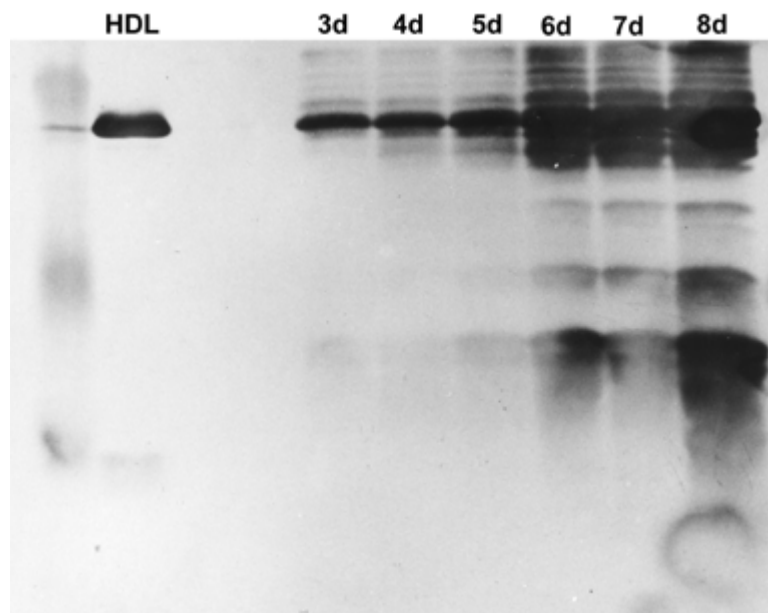


Abbildung 42: Immunoblot nach SDS-PAAGE der Proben zu verschiedenen Zeitpunkten bei Expression von r-ApoA-I mit der MiniPerm<sup>®</sup>

Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse des Westernblots. Deutlich zu erkennen ist der Anstieg der exprimierten Menge r-ApoA-I mit fortschreitender Kultivierungsdauer. Ebenso zu erkennen ist aber auch die Zunahme der Degradationsprodukte des r-ApoA-I mit zunehmender Kultivierungsdauer.

In einem nächsten Ansatz wurde die Kultivierung mit einer höheren Ausgangszellzahl begonnen und gleich zu Beginn der Kultivierung in der MiniPerm<sup>®</sup> mit 80  $\mu\text{mol}$   $\text{Zn}^{2+}$  induziert. Die Gesamtkultivierungsdauer betrug diesmal nur 4 Tage. Täglich wurden Proben entnommen, um Zellzahl und r-ApoA-I Gehalt zu messen und anschließend die Proben mittels Elektrophorese und Westernblot zu untersuchen.

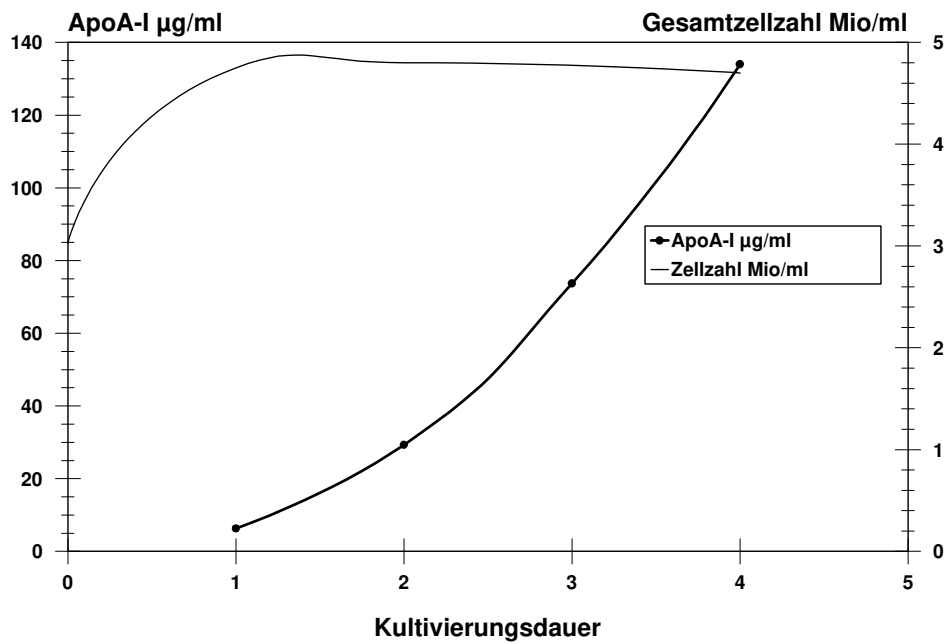


Abbildung 43: r-ApoA-I Konzentration während der Kultivierung mit der MiniPerm® über 96 Stunden, Induktion mit 80 µM Zink

Abbildung 43 zeigt den Verlauf von Zellzahl und exprimierter r-ApoA-I Menge. Über die 96 Stunden Expressionsdauer stieg die r-ApoA-I Konzentration kontinuierlich an, die Zellzahl war ab ca. 24 Stunden annähernd konstant.

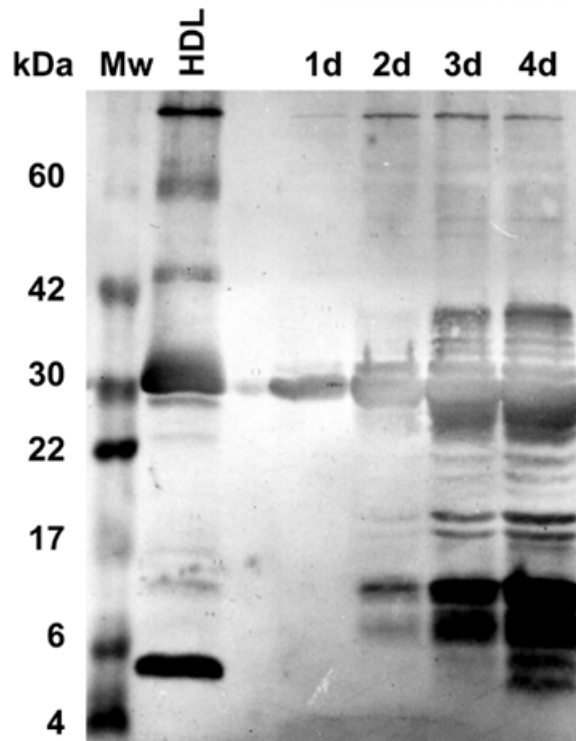


Abbildung 44: Westernblot nach SDS-PAAGE von Proben zu verschiedenen Zeitpunkten während der Kultivierung mit der MiniPerm® über insgesamt 96 Stunden, Induktion mit 80 µM Zink

In Abbildung 44 ist die Zunahme der exprimierten Menge an r-ApoA-I zu erkennen, jedoch ebenfalls deutlich zu sehen ist die Degradation des Expressionsproduktes bereits nach 24 Stunden.

Wegen der extremen Degradation des exprimierten r-ApoA-I, erschien die MiniPerm<sup>®</sup> als nicht geeignetes Verfahren zur Expression von rekombinanten ApoA-I und deshalb wurden keine weitere Expressionsversuche unternommen.

### 3.1.4 Proteaseinhibitoren

Der Abbau des rekombinanten Apolipoprotein A-I bzw. die Degradation während der Kultivierung und der nachfolgenden Anreicherung führte zu erheblichen Ausbeuteverlusten und erschwerte nachfolgende Untersuchungen. Aus diesem Grund wurde der Einfluß verschiedener Proteaseinhibitoren während der Expression des rekombinanten Proteins untersucht. Dazu wurden CHO<sub>ApoA-I<sub>WT</sub></sub>-Zellen in 6-Well Platten kultiviert. Bei 80% Konfluenz wurden alle Zellen auf serumfreie Bedingungen umgesetzt und mit Zink zur Expression induziert. Je ein Proteaseinhibitor pro Ansatz wurde in unten beschriebener Konzentration zugesetzt (Tabelle 8). Bei der Wahl der Konzentration eines jeden Inhibitors wurden die Empfehlungen des Herstellers verwendet. Ein Teil der Ansätze blieb zur Kontrolle ohne Inhibitorzusatz (Blindwerte).

| Inhibitor               | Konzentration |
|-------------------------|---------------|
| Antipain Dihydrochlorid | 50 µg/ml      |
| Aprotinin               | 1 µg/ml       |
| Bestatin                | 40 µg/ml      |
| Chymostatin             | 10 µg/ml      |
| E64                     | 1 µg/ml       |
| EDTA                    | 0,2 mg/ml     |
| Leupeptin               | 0,5 µg/ml     |
| Pefabloc SC®            | 0,5 mg/ml     |
| Pepstatin               | 0,7 µg/ml     |
| Phosphoramidon          | 50 µg/ml      |

Tabelle 8: Konzentrationen der eingesetzten Proteaseinhibitoren

Nach 72 Stunden Kultivierungsdauer wurde in jedem Ansatz die r-ApoA-I Konzentration bestimmt und die Zellkulturüberstände mittels Westernblot auf Degradationsprodukte untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 und Abbildung 46 dargestellt.

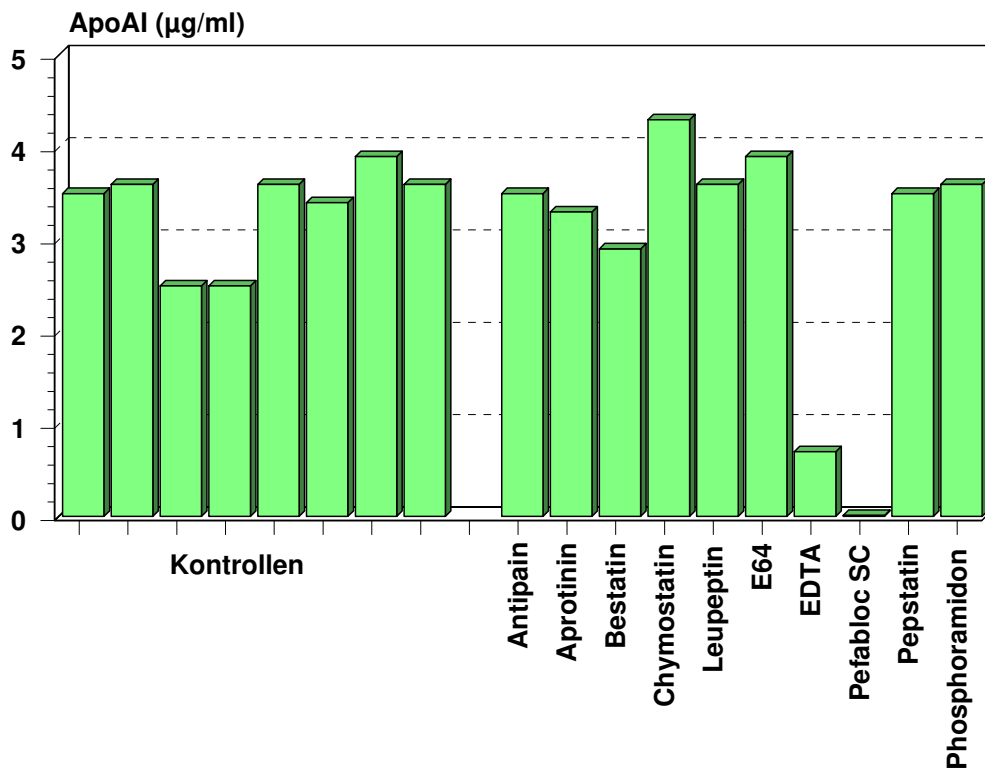


Abbildung 45: Einfluß von Proteaseinhibitoren bei der Expression von r-ApoA-I

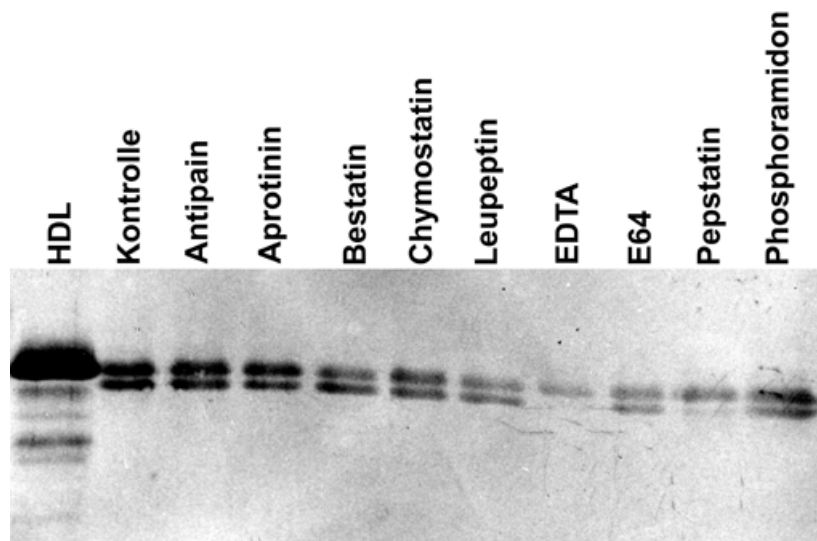


Abbildung 46: Immunoblot nach Kultivierung mit verschiedenen Proteaseinhibitoren

Auf die Konzentration des exprimierten r-ApoA-I hatte in diesem Ansatz keiner der Inhibitoren einen nennenswerten Einfluß. Verglichen mit den Kontrollen liegen die Konzentrationen innerhalb der normalen Schwankungen. Ausnahmen bilden hier der Inhibitor Pefabloc SC<sup>®</sup>, sowie der Inhibitor EDTA. Bei Inkubation mit Pefabloc SC<sup>®</sup> waren bereits nach 24 Stunden alle Zellen tot, somit konnte auch kein Protein exprimiert werden. EDTA ist ein Komplexbildner für zahlreiche Kationen und vermag sehr gut  $Zn^{2+}$  zu

komplexieren. Damit stand das Zink nicht mehr zur Induktion zur Verfügung, es resultierte eine geringe Menge exprimierten Proteins. Die Immunoblotanalyse zeigte demnach auch beim mit EDTA inhibierten Ansatz, aufgrund geringerer Konzentrationen, schwächere Banden. Im Immunoblot war ein positiver Einfluß beim Inhibitor Pepstatin zu erkennen. Hier schienen weniger Fragmente aufzutreten, als bei allen anderen Inkubationen.

Um den Einfluß der Proteaseinhibitoren genauer zu ermitteln, wurden in einem zweiten, ähnlichen Ansatz dieselben Proteaseinhibitoren eingesetzt, diesmal jedoch zur Abdeckung eines breiteren Spektrums in einer Verdünnungsreihe.

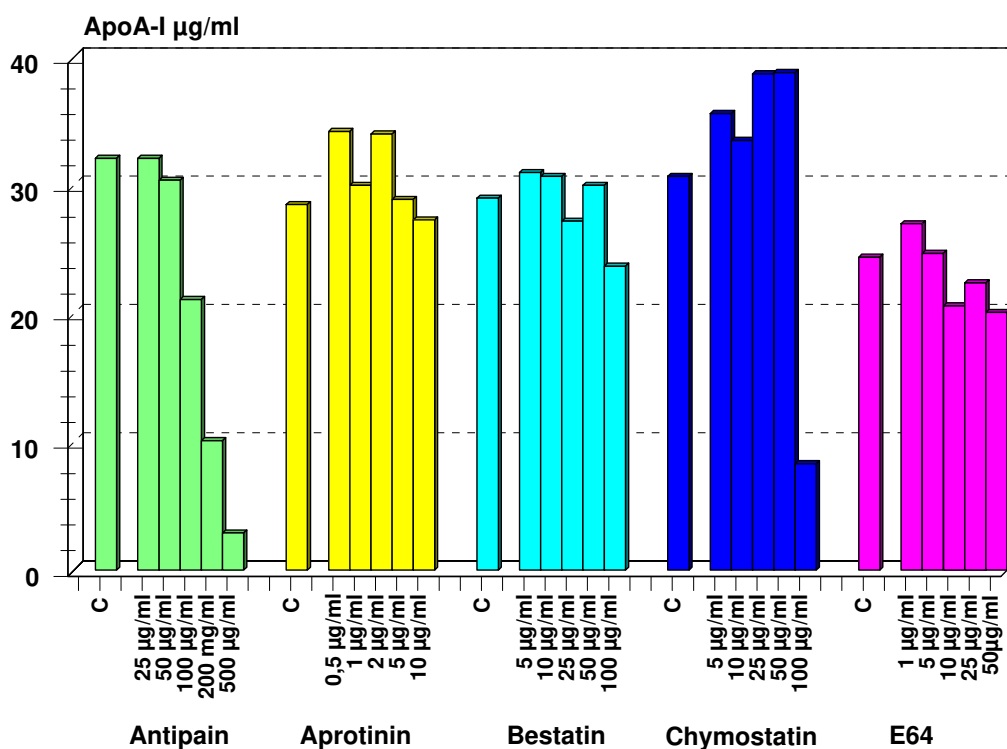


Abbildung 47: Einfluß verschiedener Proteaseinhibitoren auf die Expression von r-ApoA-I (Teil 1). (C: Kontrollen ohne Inhibitor)



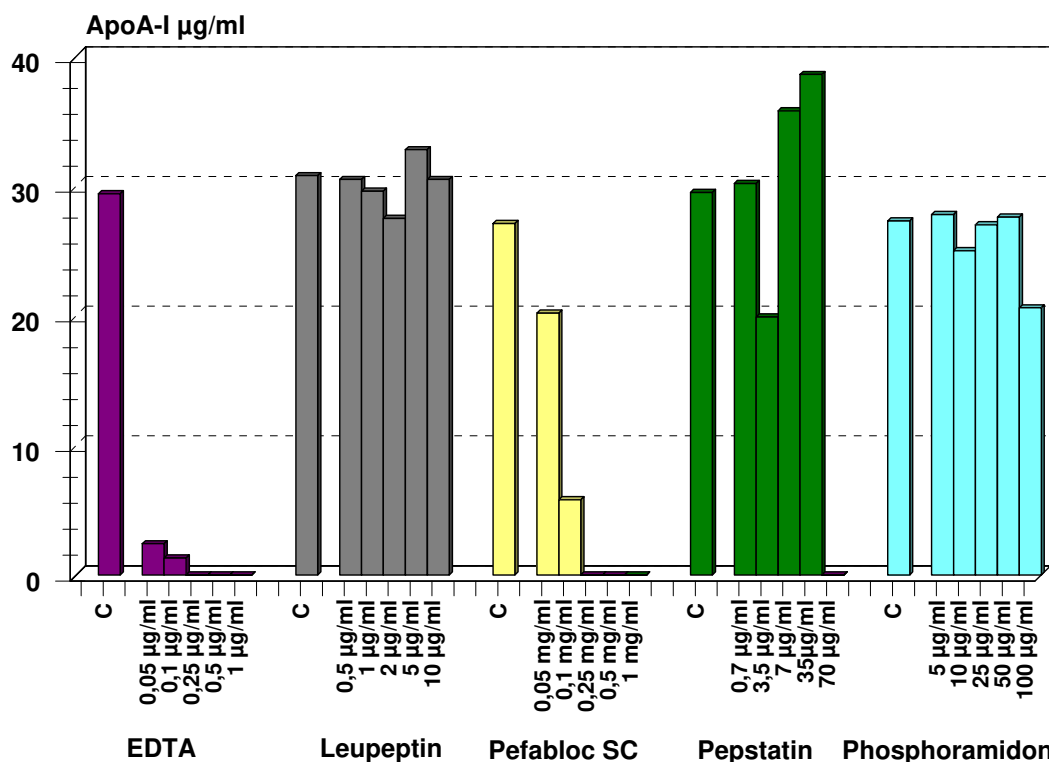


Abbildung 48: Einfluß verschiedener Proteaseinhibitoren auf die Expression von r-ApoA-I (Teil 2). (C: Kontrollen ohne Inhibitor)

Abbildung 47 und Abbildung 48 illustrieren die Expression von r-ApoA-I unter dem Einfluß verschiedener Proteaseinhibitoren, jeder mit einer speziellen Verdünnungsreihe. Verglichen mit den jeweiligen Kontrollwerten (nicht inhibiert; mit C bezeichnet) zeigten die Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin und Phosphoramidon keinen nennenswerten Einfluß auf die Expression von r-ApoA-I. Die Inhibitoren Antipain, Bestatin, E 64, EDTA und Pefabloc SC<sup>®</sup> zeigten mit steigender Konzentration einen negativen Einfluß auf die Expression. Ein positiver Einfluß auf die r-ApoA-I Expression war bei den Inhibitoren Chymostatin und Pepstatin zu beobachten. Alle Ansätze wurden hinsichtlich ihrer Degradation mittels SDS-PAAGE und anschließendem Westernblot analysiert. In allen Proben zeigten sich Fragmente von r-ApoA-I. Die einzige Ausnahme bildete der Inhibitor Pepstatin. Hier war zumindest eine deutliche Verminderung der Fragmentbildung zu erkennen (siehe Abbildung 49).

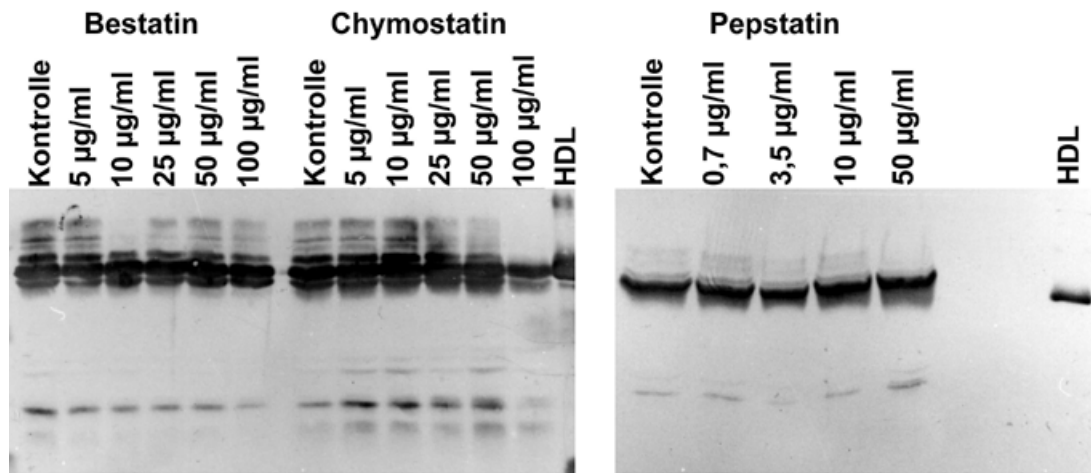


Abbildung 49: Immunoblotanalyse der Proteaseinhibitorenansätze mit Bestatin, Chymostatin und Pepstatin

In einem dritten Ansatz wurde der Inhibitor Pepstatin über einen erweiterten Konzentrationsbereich getestet.

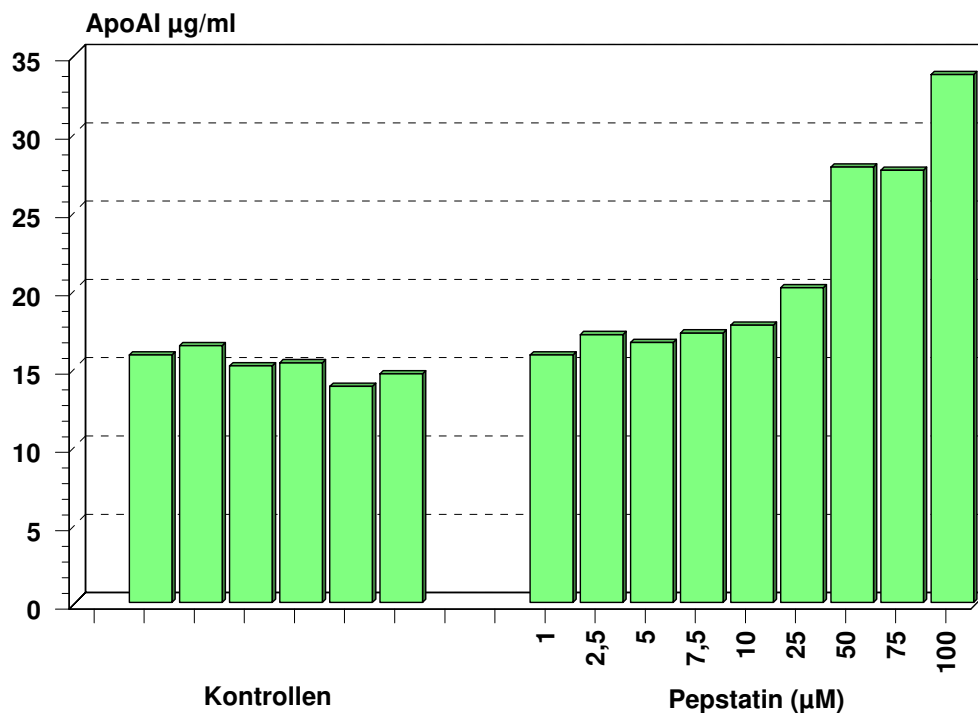


Abbildung 50: r-ApoA-I Expression unter Einfluss des Proteaseinhibitors Pepstatin

Die Graphik zeigt eine Zunahme der exprimierten r-ApoA-I Menge mit steigender Konzentration des Inhibitors. Eine Steigerung von über 100% war bei einer Konzentration von 100 µM Pepstatin im Ansatz zu beobachten.

Die Ergebnisse belegten, daß höhere Konzentrationen von Pepstatin im Kultivierungsmedium eine Steigerung der Expressionsrate bewirkten bzw. die Degradation des exprimierten Proteins verminderten.

## 3.2 Anreicherung und Isolierung von rekombinantem Apolipoprotein A-I

### 3.2.1 Chromatographische Methoden

#### 3.2.1.1 Gelfiltrationschromatographie

##### 3.2.1.1.1 Superose 6

Zur Auftrennung des konzentrierten Zellkulturüberstandes wurden 0,5 ml Konzentrat auf eine 1x30 cm Superose 6-Gelfiltrationssäule (Pharmacia) gegeben und mit verschiedenen Puffersystemen bei einer Flußrate von 0,3 ml/min eluiert (s. Methoden).

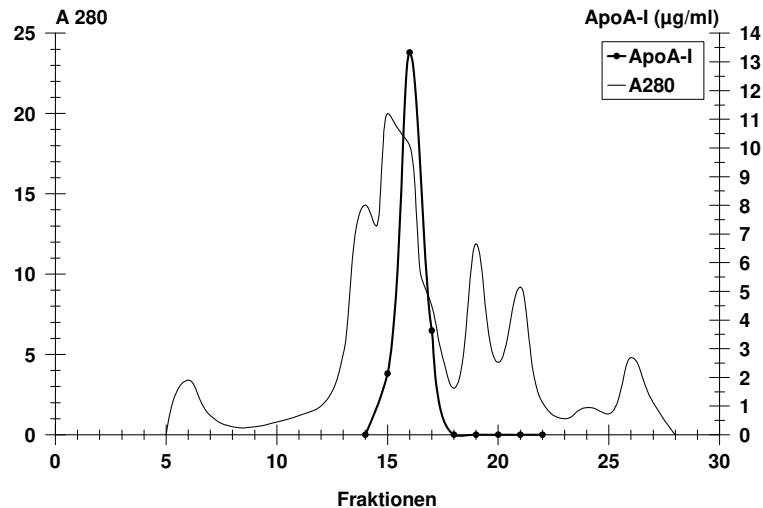


Abbildung 51: Auftrennung von Zellkulturüberstand mit einer Superose 6-Säule. Elution mit 10 mM Phosphat, 0,5 M NaCl, 1mM Na-Azid, 5 mM DTT, 1mM EDTA

Abbildung 51 zeigt das Elutionsprofil einer Gelfiltrationschromatographie mit einer Superose 6-Säule. Als Puffer wurden 10 mM Phosphat, 0,5 M NaCl, 1mM Na-Azid, 5 mM DTT, 1mM EDTA eingesetzt. Das r-ApoA-I eluierte hier in einer Schulter (Fraktion 16) des Hauptproteinpeaks (Fraktionen 13-17). Die Immunoblotanalyse der Fraktionen zeigte, daß die r-ApoA-I enthaltenden Fraktionen noch stark mit Albumin und anderen Proteinen verunreinigt waren.

Der Wechsel des Puffersystems zum Tris-Puffer mit und ohne DTT brachte keine Verbesserung der Trennung (DTT zur Lösung von Disulfidbrücken). Der Einsatz von Ethanol zur Erhöhung der Hydrophobizität des Elutionsmittels führte ebenfalls zu keiner Verbesserung.

| Methode                      | Anreicherungs-faktor | Ausbeute (%) | Nachteile   | Vorteile   |
|------------------------------|----------------------|--------------|---|--|
| Gelfiltration mit Superose 6 | 1-3                  | 60-70        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nachfolgender Konzentrierungs-schritt notwendig</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Einfache Methode</li> </ul> |

## 3.2.1.1.2 HiLoad Superdex 75

Als zweite Gelfiltrationssäule wurde eine HiLoad Superdex 75 (1,6 x 60 cm, Pharmacia) verwendet. Ein ml konzentrierter Zellkulturüberstand wurde auf die Säule geladen und bei einer Flußrate von 0,4 ml/min mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,9 eluiert.

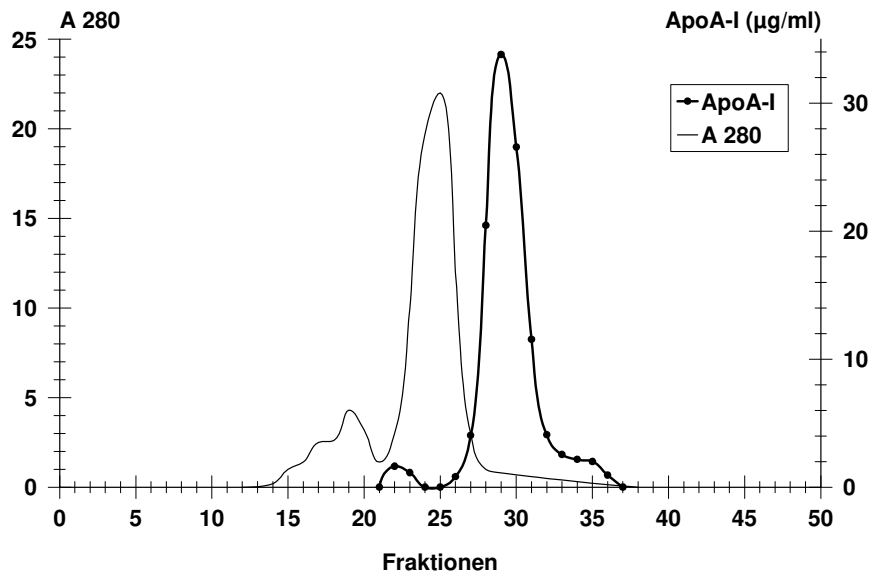


Abbildung 52: Auftrennung von Zellkulturüberstand mit einer HiLoad Superdex 75 Säule. Elution mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,9

Abbildung 52 zeigt das Elutionsprofil einer HiLoad Superdex 75 Säule. Das r-ApoA-I (Fraktionen 27-37) eluierte hier deutlich nach dem Hauptproteinpeak (Fraktionen 21-27). Auffällig war, daß das r-ApoA-I als scharfer Peak (Fraktionen 27-32) mit einer tiefen Schulter (Fraktionen 32-37) eluierte. Bemerkenswert ist einer kleiner Peak (Fraktionen 21-24) zu Beginn des Hauptproteinpeaks, der ebenfalls r-ApoA-I haltig war.

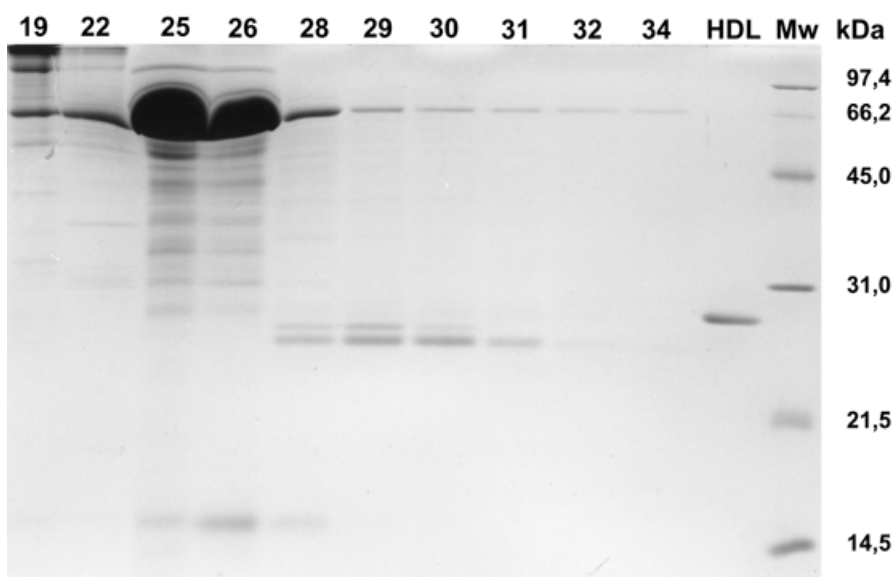


Abbildung 53: 15% SDS-PAAGE der Fraktionen der säulenchromatographischen Auftrennung von konzentriertem Zellkulturüberstand mit einer HiLoad Superdex 75 Säule

Abbildung 53 zeigt ausgewählte Fraktionen der FPLC (Abbildung 52), die mittels 15% SDS-PAAGE analysiert wurden. Fraktion 19 enthielt ein hochmolekulares Protein entsprechend dem ersten Peak im Elutionsprofil. Der Hauptproteinpeak bestand im wesentlichen aus einem Protein mit einem Molekulargewicht, entsprechend dem des Albumin (Fraktionen 25 und 26). Im Anschluß daran folgten die r-ApoA-I enthaltenden Fraktionen (28-31). Diese Ergebnisse wurden durch den Westernblot bestätigt. Der Westernblot zeigte eine immunreaktive Doppelbande des r-ApoA-I in Fraktion 22. Die Fraktionen 28-30 wiesen ein Banden-Triplett auf, in welchem die beiden unteren Banden stärker ausgeprägt waren. Die oberste, schwächste Bande lag auf der Höhe der 28 kDa Bande des HDL-ApoA-I, die Banden darunter wiesen ein geringeres Molekulargewicht auf. Die Fraktionen 31-34 zeigten nur noch eine einzelne immunreaktive Bande mit einem Molekulargewicht deutlich unter 28 kDa.

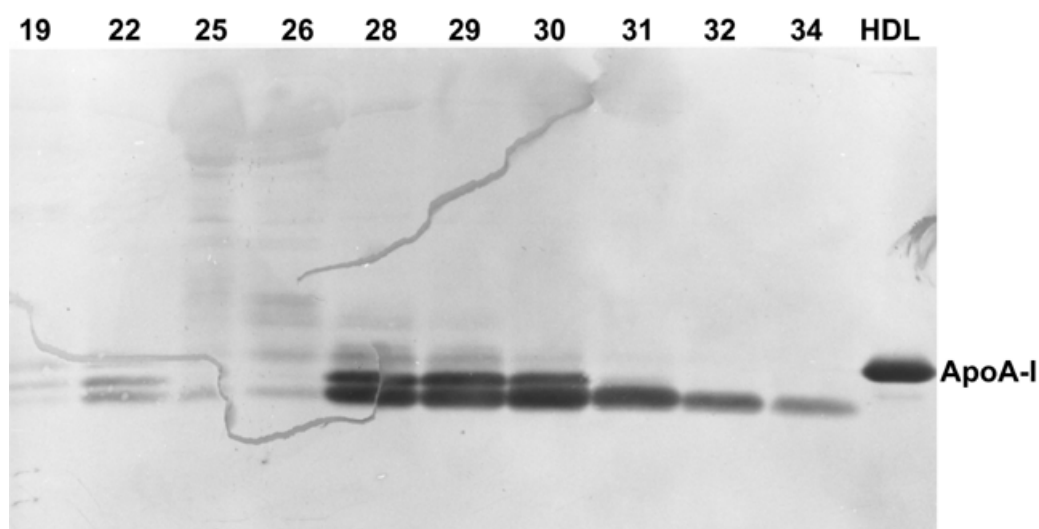


Abbildung 54: Immunoblot nach 15% SDS-PAAGE der Fraktionen der säulenchromatographischen Auftrennung von konzentriertem Zellkulturüberstand mit einer HiLoad Superdex 75 Säule

| Methode                              | Anreicherungsfaktor | Ausbeute (%) | Nachteile   | Vorteile   |
|--------------------------------------|---------------------|--------------|---|--|
| Gelfiltration mit HiLoad Superdex 75 | 2-6                 | 70-80        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Fragmentierung des r-ApoA-I</li> <li>Nachfolgender Konzentrierungsschritt notwendig</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Einfache Methode</li> </ul> |

### 3.2.1.2 Ionenaustauschchromatographie

Als Anionenaustauscher-Säule wurde eine HR 10/2-Leersäule (2x10 cm; Pharmacia), gefüllt mit dem Anionenaustauschermaterial Macro Prep High Q-Anion-Exchange (BioRad), verwendet. Die Säule wurde mit 20 mM Tris-HCl; pH 8,3 equilibriert. 1,0 ml konzentrierter Zellkulturüberstand wurden auf die Säule gegeben und mit einer Flußrate von 1ml/min und einem diskontinuierlichen Gradienten eluiert. (Puffer B: 20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl; pH 8,3).

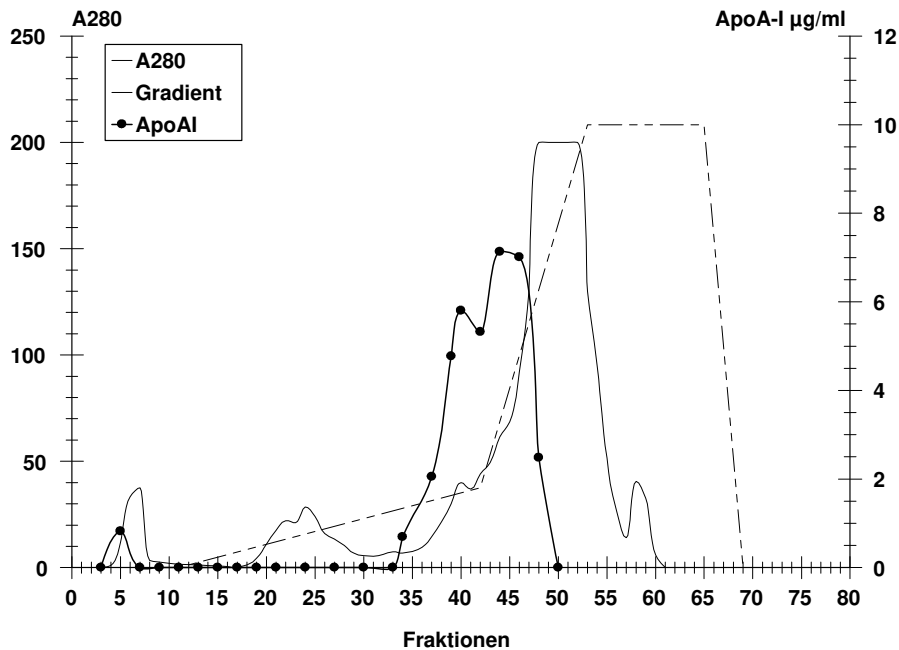


Abbildung 55: Elutionsprofil der Macro Prep High Q nach Auftrennung von konzentriertem Zellkulturüberstand mit einem diskontinuierlichen Salz-Gradienten

Das Elutionsprofil der Macro Prep High Q (Abbildung 55) zeigt den r-ApoA-I Peak (Fraktionen 34-50) zu Beginn des Hauptprotein-Peaks (Fraktionen 41-57). Auffällig war hier die Aufspaltung des r-ApoA-I Peaks in einen Doppelpeak (Fraktionen 34-41 und Fraktionen 42-50). Auffällig war ebenfalls die breite Verteilung des ApoA-I über mehr als 15 Fraktionen. Abbildung 56 zeigt die Elektrophorese (A) und den Westernblot (B) ausgewählter Fraktionen. In den Fraktionen 37-44 war eine Doppelbande des r-ApoA-I zu erkennen, wobei in den Fraktionen 37-40 die untere Bande, in Fraktion 44 die obere Bande den größeren Anteil ausmachte.

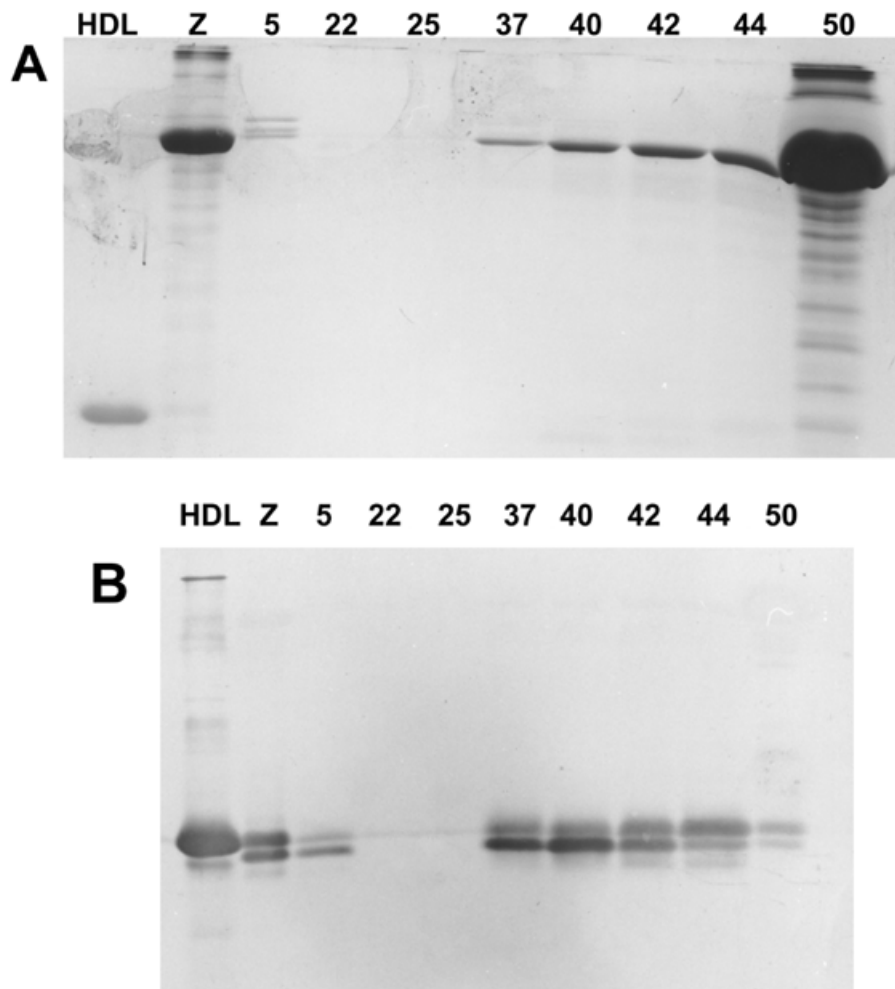


Abbildung 56: **A:** 15% SDS-PAAGE der Fraktionen des Elutionsprofils der Macro Prep High Q nach Auftrennung von konzentriertem Zellkulturüberstand mit einem diskontinuierlichen Salz-Gradienten **B:** Immunoblotanalyse. (Z: konzentrierter Zellkulturüberstand)

Zur Verbesserung der Auflösung der Anionenaustauschersäule wurde der Salzgradient variiert. Ein fein abgestimmter Stufengradient ermöglichte nun die Isolation einzelner Proteinpeaks. 2,0 ml konzentrierter Zellkulturüberstand wurden auf die Säule gegeben und mit einer Flußrate von 0,75 ml/min eluiert. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 57 dargestellt. Das r-ApoA-I eluierte hier als einzelner Peak in der 3. Stufe des Gradienten (17% Puffer B: 20 mM Tris-HCl, 1M NaCl pH 8,3).

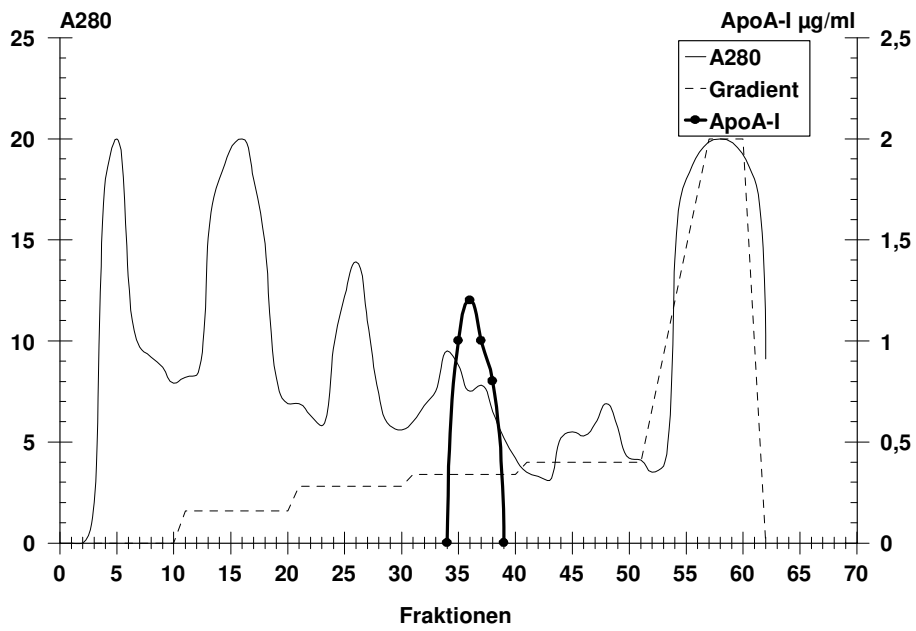


Abbildung 57: Elutionsprofil der Macro Prep High Q nach Auftrennung von konzentriertem Zellkulturüberstand mit einem Stufen-Salz-Gradienten

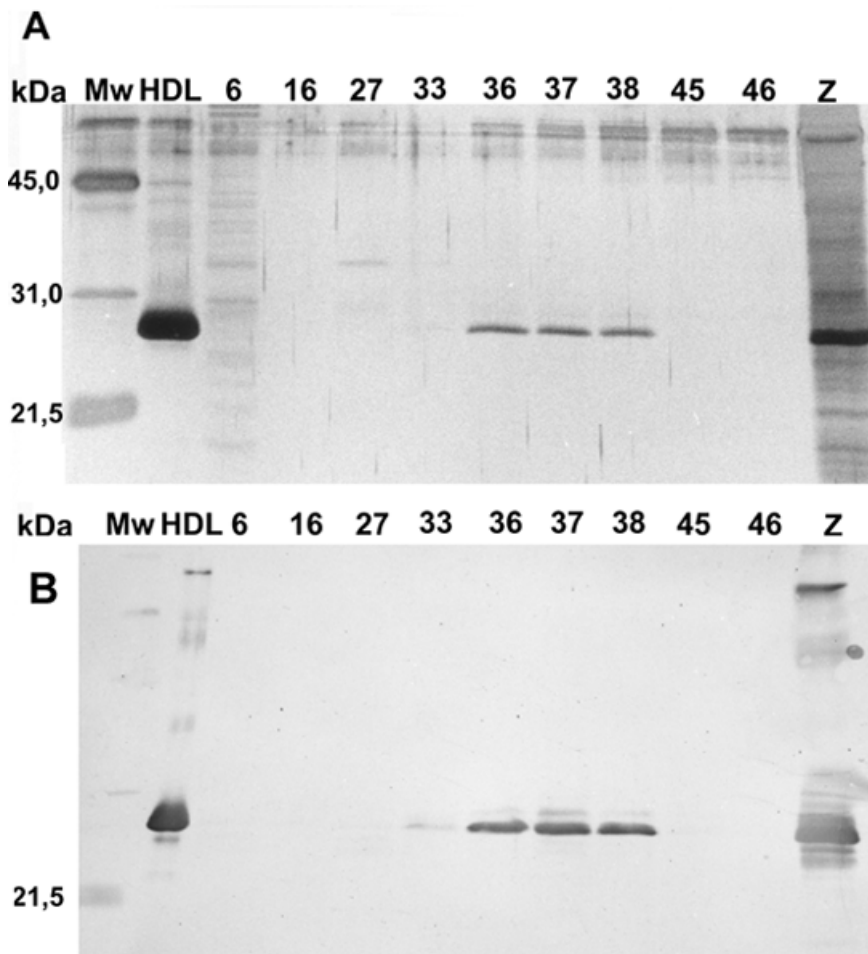


Abbildung 58: **A:** 15% SDS-PAAGE der Fraktionen des Elutionsprofils der Macro Prep High Q nach Auftrennung von konzentriertem Zellkulturüberstand mit einem Stufen-Salz-Gradienten nach Silberfärbung; **B:** Westernblot mit Immunfärbung; (Z: Konzentrierter Zellkulturüberstand)



Abbildung 58 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung ausgewählter Fraktionen aus Abbildung 57. Sowohl die Elektrophorese als auch der Westernblot zeigte eine einzelne, klare Bande des r-ApoA-I in den Fraktionen 36-38.

In Abbildung 59 ist derselbe FPLC-Lauf wie in Abbildung 57 dargestellt, nur daß hier fragmentiertes Ausgangsmaterial eingesetzt wurde. Das Elutionsprofil zeigte nun eine Verbreiterung und Aufspaltung des r-ApoA-I Peaks in drei kleinere Peaks (Fraktionen 38-46). Die Elution des r-ApoA-I begann hier bereits mit der zweiten Stufe des Gradienten (14% Puffer B).

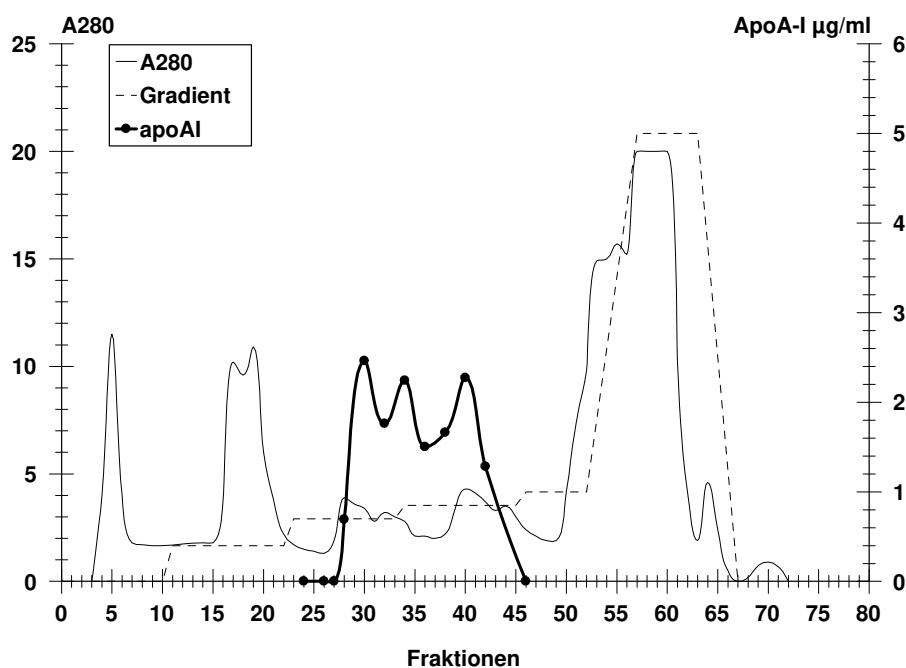


Abbildung 59: Elutionsprofil der Macro Prep High Q nach Auftrennung von konzentriertem Zellkulturüberstand mit Fragmenten mit einem Stufen-Salz-Gradienten

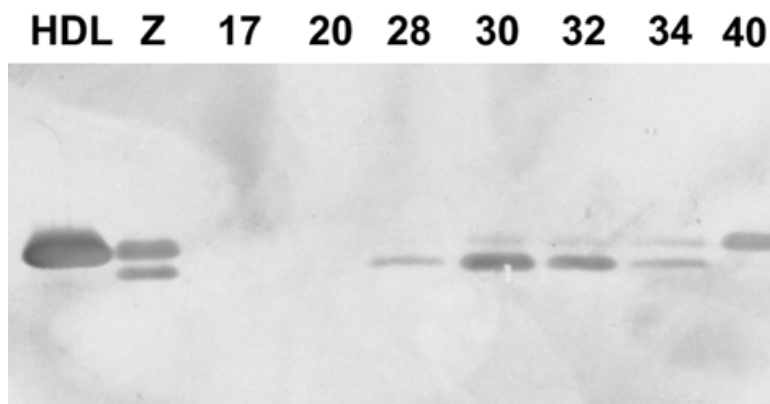


Abbildung 60: Westernblot nach SDS-PAAGE der Fraktionen des Elutionsprofil der Macro Prep High Q nach Auftrennung von konzentriertem Zellkulturüberstand mit Fragmenten mit einem Stufen-Salz-Gradienten

Der Westernblot zeigte im Ausgangsmaterial (Z) bereits zwei Banden des r-ApoA-I. In den Fraktionen 28-32 trat vermehrt die untere Bande auf, während in Fraktion 40 vermehrt die obere Bande zu finden war.

| <b>Methode</b>                 | <b>Anreicherungsfaktor</b> | <b>Ausbeute (%)</b> | <b>Nachteile</b>  | <b>Vorteile</b>  |
|--------------------------------|----------------------------|---------------------|---|--|
| Ionenaustausch-Chromatographie | 9-12                       | 15-50               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fragmentierung des r-ApoA-I</li> <li>• Entfernung der Salze notwendig</li> <li>• Nachfolgender Konzentrierungsschritt notwendig</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zeitsparende Methode</li> </ul> |

### 3.2.1.3 Affinitätschromatographie

Für die Affinitätschromatographie wurde Anti-human-ApoA-I gekoppelte Sepharose 4B in einer 3,5x6,7 cm Amicon-Säule verwendet. Die Säule wurde in 15 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5 equilibriert. 8,5 ml konzentrierter Zellkulturüberstand wurden auf die Säule geladen. Säule und Peristaltikpumpe wurde kurzgeschlossen und das Material zur besseren Adsorption mehrfach über die Säule laufen gelassen. Nach drei Zyklen wurde das System wieder geöffnet und bis zur vollständigen Entfernung aller nicht gebundenen Proteine mit Equilibrierungspuffer gespült. Anschließend wurde die Säule mit 0,1 M Essigsäure bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert. Das Elutionsprofil zeigte einen einzigen Peak (nicht dargestellt). Alle gesammelten Fraktionen dieses Peaks wurden auf ihren r-ApoA-I Gehalt mittels SDS-PAAGE und Westernblot untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 61 dargestellt.

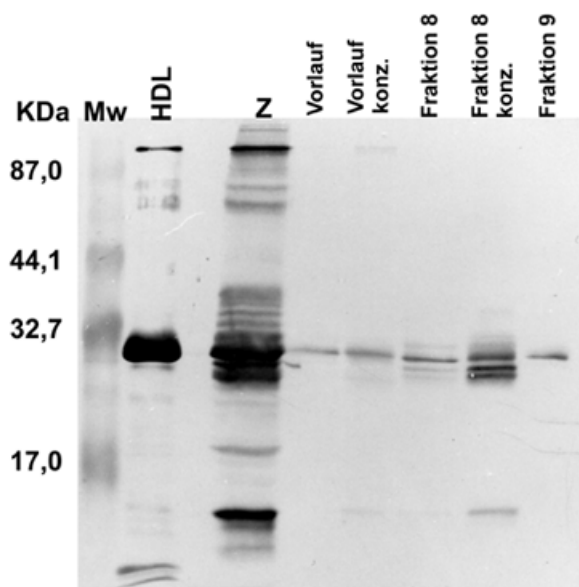


Abbildung 61: Westernblot nach Affinitätschromatographie mit Anti-h-ApoA-I-Sepharose, Elution mit 0,1 M HAc

Bereits im Eluat des Ausgangsmaterials (Vorlauf) war deutlich r-ApoA-I zu erkennen, welches nicht an die Säule gebunden wurde. Auch die Fraktionen des Elutionspeaks wiesen r-ApoA-I auf.

In einem weiteren Ansatz wurde die Säule wie oben beschrieben equilibriert, mit 10 ml Zellkulturüberstand beladen und über Nacht kurzgeschlossen. Nach der Entfernung aller nichtbindenden Proteine wurde die Säule mit 3 M NaSCN eluiert. Das Eluat wurde anschließend gegen 50 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer dialysiert und mittels Ultrafiltration konzentriert.

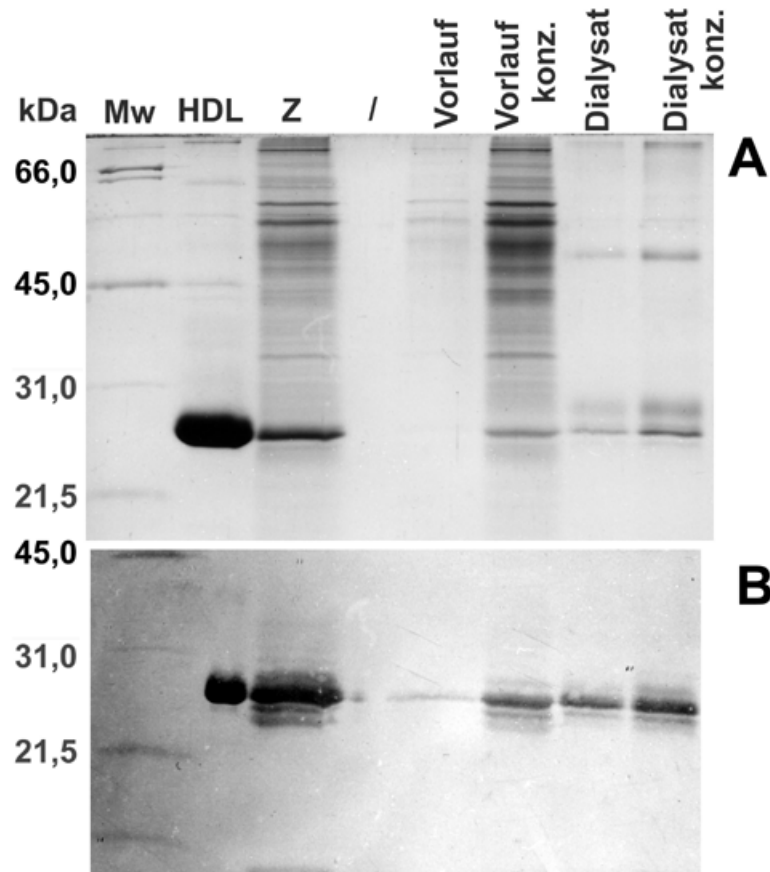


Abbildung 62: **A:** 15% SDS-PAAGE nach Anti-h-ApoA-I Affinitätschromatographie, Elution mit 3 M NaSCN; **B:** Westernblot zu A, (Z: konzentrierter Zellkulturüberstand)

Wie in Abbildung 61 sieht man auch in Abbildung 62 bereits deutliche Mengen r-ApoA-I im Vorlauf, was bedeutet, daß nicht alles Protein auf der Säule binden konnte. Im Dialysat befand sich auch r-ApoA-I. Zusätzlich fand man im Dialysat zwei weitere Banden oberhalb der r-ApoA-I Bande (ca. 30 und 50 kDa). Vermutlich handelte es sich hierbei um von der Säule eluierten Antikörper.

Die Methodik der Affinitätschromatographie wurde aufgrund sehr schlechter Ausbeuten und der nicht abzutrennenden Fragmente nicht weiter verfolgt.

| Methoden                   | Anreicherungsfaktor | Ausbeute (%) | Nachteile  | Vorteile  |
|----------------------------|---------------------|--------------|--|---|
| Affinitäts-Chromatographie | 45-55               | 35-55        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Verlust der Kapazität der Säule</li> <li>Entfernung des Elutionsmittels HAC bzw. NaSCN</li> <li>Nachfolgender Konzentrierungsschritt notwendig</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Spezifische Methode</li> </ul> |

### 3.2.1.4 Reversed Phase Chromatographie

Für die Reversed Phase Chromatographie wurde das Material Source<sup>TM</sup> 15 RPC (Pharmacia) in einer HR 16/10-Säule (Pharmacia) gepackt. (Säulendimensionen: 9,4 x 2 cm<sup>2</sup>; 19 ml). Die Säule wurde in 10% Methanol, 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) equilibriert. Zur Chromatographie wurden 1 ml konzentrierter Zellkulturüberstand auf eine Konzentration von 10% Methanol und 0,1% TFA eingestellt und auf die Säule geladen. Bei einer Flußrate von 1 ml/min und einem linearen Gradienten (Puffer B: 95% Methanol, 0,1% TFA) wurden die Proteine von der Säule eluiert und 1,5 ml Fraktionen gesammelt. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 63 dargestellt.

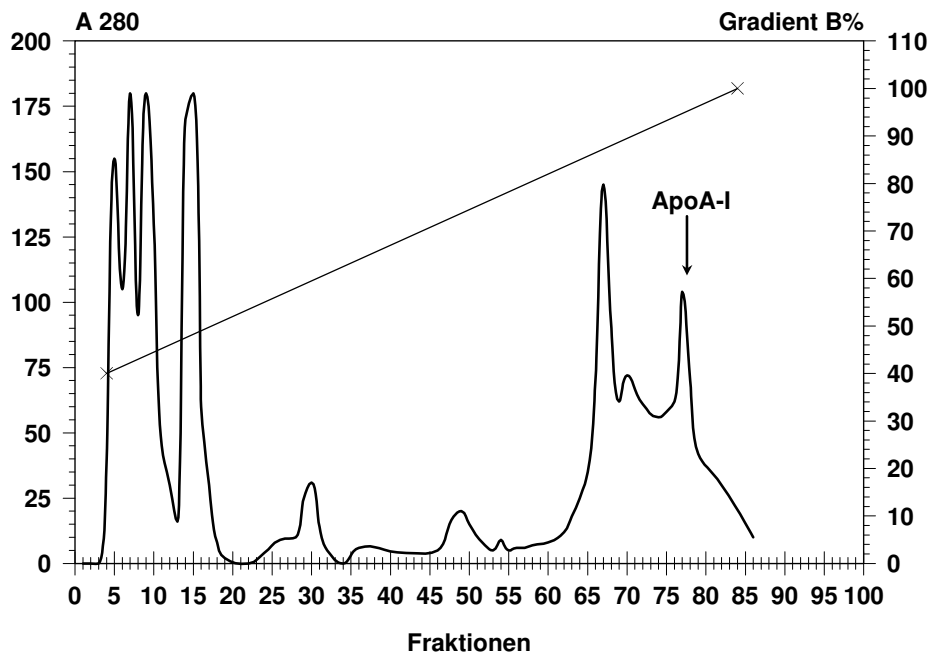


Abbildung 63: Auftrennung von konzentriertem Zellkulturüberstand mit Reversed Phase Chromatographie, Elution mit Methanol / Wasser

r-ApoA-I eluierte mit dem letzten Peak (Fraktionen 76-79) bei einer Konzentration des Puffers B von 96%. Die Aufspaltung des letzten Peaktriplets war nur unvollständig. In Abbildung 64 sind ausgewählte Fraktionen mittels SDS-PAAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert. Die r-ApoA-I enthaltenden Fraktionen waren noch stark mit höhermolekularen Proteinen verunreinigt.

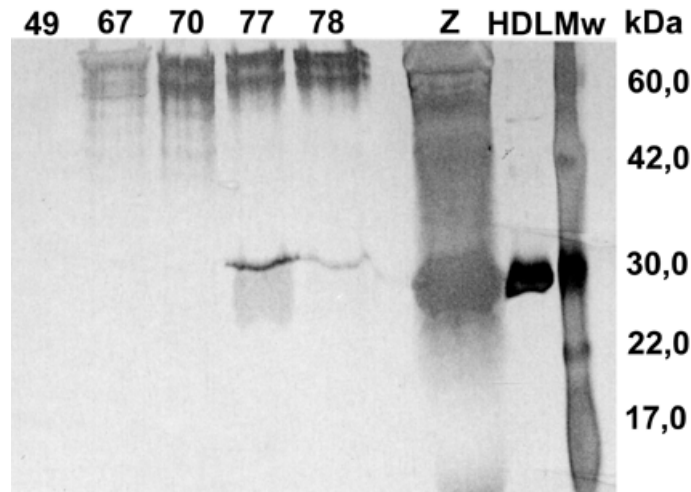


Abbildung 64: 15% SDS-PAAGE (Silberfärbung) einzelner Fraktionen nach Auftrennung von konz. Zellkulturüberstand mit Reversed Phase Chromatographie, Elution mit Methanol / Wasser

In einem weiteren Ansatz wurde das etwas unpolare Elutionsmittel 2-Propanol eingesetzt. Die Säule wurde in 10% 2-Propanol; 0,1% TFA equilibriert, mit 1 ml konzentriertem Zellkulturüberstand beladen und mit einer Flußrate von 1,5 ml/min eluiert. (Puffer B: 95% 2-Propanol; 0,1% TFA). 1,5 ml Fraktionen wurden gesammelt.

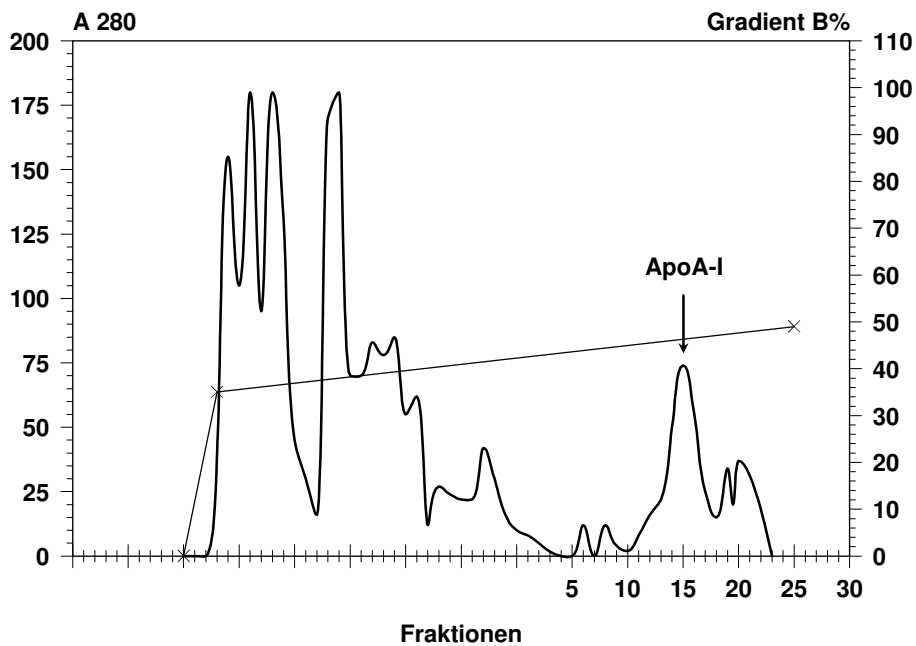


Abbildung 65: Auftrennung von konzentriertem Zellkulturüberstand mit Reversed Phase Chromatographie, Elution mit 2-Propanol / Wasser

Abbildung 65 zeigt das Elutionsprofil dieser Chromatographie. r-ApoA-I eluierte hier als fast isolierter Peak (Fraktionen 13-17) bei einer Konzentration von 47% Puffer B. Ausgewählte Fraktionen wurden mittels SDS-PAAGE und anschließender Silberfärbung bzw. Westernblot analysiert. Die r-ApoA-I enthaltenden Fraktionen (14-16) waren noch schwach mit höhermolekularen Proteinen verunreinigt.

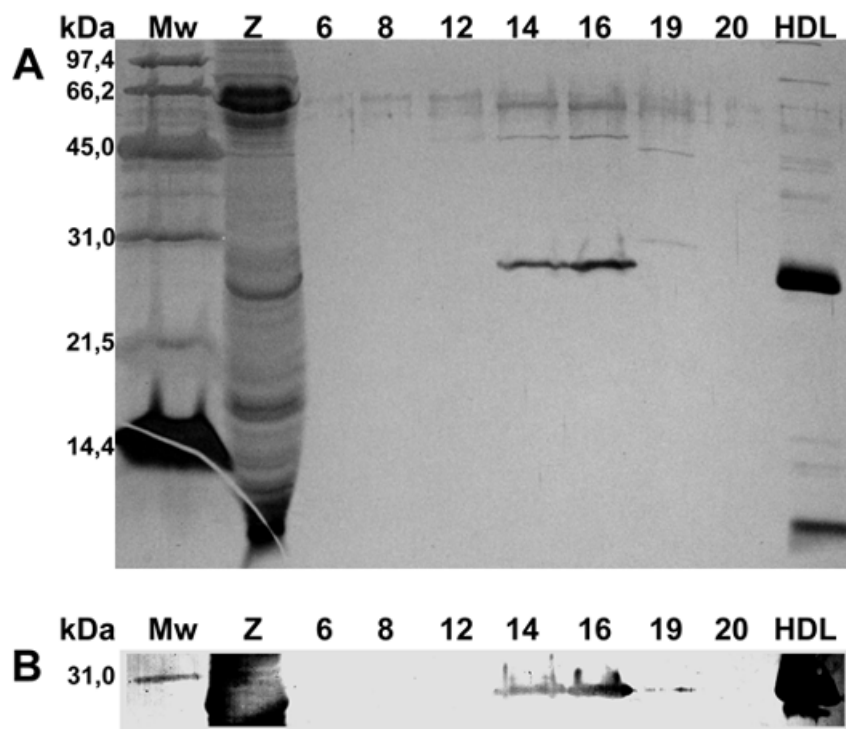


Abbildung 66: **A:** 15% SDS-PAAGE (Silberfärbung) einzelner Fraktionen nach Auftrennung von konz. Zellkulturüberstand mit Reversed Phase Chromatographie, Elution mit 2-Propanol / Wasser, **B:** Westernblot

In einem dritten Ansatz wurde Acetonitril als Elutionsmittel verwendet. Die Säule wurde in 10% Acetonitril, 0,1% TFA equilibriert. 1 ml konzentrierter Zellkulturüberstand wurde auf die Säule gegeben und mit einer Flußrate von 1 ml/min eluiert (Puffer B: 95% Acetonitril; 0,1% TFA). Das Elutionsprofil ist in Abbildung 67 dargestellt.

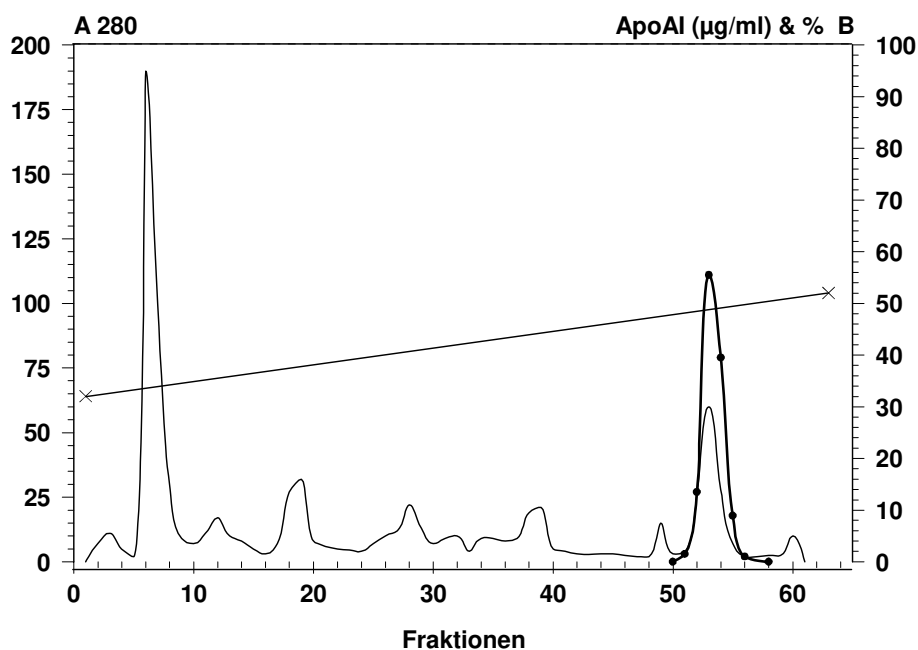


Abbildung 67: Auftrennung von konzentriertem Zellkulturüberstand mit Reversed Phase Chromatographie, Elution mit Acetonitril / Wasser

Das r-ApoA-I eluierte hier als isolierter Peak (Fraktionen 52-55) bei einer Konzentration von 50% Puffer B. Ausgewählte Fraktionen wurden mittels SDS-PAAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Die r-ApoA-I enthaltenden Fraktionen (52-54) enthielten so gut wie keine anderen Proteinverunreinigungen.

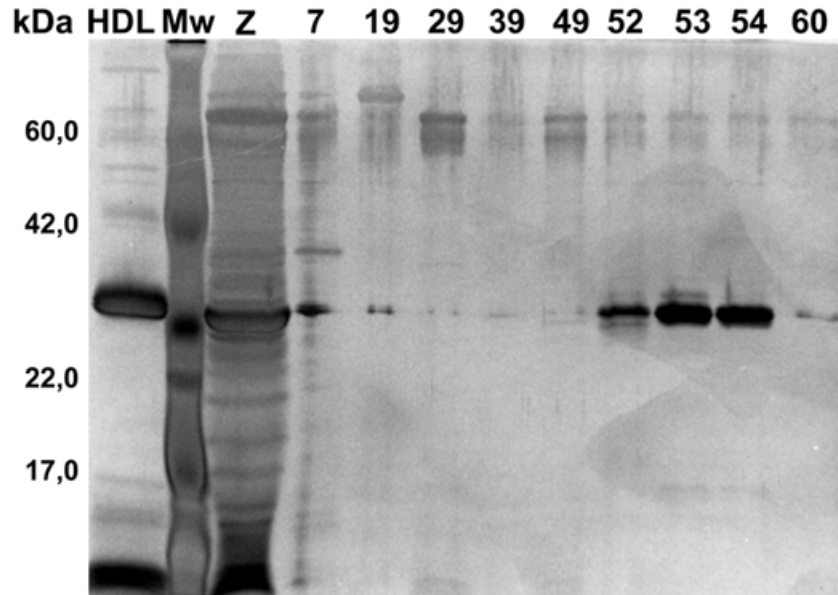


Abbildung 68: 15% SDS-PAAGE (Silberfärbung) einzelner Fraktionen nach Auftrennung von konz. Zellkulturüberstand mit Reversed Phase Chromatographie, Elution mit Acetonitril / Wasser

| Methode                        | Anreicherungsfaktor | Ausbeute (%) | Nachteile  | Vorteile   |
|--------------------------------|---------------------|--------------|--|--|
| Reversed Phase Chromatographie | 70-80               | 80-90        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Bei Verwendung von Acetonitril: Toxizität des Lösungsmittels</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Zeitsparende Methode</li> <li>Leichte Entfernung der Lösungsmittel durch anschließende Gefriertrocknung der Fraktionen</li> </ul> |



### 3.2.2 Elektrophoretische Methoden

#### 3.2.2.1 Elektroelution

Zur Aufreinigung von r-ApoA-I mittels präparativer SDS-Gelelektrophorese wurde konzentrierter Zellkulturüberstand 2:1 mit Probenpuffer versetzt und auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Detektion der Banden wurden die Seitenstreifen des Polyacrylamidgels mit Coomassie angefärbt. Die r-ApoA-I Banden wurden ausgeschnitten und im Elektroeluter für 4 Stunden bei 4°C und konstantem Stromfluß eluiert. Anschließend wurden die Eluate gegen 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  dialysiert.

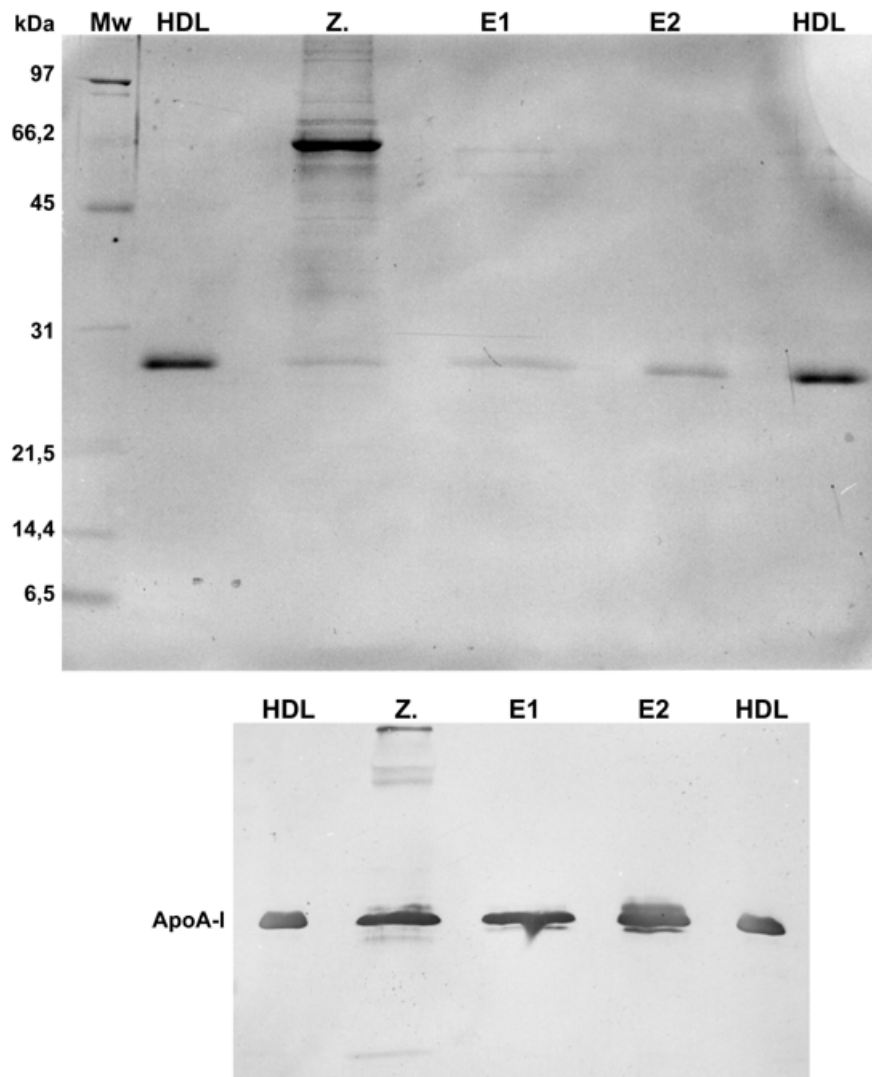


Abbildung 69: r-ApoA-I aufgereinigt mittels präparativer SDS-PAAGE und Elektroelution (oben: SDS-PAAGE, unten: Westernblot)

Abbildung 69 zeigt aufgereinigte Proben von r-ApoA-I nach Elektroelution. Der konzentrierte Zellkulturüberstand ist mit Z bezeichnet, E1 und E2 stehen für zwei verschiedene aufgereinigte r-ApoA-I Proben.

Im Westernblot waren beim Zellkulturüberstand und bei E1 jeweils nur eine Bande zu sehen, während E2 mehrere immunreaktive Banden aufwies.

| Methoden   | Anreicherungs-faktor | Ausbeute (%) | Nachteile   |
|--|----------------------|--------------|---|
| präparative SDS-Gelelektrophorese mit Elektroelution | 8-15                 | 50-70        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• zeitaufwendige Methode</li> <li>• Fragmente während der Elektroelution</li> <li>• vollständige Entfernung des SDS notwendig</li> </ul> |

### 3.2.2.2 Modell 491 PrepCell®

Zur präparativen Elektrophorese mit der Modell 491 PrepCell® wurde ein 12%iges, 4,5 cm hohes Trenngel im Zylinder der PrepCell® gegossen (innerer Durchmesser 28 mm). Das Trenngel wurde mit einem 0,5 cm hohen 3,5%igen Sammelgel überschichtet. 1,2 ml konzentrierter Zellkulturüberstand wurden mit 0,6 ml Probenpuffer vermischt, erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 300 V, 50 mA und 12 W für 6 Stunden betrieben. Der Elutionspuffer wurde mit einer Flußrate von 0,8 ml/min durch das System gepumpt. Nachdem die Bromphenolblaubande das Ende des Zylindergels erreicht hatte, wurden 3 ml Fraktionen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel mit nachfolgender Silberfärbung analysiert.

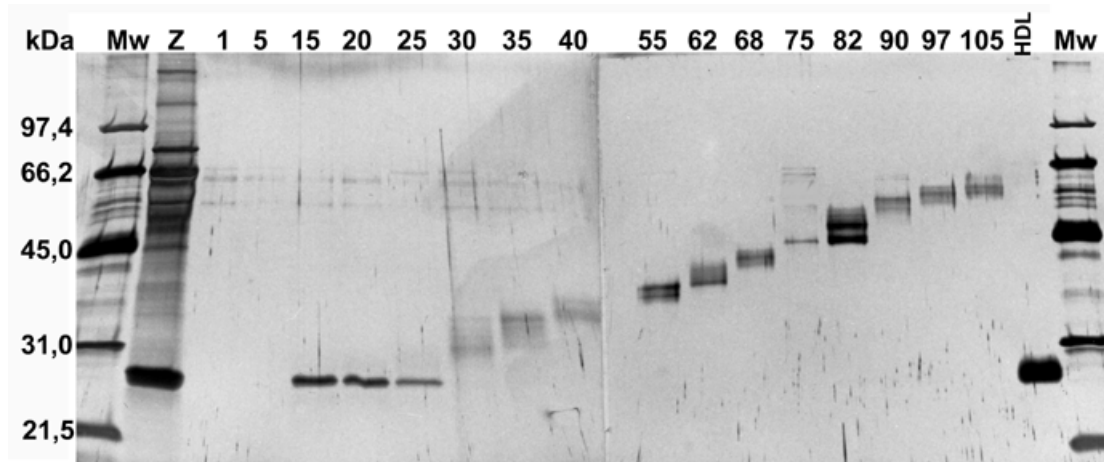


Abbildung 70: 15% SDS-PAAGE mit Silberfärbung der Fraktionen nach Auftrennung von Zellkulturüberstand mit der PrepCell®

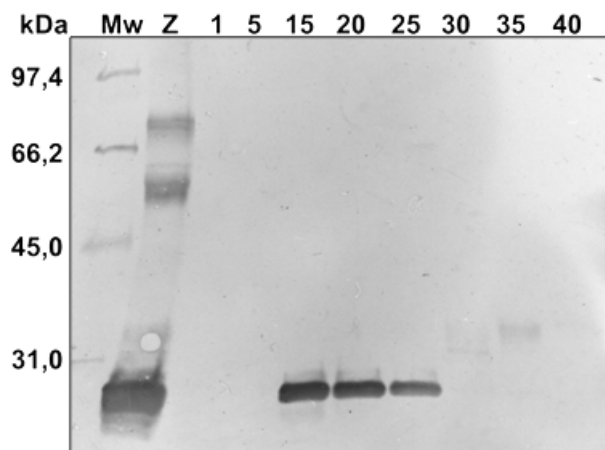


Abbildung 71: Westernblot nach 15% SDS-PAAGE der Fraktionen nach Auftrennung von Zellkulturüberstand mit der PrepCell®

Abbildung 70 zeigt die stufenweise Auftrennung der Proteine nach der präparativen Elektrophorese. r-ApoA-I befindet sich in den Fraktionen 15-25. Der Westernblot (Abbildung 71) bestätigt diese Ergebnisse und zeigt eine einzelne immunreaktive Bande in diesen Fraktionen.

Im weiteren Ansatz sollte die Auflösung der präparativen Elektrophorese durch Verlängerung der Trennstrecke noch verbessert werden, um zu testen, ob sich Fragmente des r-ApoA-I abtrennen lassen. Dazu wurden ein 5,2 cm hohes Trenngel (12%) und ein 0,7 cm hohes Sammelgel (3,5%) im 28 mm ID-Tube der PrepCell® vorbereitet. Ein ml Probenmischung mit Fragmenten wurden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Sobald die Bromphenolblaubande das Ende des Zylindergels erreicht hatte, wurden 3 ml Fraktionen gesammelt. Der Elutionspuffer wurde mit einer Flußrate von 0,73 ml/min durch das System gepumpt.

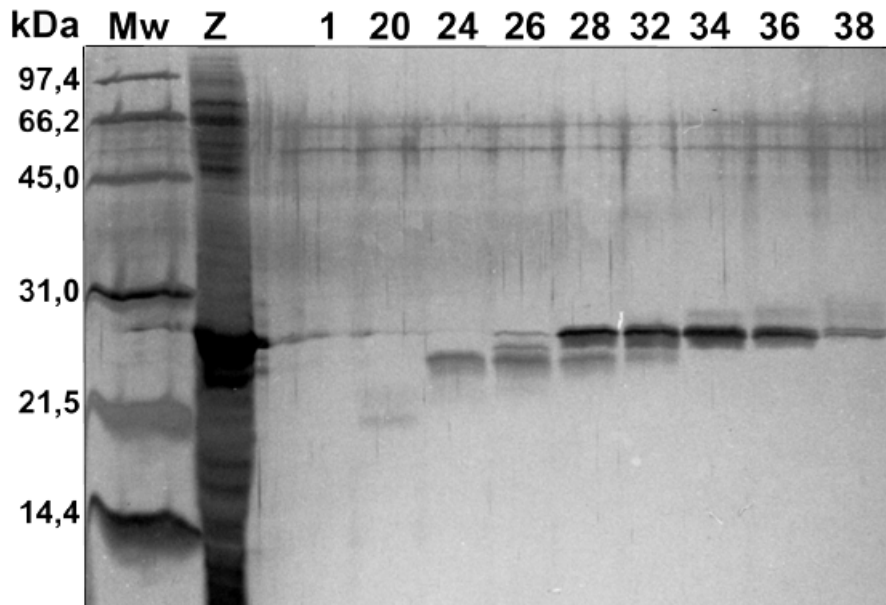


Abbildung 72: 15% SDS-PAAGE nach Silberfärbung einzelner Fraktionen nach Separation von r-ApoA-I Fragmenten mit der PrepCell®

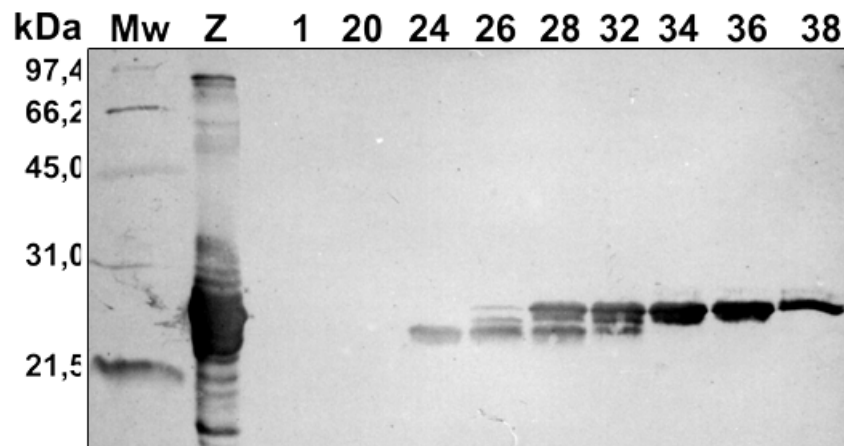


Abbildung 73: Westernblot nach 15% SDS-PAAGE einzelner Fraktionen nach Separation von r-ApoA-I Fragmenten mit der PrepCell®

Abbildung 72 und Abbildung 73 illustriert die Auftrennung von r-ApoA-I Fragmenten mit Hilfe der PrepCell®. In Fraktion 24 erkennt man eine isolierte, immunreaktive Bande eines r-ApoA-I Fragments mit einem Molekulargewicht von ca. 24-26 kDa. Ab Fraktion 26 erkennt man auch höhermolekulare Banden. Ab Fraktion 28 erscheint die 28 kDa Bande des intakten r-ApoA-I.

Zur Isolation weiterer Fragmente des r-ApoA-I wurde ein 4,8 cm hohes, 12%iges Trenngel in 37 mm ID-Tube der PrepCell® gegossen und mit einem 0,7 cm hohen

3,5%igen Sammelgel überschichtet. 2,5 ml Probenmischung wurden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 6 Stunden bei 12 W, 60 mA und 350 V durchgeführt. Der Elutionspuffer wurde mit 0,78 ml/min durch das System gepumpt. Nachdem die Bromphenolblaubande das Ende des Zylindergels erreicht hatte, wurden 3 ml Fraktionen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel mit anschließendem Westernblot analysiert.

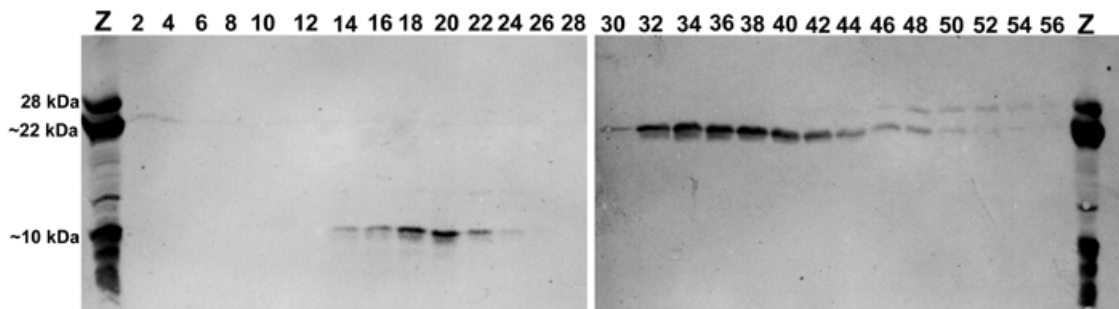


Abbildung 74: Westernblot nach 15% SDS-PAAGE. Abtrennung eines 22 kDa bzw. 10 kDa Fragments

In den Fraktionen 14-22 eluierte ein immunreaktives r-ApoA-I Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 10 kDa. In den Fraktionen 30-44 erschien ein ca. 22 kDa Fragment des r-ApoA-I. Ab Fraktion 46 eluierte das intakte 28 kDa r-ApoA-I. Die Fraktionen 14-22 sowie 30-44 wurden zusammengefaßt, gegen 20mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  dialysiert und anschließend für weitere Analysen lyophilisiert.

### 3.2.2.3 Analyse der r-ApoA-I Fragmente

#### 3.2.2.3.1 N-terminale Proteinsequenzierung

Die mit Hilfe der PrepCell<sup>®</sup> isolierten r-ApoA-I Fragmente wurden N-terminal ansequenziert. Dazu wurde ein automatisches Proteinsequenziergerät verwendet (Applied Biosystems Procise).

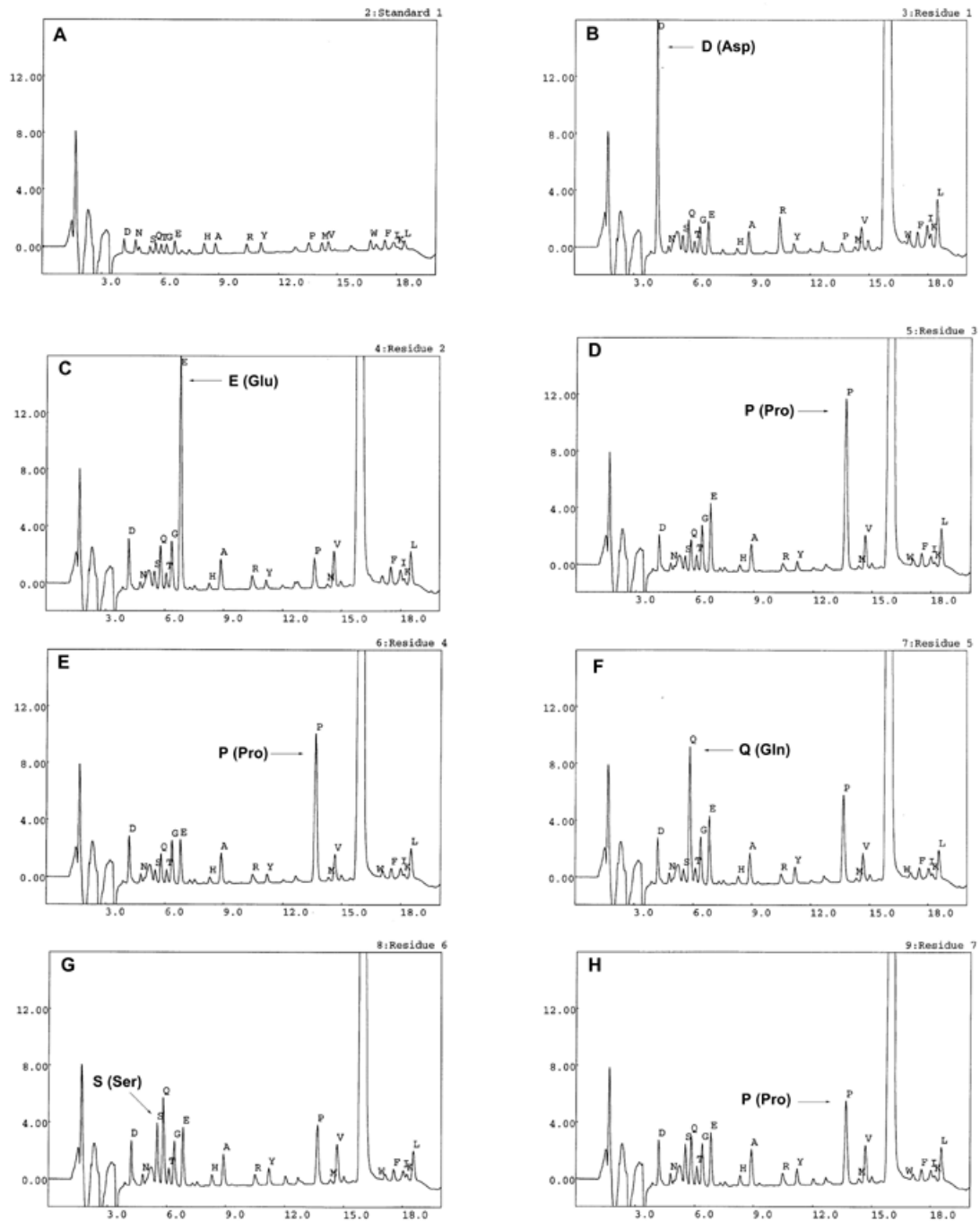


Abbildung 75: **A:** HPLC-Standardlauf, **B-H:** Identifizierung der ersten 7 Aminosäuren der N-terminalen Sequenz des 22 kDa Fragment von r-ApoA-I

Abbildung 75 zeigt die Identifizierung der Aminosäuren durch einzelne HPLC-Läufe nach Abspaltung der Aminosäure. Die Ergebnisse für die ersten 7 Aminosäuren sind hier dargestellt.

Für das 22 kDa Fragment ergab sich folgende N-terminale Sequenz:

DEPPQSPWDR (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 mit dem 22 kDa Fragment. Die Sequenz entspricht den ersten 10 Aminosäuren des intakten, reifen ApoA-I.

Für das 10 kDa Fragment ergab sich folgende N-terminale Sequenz:

DEPPQSPWDR (Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg)

Dies entspricht ebenfalls dem N-terminalen Ende des intakten ApoA-I.

### 3.2.2.3.2 Massenspektroskopische Untersuchungen

Die Fragmente des r-ApoA-I wurden massenspektroskopisch untersucht.

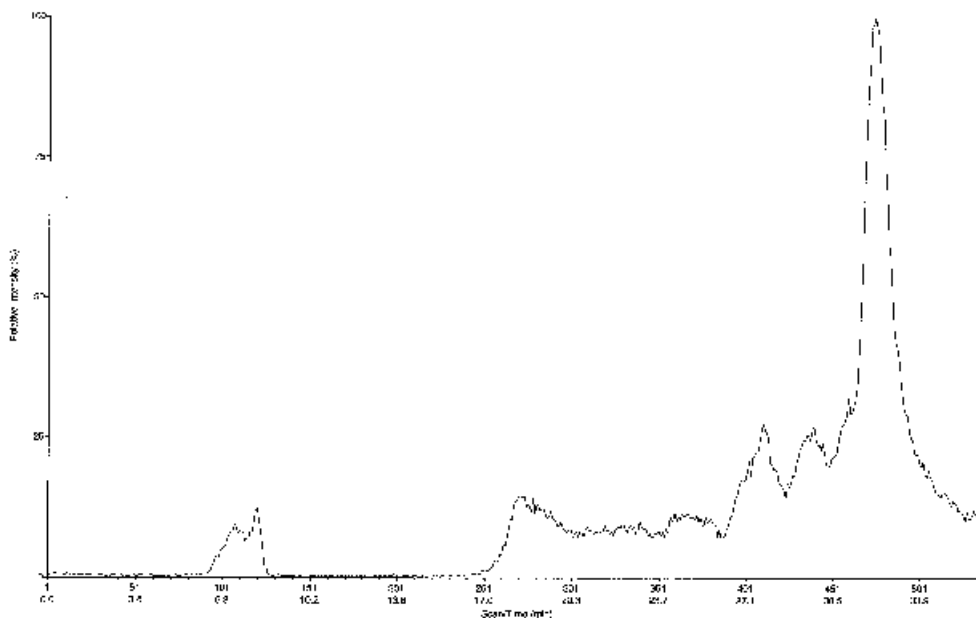


Abbildung 76: Total Ion Chromatography (TIC) des 22 kDa Fragments von r-ApoA-I

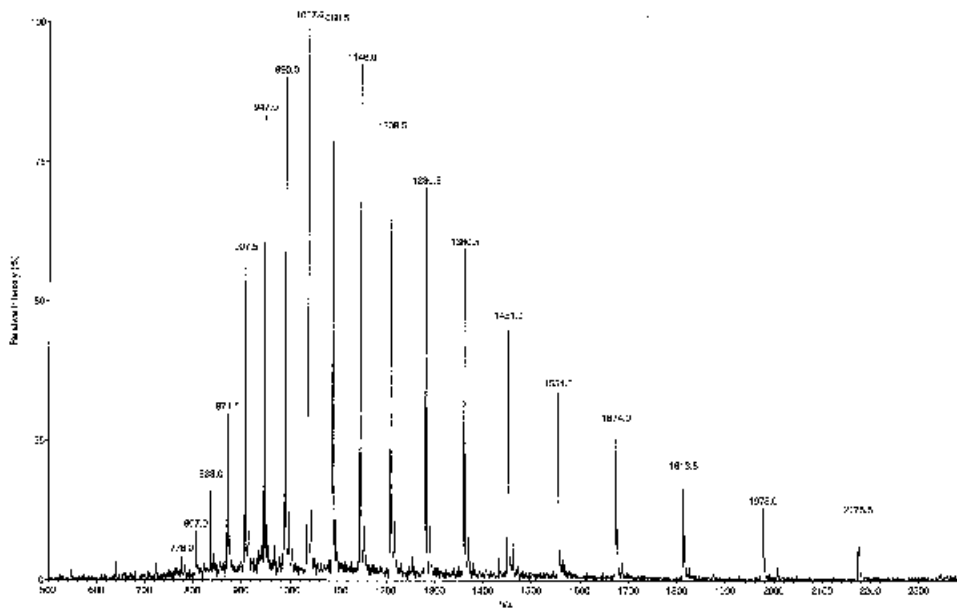


Abbildung 77: Peakanalyse des 22 kDa Fragments im Massenspektrometer

Massenspektroskopisch ließ sich das  $\approx 22$  kDa Fragment als ein Molekül mit einer Masse von 21,8 kDa identifizieren.

Ausgehend von einem intakten N-Terminus und einer Masse von 21.8 kDa ergab sich daraus ein Bruchstück des r-ApoA-I mit einer AS-Sequenz von 1-187.

Für das  $\approx 10$  kDa Fragment ergaben die massenspektroskopischen Daten eine exakte Masse von 10,03 kDa, entsprechend einem r-ApoA-I Bruchstück von AS 1-87.



### 3.3 Charakterisierung des rekombinanten Apolipoprotein A-I

#### 3.3.1 Isoelektrische Fokussierung

Zur Charakterisierung der rekombinanten Proteine wurde eine isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich von 5-7 durchgeführt. Dazu wurden konzentrierter Zellkulturüberstand einer Kultivierung mit CHOApO-A-I<sub>WT</sub> (Z1), aufgereinigtes r-ApoA-I<sub>WT</sub>, konzentrierter Zellkulturüberstand einer Kultivierung mit CHOApO-A-I<sub>Iowa</sub> (Z2), sowie aufgereinigtes r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> auf ein Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Standard diente humanes ApoA-I, aufgereinigt aus humaner HDL.

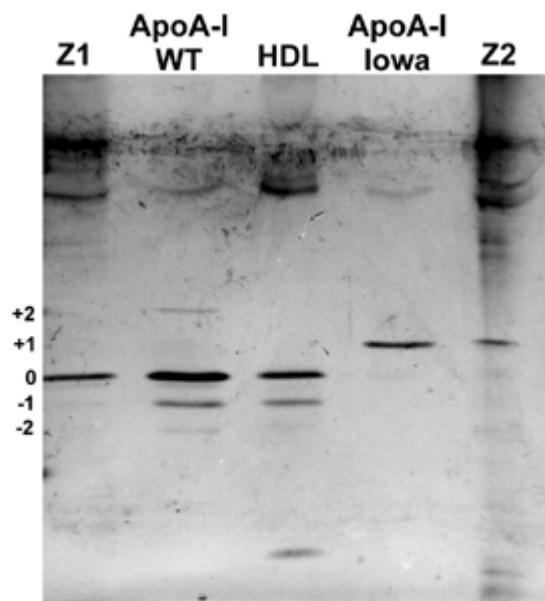


Abbildung 78: Isoelektrische Fokussierung, pH 5-7, Coomassie-Färbung (Z1: Konz. Zellkulturüberstand r-ApoA-I<sub>WT</sub>; Z2: konz. Zellkulturüberstand r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>)

Diese Abbildung zeigt die charakteristische Bande ( $\pm 0$ ) der Isoformen des ApoA-I beim Wildtyp (Bahn 1,2 und 3) sowie weitere Banden bei -1 und -2 (bei Z1 wegen zu geringer Konzentration nicht zu erkennen). Beim aufgereinigten r-ApoA-I<sub>WT</sub> ist eine weitere schwache Bande bei +2 zu erkennen, was auf das Vorhandensein von ProApoA-I hinweist. Bei den r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> enthaltenden Proben ist die Hauptbande wegen der Ladungszunahme aufgrund der Mutation charakteristischerweise um +1 verschoben.

### 3.3.2 Stoffwechselkinetische Untersuchungen im Kaninchenmodell

#### 3.3.2.1 Vergleich humanes ApoA-I versus rekombinantes ApoA-I

##### 3.3.2.1.1 Radioiodmarkierung

Zur stoffwechselkinetischen Untersuchung wurden humanes ApoA-I, isoliert aus dem Blut normolipämischer Patienten, sowie rekombinantes ApoA-I, isoliert aus dem Zellkulturüberstand der CHO<sub>ApoA-I<sub>WT</sub></sub>-Zellen radiomarkiert und simultan in NZW-Kaninchen injiziert. Dazu wurden je 100 µg lyophilisiertes Protein (human ApoA-I bzw. r-ApoA-I) in 100 µl Guanidin-Puffer gelöst und mit Na<sup>125</sup>I bzw. Na<sup>131</sup>I sowie ICI-Lösung versetzt. Die radiochemische Ausbeute der Markierung betrug 22% bzw. 15,4%.

##### 3.3.2.1.2 Stoffwechselkinetik

Nach der Radiomarkierung wurden die Proteine jeweils mit autologem Kaninchenserum inkubiert. Die HDL-Fraktion wurde mittels Ultrazentrifugation isoliert. Die Injektion der markierten Proteine erfolgte über die Ohrvene der Kaninchen. 5 Minuten, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 96 und 120 Stunden nach Injektion wurde den Kaninchen Blut entnommen und das Serum isoliert. Aliquots dieser Seren wurden zur Bestimmung der Radioaktivität verwendet.

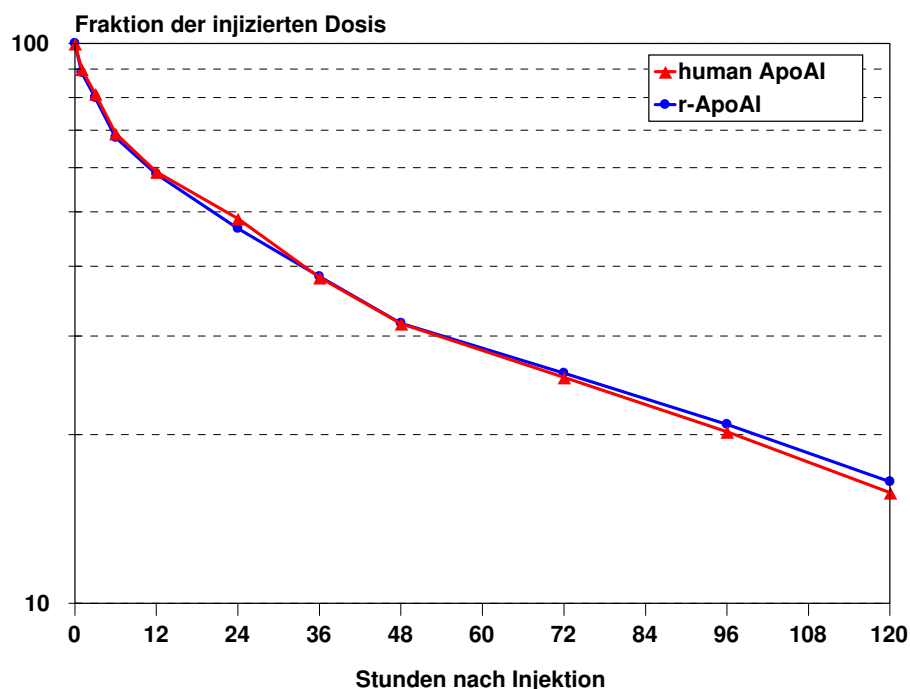


Abbildung 79: In vivo Kinetik des radiomarkierten <sup>125</sup>I-h-ApoA-I und <sup>131</sup>I-r-ApoA-I<sub>WT</sub> nach Injektion in NZW-Kaninchen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 79 zeigt den Anteil der Radioaktivität im Serum der Kaninchen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion der markierten Proteine. 120 Stunden nach

Injektion war die Aktivität im Serum der Kaninchen auf ca 17% abgesunken. Die Radioaktivitätsabklingkurve war für beide markierten Proteine identisch.

### 3.3.2.1.3 FPLC- und Dichtegradienten-Ultrazentrifugations-Analyse

Serumproben der Blutentnahmen 5 Minuten, 1 Stunde und 6 Stunden nach Injektion der markierten Proteine wurden mittels FPLC-Analyse (Superose 6) und Dichtegradienten-UZ auf ihre Radioaktivitätsverteilung untersucht.

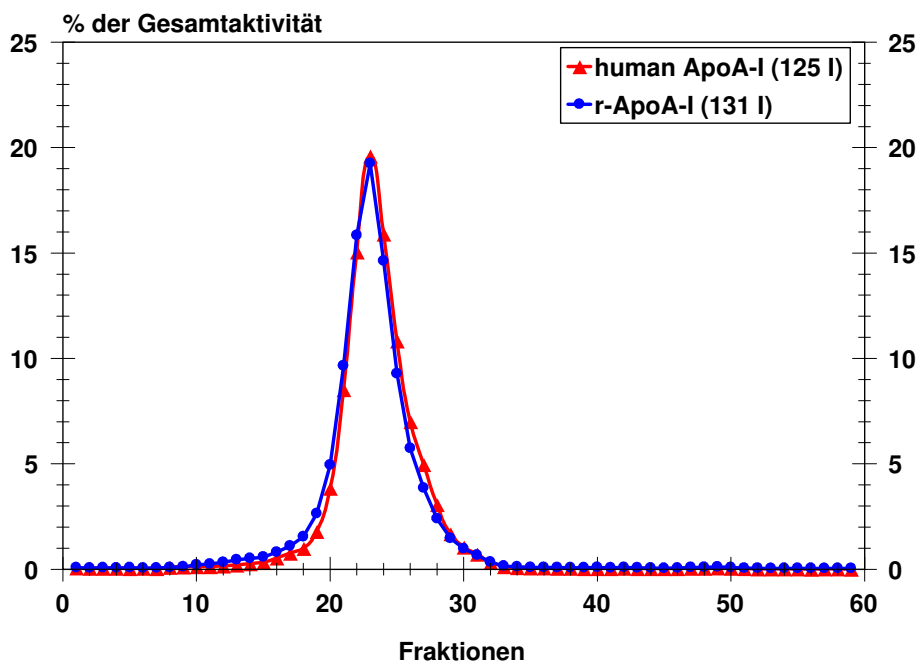


Abbildung 80: FPLC-Analyse des Kaninchenserums 5 Minuten nach Injektion der markierten Proteine  $^{125}\text{I}$ -h-ApoA-I und  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I

Das Aktivitätsprofil der FPLC-Analyse des Kaninchenserums 5 Minuten nach Injektion ist in Abbildung 80 dargestellt. Der Aktivitätspeak erschien in den Fraktionen 20 bis 28. Die Verteilung von humanem ApoA-I und r-ApoA-I war identisch. Das Vorliegen der Kaninchen-HDL-Fraktion in diesem Bereich wurde mit einem spezifischen Antikörper bestätigt.

Abbildung 81 zeigt die Verteilung der Radioaktivität im Kaninchenserum 5 Minuten nach Injektion nach Analyse mittels Dichtegradienten-UZ. Der Hauptaktivitätspeak erschien im Dichtebereich der HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub>-Fraktion ( $d=1,063-1,21$  g/ml), ein Hinweis für die Assoziation der markierten Proteine mit der HDL-Fraktion. Die Verteilung von humanem ApoA-I und rekombinantem ApoA-I war auch hier identisch.

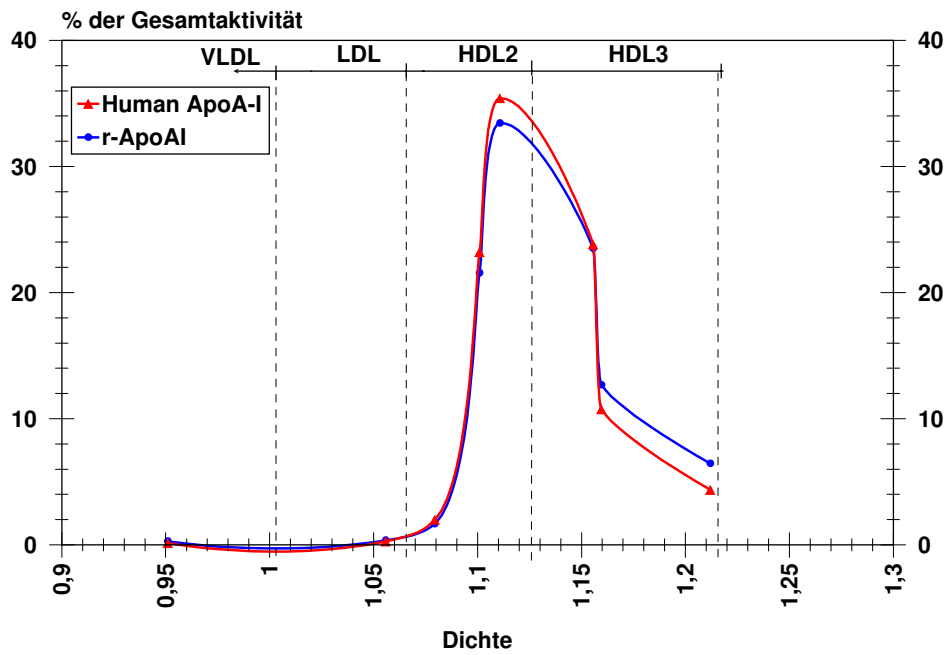


Abbildung 81: Dichtegradienten-UZ des Kaninchenserums, 5 Minuten nach Injektion der markierten Proteine <sup>125</sup>I-h-ApoA-I und <sup>131</sup>I-r-ApoA-I<sub>WT</sub>

Die gleichen Untersuchungen wurden mit den Seren der Blutentnahmen 1 Stunde und 6 Stunden nach Injektion der markierten Proteine durchgeführt (Abbildung 82 und Abbildung 83). Die vorangegangenen Ergebnisse aus den Seren der Blutentnahmen 5 Minuten nach Injektion wurden hier bestätigt. Die FPLC-Analyse zeigte den Aktivitätspeak in den Fraktionen 20-28. In der Dichtegradienten-UZ erschien der Aktivitätspeak im Dichtebereich der HDL-Fractionen.

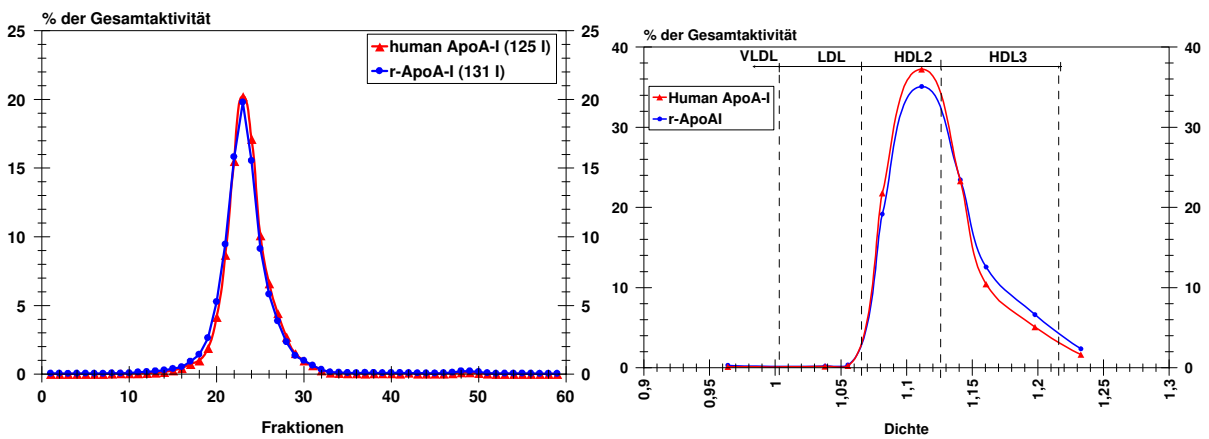


Abbildung 82: FPLC-Analyse und Dichtegradienten-UZ der Kaninchenserum, 1 Stunde nach Injektion der markierten Proteine <sup>125</sup>I-h-ApoA-I und <sup>131</sup>I-r-ApoA-I<sub>WT</sub>

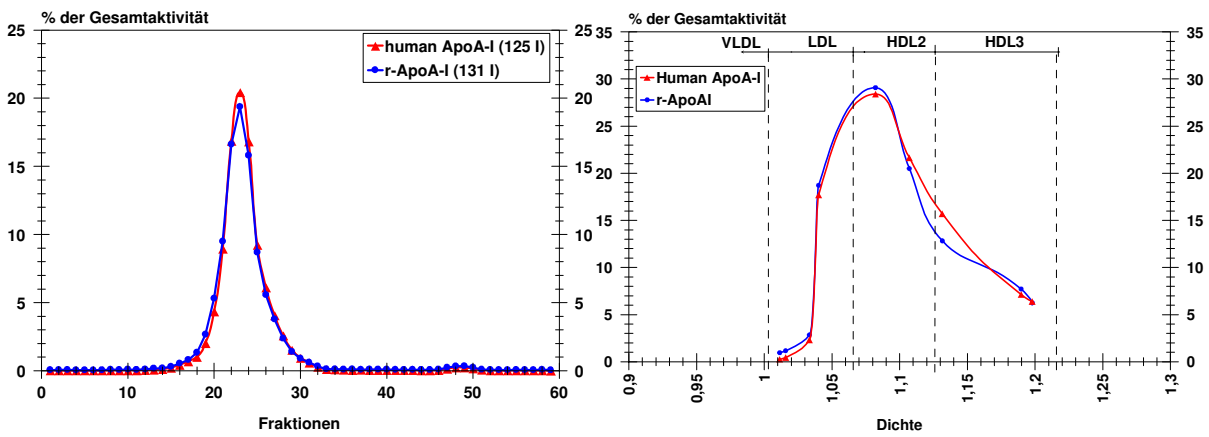


Abbildung 83: FPLC-Analyse und Dichtegradienten-UZ, 6 Stunden nach Injektion der markierten Proteine  $^{125}\text{I}$ -h-ApoA-I und  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>WT</sub>

#### 3.3.2.1.4 Inkubationen in Humanserum

Zur Untersuchung der Assoziation der markierten Apolipoproteine mit den humanen Lipidfraktionen wurden die frisch radiomarkierten Proteine mit Humanserum für 30 Minuten inkubiert und das Serum anschließend ebenfalls mittels Dichtegradienten-UZ und FPLC-Analyse auf seine Aktivitätsverteilung untersucht.

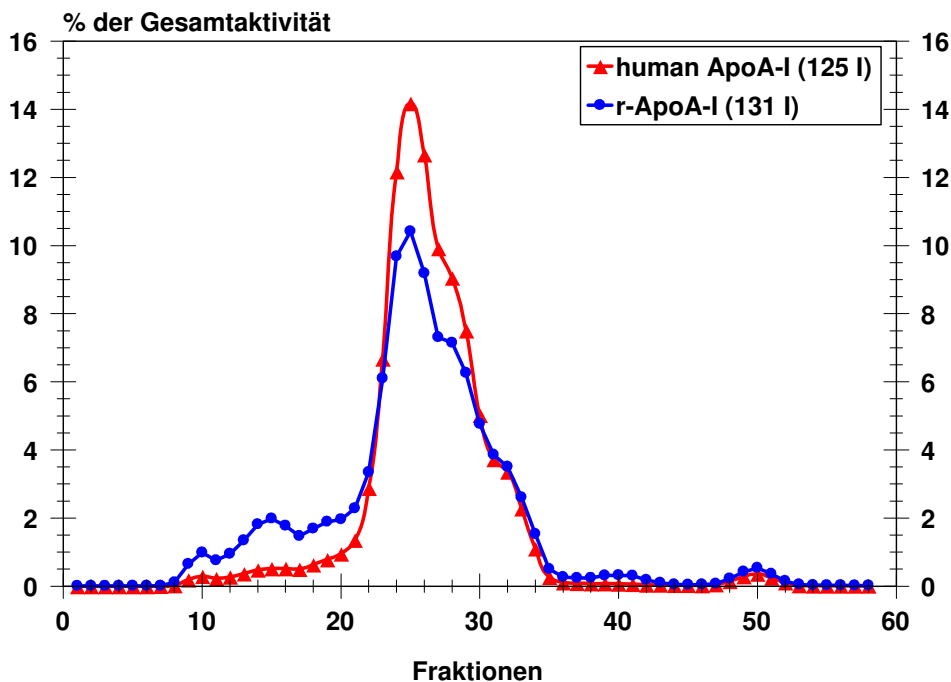


Abbildung 84: FPLC-Analyse des Humanserums nach Inkubation mit den markierten Proteinen  $^{125}\text{I}$ -h-ApoA-I und  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>WT</sub>

Die Verteilung der Radioaktivität nach Inkubation der markierten Proteine in Humanserum ist in Abbildung 84 dargestellt. Der Hauptaktivitätspeak eluierte auch hier in den

Fraktionen 20-28. Die Verteilung des humanen ApoA-I sowie des r-ApoA-I war nahezu identisch. Bei den kleinen Peaks (Fraktionen 10 bzw. 14-16) handelte es sich um die VLDL- bzw, LDL-Fraktion des Humanserums. Zu einem geringen Prozentsatz war ApoA-I auch mit diesen Lipidfraktionen assoziiert.

Die Dichtegradienten-UZ des Humanserums nach Inkubation zeigte eine Assoziation des humanen ApoA-I und des r-ApoA-I<sub>WT</sub> mit der HDL<sub>2</sub>- und HDL<sub>3</sub>-Fraktion im Dichtebereich  $d = 1,063-1,21$  g/ml (Abbildung 85). Auch hier verhielten sich beide Proteine identisch.

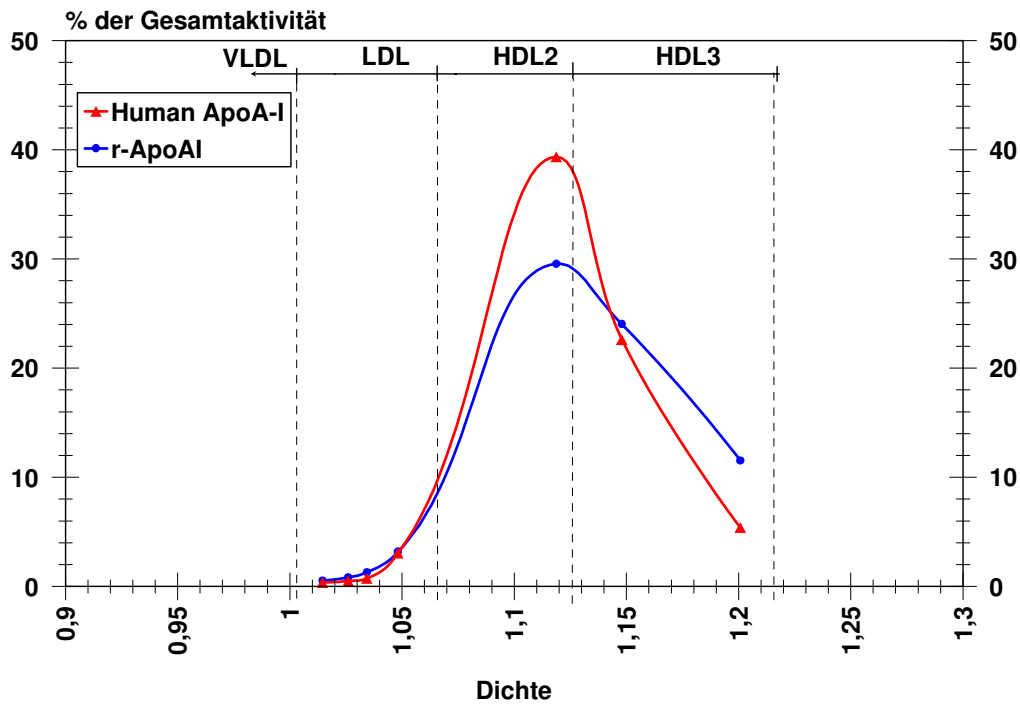


Abbildung 85: Dichtegradienten-UZ des Humanserums nach Inkubation mit den markierten Proteinen  $^{125}\text{I}$ -h-ApoA-I und  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I

Die Ergebnisse dokumentieren, daß sich humanes ApoA-I und rekombinantes ApoA-I im Stoffwechsel der Kaninchen identisch verhalten.

### 3.3.2.2 Vergleich r-ApoA-I<sub>WT</sub> versus r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>

#### 3.3.2.2.1 Radioiodmarkierung

Zur stoffwechselkinetischen Untersuchung der rekombinant exprimierten Proteine r-ApoA-I<sub>WT</sub> und r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>, isoliert aus dem Zellkulturüberstand der CHOApA-I<sub>WT</sub>- bzw. CHOApA-I<sub>Iowa</sub>-Zellen wurden diese radiomarkiert und simultan in NZW-Kaninchen injiziert. Dazu wurden wieder je 100 µg lyophilisiertes Apolipoprotein (r-ApoA-I<sub>WT</sub> bzw. r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>) in 100 µl Guanidin-Puffer gelöst und mit Na<sup>125</sup>I bzw. Na<sup>131</sup>I sowie ICI-Lösung versetzt. Die radiochemische Ausbeute der Markierung betrug hier 32% bzw. 11%.

#### 3.3.2.2.2 Abtrennung der HDL-Fraktion

Für nachfolgende stoffwechselkinetische Untersuchungen sollte die Abtrennung der HDL-Fraktion nach der Radiomarkierung und anschließender Inkubation in autologem Kaninchenserum mittels einer Superose 6-Säule erfolgen. Zur Bestimmung der Trennmöglichkeiten der Superose 6-Säule wurden 0,8 ml r-ApoA-I Lösung (100µg Protein) mit 0,2 ml Kaninchenserum inkubiert. Abbildung 86 zeigt das Elutionsprofil der Superose 6-Säule nach Auftrennung des Kaninchenserum. Die HDL-Fraktion eluiert in den Fraktionen 14-22. Ab der Fraktion 20 enthalten die Proben auch Albumin (Nachweise über spezifische Antikörper).

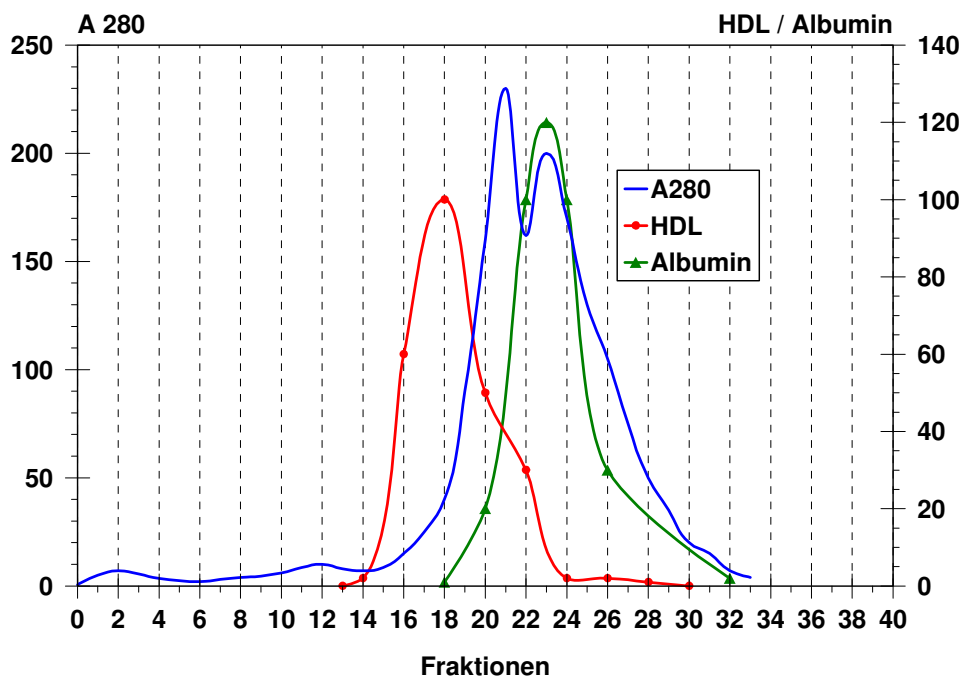


Abbildung 86: Elutionsprofil einer Superose 6-Säule, Abtrennung der HDL-Fraktion aus Kaninchenserum

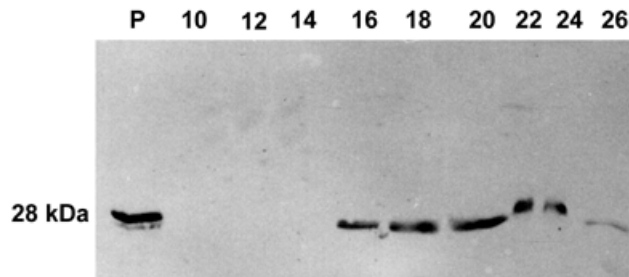


Abbildung 87: Westernblot mit Kaninchen-Anti-Human-ApoA-I Antikörper nach 15% SDS-PAAGE der Säulenfraktionen aus Abbildung 86: Elutionsprofil einer Superose 6-Säule, Abtrennung der HDL-Fraktion aus Kaninchenserum

Der Westernblot (Abbildung 87) wurde mit einem speziellen Kaninchen-Anti-Human-ApoA-I Primärantikörper inkubiert, der keine Kreuzreaktion mit dem Kaninchen-ApoA-I zeigen konnte. Die Fraktionen 16-22 beinhalten die Hauptmenge des ApoA-I. Zur Injektion waren nur die Fraktionen verwendbar, die noch nicht mit Albumin verunreinigt waren. Nach der Radiomarkierung wurden die Proteine jeweils mit autologem Kaninchenserum inkubiert. Die HDL-Fraktion wurde mittels Gelfiltration über eine Superose 6-Säule isoliert.

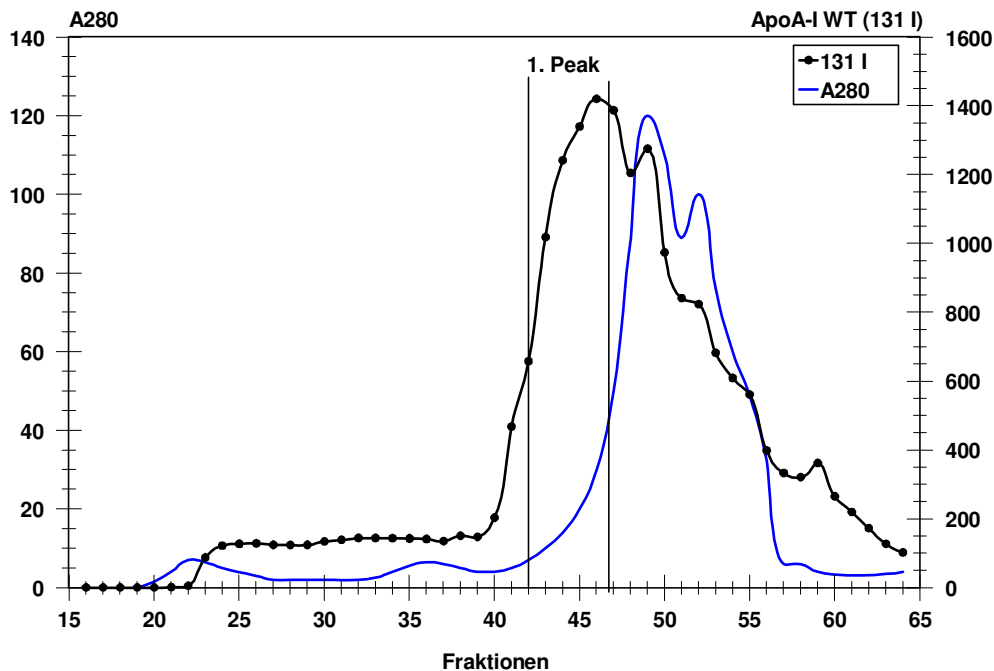


Abbildung 88: FPLC-Analyse des Kaninchenserums nach Inkubation mit radiomarkiertem  $^{131}\text{I}$ -ApoA-I<sub>WT</sub>

Wie in Abbildung 88 zu sehen ist, erschien das Maximum der Aktivität (Fraktion 44-46) vor den Hauptproteinpeaks (Fraktionen 49 ff). Für die anschließende Injektion in die Kaninchen wurden die Fraktionen 42-47 verwendet.



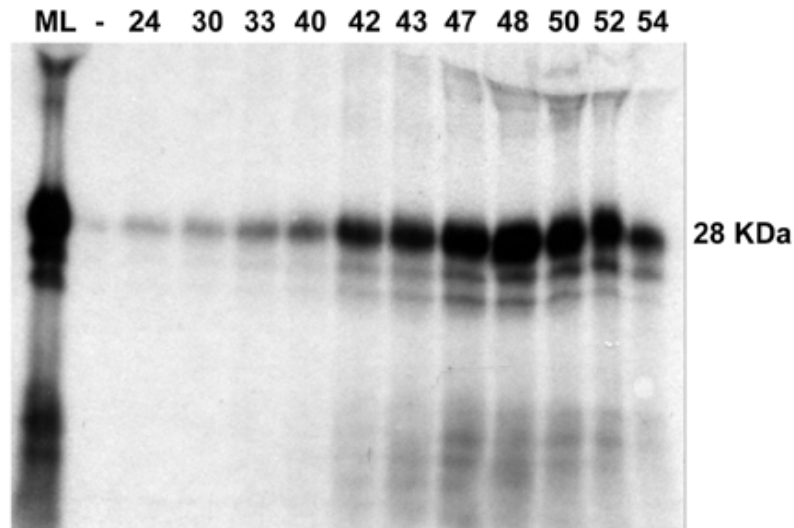


Abbildung 89: Autoradiogramm nach 15% SDS-PAAGE der FPLC-Auftrennung des Kaninchenserums nach Inkubation mit der  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>WT</sub> Markierungslösung (ML)

In Abbildung 89 sind die Säulenfraktionen der FPLC-Auftrennung des Kaninchenserums nach Inkubation mit der  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>WT</sub> Markierungslösung (ML) nach SDS-PAAGE und anschließendem Autoradiogramm dargestellt. Für die Kinetik wurden die Fraktionen 42 bis 46 verwendet. Diese Fraktionen enthielten das Maximum der Aktivität und wenig Albumin. Auch waren diese Fraktionen noch wenig mit Fragmenten verunreinigt, die erst in etwas späteren Fraktionen in höherer Konzentration auftraten.

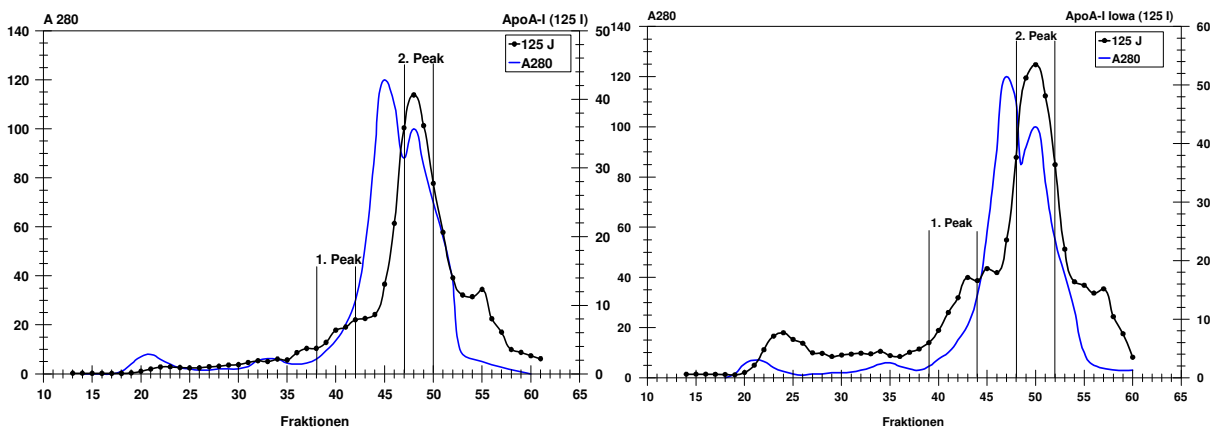


Abbildung 90: FPLC-Analysen des Kaninchenserums nach Inkubation mit radiomarkiertem  $^{125}\text{I}$ -ApoA-I<sub>Iowa</sub>

Abbildung 90 illustriert die Auftrennung des Kaninchenserums nach Inkubation mit  $^{125}\text{I}$ -ApoA-I<sub>Iowa</sub>. Aufgrund der geringeren Markierungsausbeute für ApoA-I<sub>Iowa</sub> wurde der HDL-Abtrennungsschritt wiederholt und die entsprechenden Fraktionen anschließend vereinigt.

Abbildung 90 zeigt, daß das Maximum der Radioaktivität nicht an der erwarteten Stelle (ca. Fraktionen 38-42) erschien, sondern erst später in den Fraktionen 46-52. In den Fraktionen 38-42 befand sich nur ein kleinerer Peak. Auf der Superose 6-Säule erscheinen kleinere Lipoproteinfraktionen wegen ihrer höheren Dichte in späteren Fraktionen. Es gibt auch in der Literatur Hinweise darauf, daß ApoA-I<sub>Iowa</sub> bevorzugt mit kleineren Lipoproteinfraktionen (HDL<sub>3</sub>) assoziiert, verglichen mit dem humanem ApoA-I [60].

Für die stoffwechselkinetischen Untersuchungen im Kaninchen wurden deshalb jeweils zwei Peaks der chromatographischen Auftrennung verwendet. Für ein Experiment wurden die Fraktionen zusammengefaßt, die theoretisch das HDL-ApoA-I<sub>Iowa</sub> enthalten sollten (1. Peak, Abbildung 90), für ein zweites Experiment wurden die Fraktionen zusammengefaßt, die die Hauptaktivitätsmenge enthielten (2. Peak, Abbildung 90).

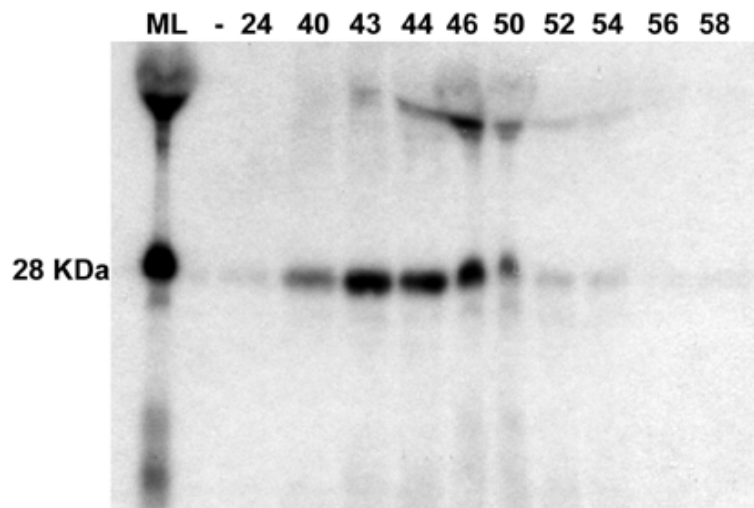


Abbildung 91: Autoradiogramm nach 15% SDS-PAAGE der FPLC-Auftrennung des Kaninchenserums nach Inkubation mit der <sup>125</sup>I-r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> Markierungslösung (ML)

In Abbildung 91 sind die Säulenfraktionen der FPLC-Auftrennung des Kaninchenserums nach Inkubation mit der <sup>125</sup>I-r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> Markierungslösung (ML) nach SDS-PAAGE und anschließendem Autoradiogramm dargestellt. Für die Kinetik wurden jeweils die Fraktionen 38-42 bzw. 48-51 verwendet. Die Fraktionen 38-42 enthielten die „erwartete“ HDL-Fraktion, die Fraktionen 48-51 enthielten das Aktivitätsmaximum. In den letzteren Fraktionen war auch eine Assoziation der Aktivität mit dem Albumin zu erkennen.

### 3.3.2.2.3 Stoffwechselkinetik

Die Injektion der markierten Proteine erfolgte über die Ohrvene der Kaninchen. 5 Minuten, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 96 und 120 Stunden nach Injektion wurde den Kaninchen

Blut entnommen und das Serum isoliert. Aliquots dieser Seren wurden zu Bestimmung der Radioaktivität verwendet.

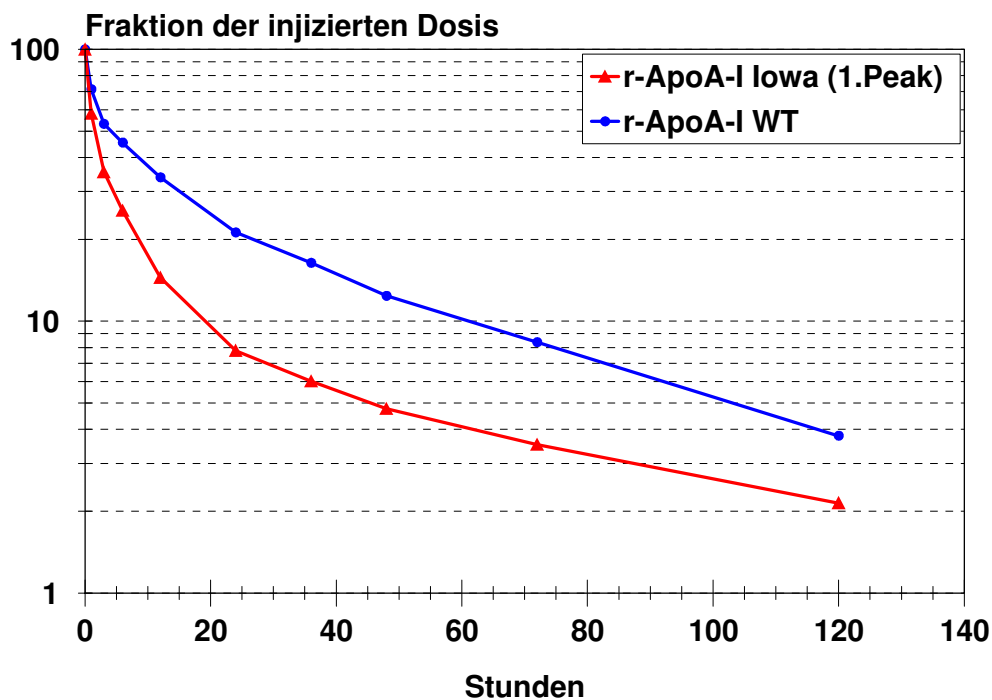


Abbildung 92: In vivo Kinetik des radiomarkierten  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>WT</sub> und  $^{125}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> (1. Peak, Abbildung 90) nach Injektion in NZW-Kaninchen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

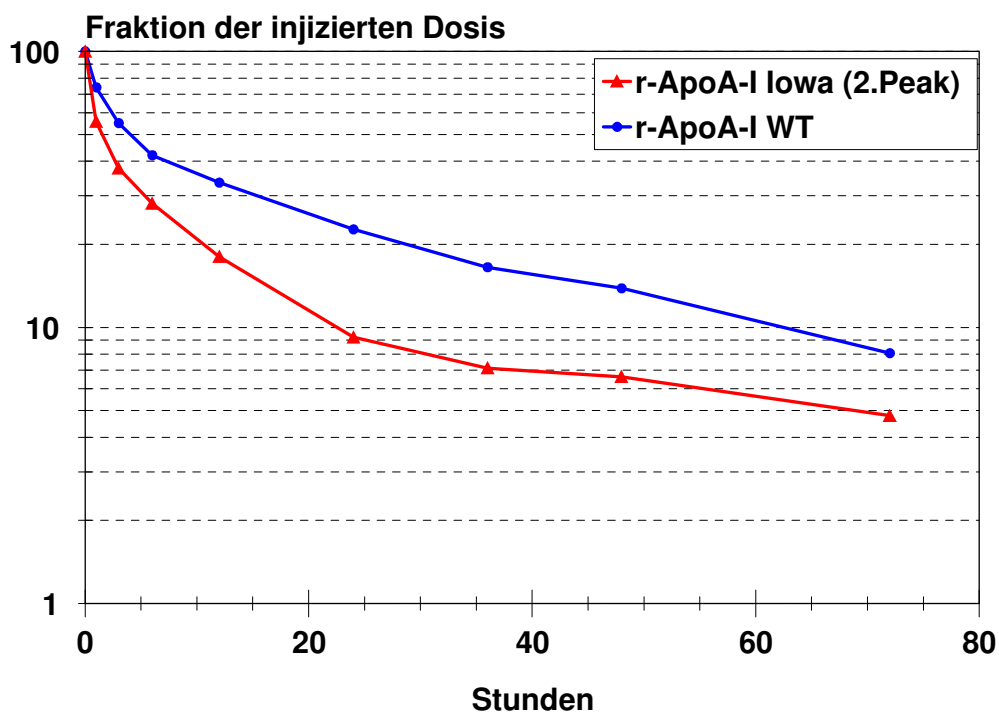


Abbildung 93: In vivo Kinetik radiomarkierten  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>WT</sub> und  $^{125}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> (2. Peak, Abbildung 90) nach Injektion in NZW-Kaninchen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 92 und Abbildung 93 zeigen die Radioaktivitätsabklingkurven nach Injektion der markierten Apolipoproteine in NZW-Kaninchen. In einem Experiment wurde für beide Proteine die HDL-Fraktion verwendet, d.h. der 1. Peak für ApoA-I<sub>Iowa</sub> (Abbildung 92). In einem zweiten Experiment wurde für ApoA-I<sub>Iowa</sub> der 2. Peak eingesetzt (Abbildung 93). Beide Experimente ergaben eine deutlich beschleunigte Abbaurrate für r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>, verglichen mit r-ApoA-I<sub>WT</sub>. Der Einsatz des 1. oder 2. Aktivitätspeaks für r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> schien physiologisch jedoch keinen Unterschied zu machen. Kleine Differenzen waren vermutlich auf die geringfügig unterschiedlichen Stoffwechsel der verwendeten Kaninchen zurückzuführen.

#### 3.3.2.2.4 FPLC- und Dichtegradienten-Ultrazentrifugations-Analyse

Serumproben der Blutentnahmen 5 Minuten, 1 Stunde und 6 Stunden nach Injektion der markierten Proteine wurden mittels FPLC-Analyse (Superose 6) und Dichtegradienten-UZ auf ihre Radioaktivitätsverteilung untersucht.

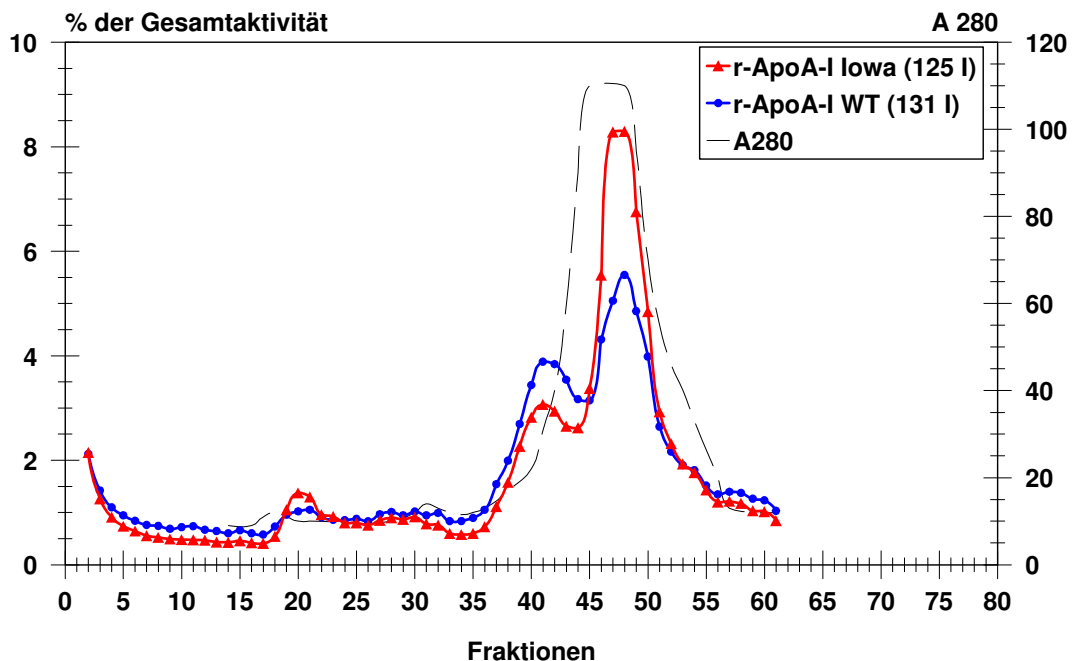


Abbildung 94: FPLC-Analyse des Kaninchenserums 5 Minuten nach Injektion von  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>WT</sub> bzw.  $^{125}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>

Abbildung 94 zeigt das Elutionsprofil der Superose 6-Säule nach Auftrennung des Kaninchenserums der Blutentnahme 5 Minuten nach Injektion der markierten Proteine. Das

Peakmuster der beiden rekombinanten Proteine war prinzipiell identisch, lediglich die prozentuale Verteilung war unterschiedlich. Die rekombinanten Proteine eluierten im wesentlichen in 2 Peaks in den Fraktionen 38-43 sowie 46-50. Während für r-ApoA-I<sub>WT</sub> annähernd eine Gleichverteilung der Aktivität ersichtlich wurde, lag für ApoA-I<sub>Iowa</sub> das Maximum deutlich im 2. Peak. Diese Ergebnisse waren für alle Experimente identisch, unabhängig davon, welche ApoA-I<sub>Iowa</sub>-Fraktion injiziert wurde.

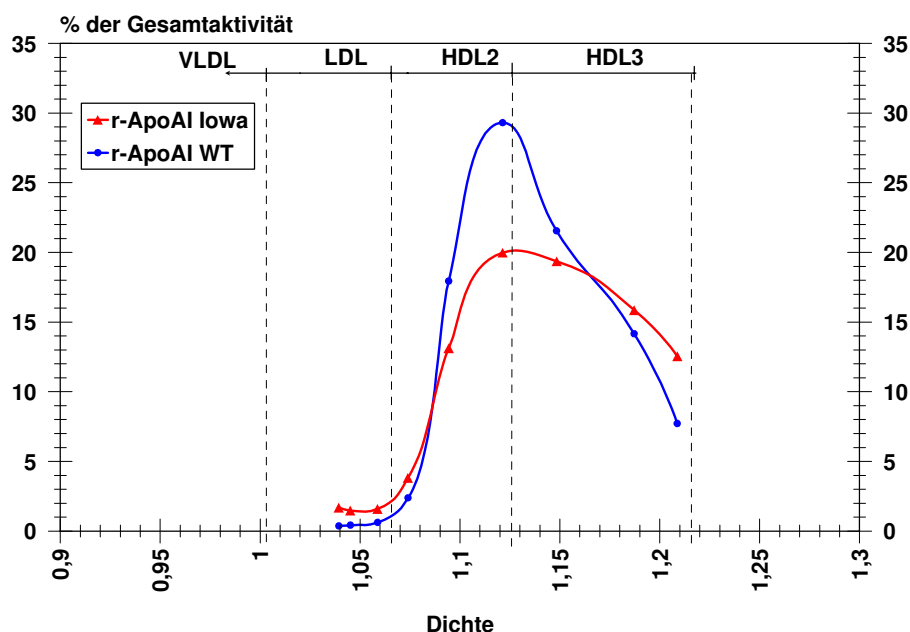


Abbildung 95: Dichtegradienten-UZ des Kaninchenserums 5 Minuten nach Injektion von  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>WT</sub> bzw.  $^{125}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> (1. Peak, Abbildung 90)

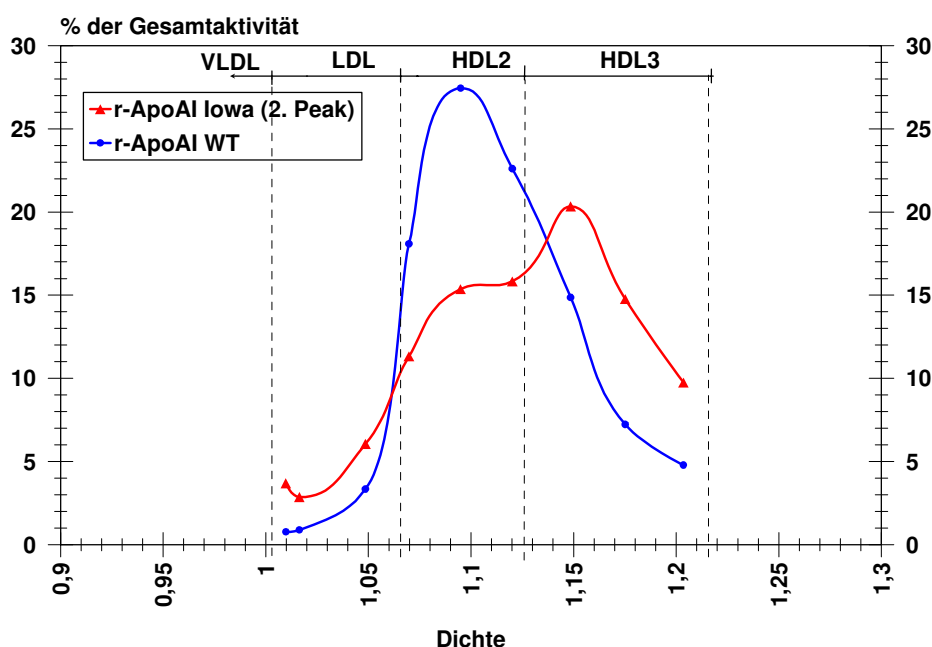


Abbildung 96: Dichtegradienten-UZ des Kaninchenserums 5 Minuten nach Injektion von  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>WT</sub> bzw.  $^{125}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> (2. Peak, Abbildung 90)

Abbildung 95 und Abbildung 96 illustrieren die Ergebnisse der Dichtegradienten-

Ultrazentrifugations-Analyse der Kaninchenserum 5 Minuten nach Injektion der markierten Proteine. Für r-ApoA-I<sub>WT</sub> befand sich das Maximum der Radioaktivität in beiden Abbildungen eindeutig im Dichtebereich der HDL<sub>2</sub>-Fraktion. r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> war in Abbildung 95 über den Dichtebereich der HDL<sub>2</sub>- und HDL<sub>3</sub>-Fraktionen verteilt. In Abbildung 96 war r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> ebenfalls über den Dichtebereich der HDL<sub>2</sub>- und HDL<sub>3</sub>-Fraktionen verteilt, das Maximum lag jedoch eher in der HDL<sub>3</sub>-Fraktion.

Analoge Untersuchungen wurden mit den Seren der Blutentnahmen 1 Stunde bzw. 6 Stunden nach Injektion der markierten Proteine durchgeführt.

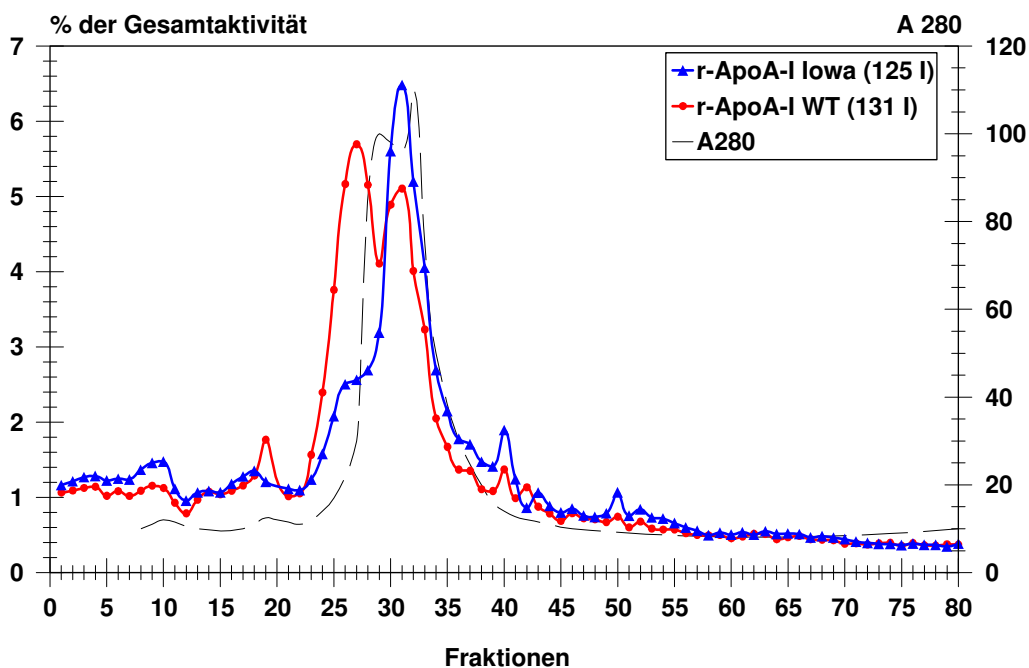


Abbildung 97: FPLC-Analyse des Kaninchenserums 1 Stunde nach Injektion von <sup>131</sup>I-r-ApoA-I<sub>WT</sub> bzw. <sup>125</sup>I-r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>

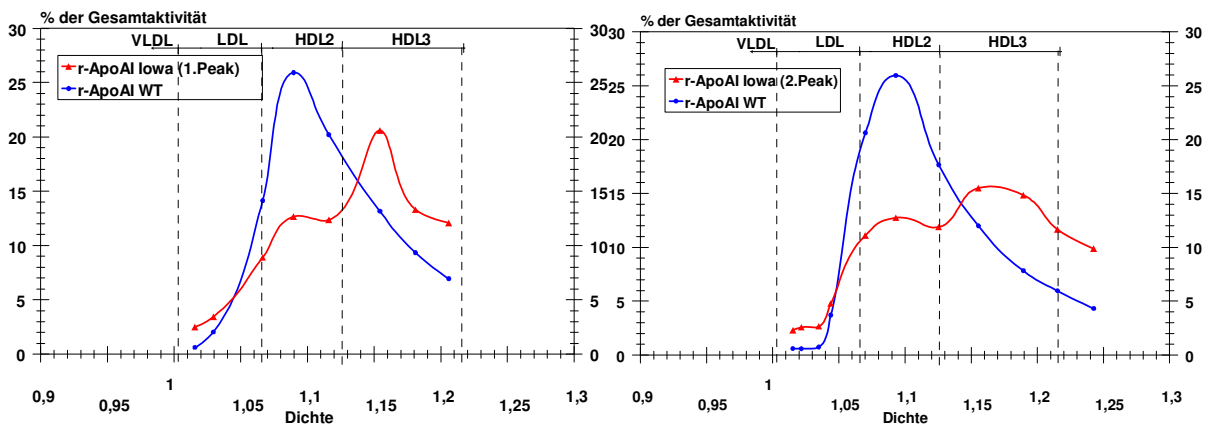


Abbildung 98: Dichtegradienten-UZ des Kaninchenserums, 1 Stunde nach Injektion von <sup>131</sup>I-r-ApoA-I<sub>WT</sub> bzw. <sup>125</sup>I-r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>

Die Ergebnisse der Analysen der Seren 1 Stunde nach Injektion von  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>WT</sub> bzw.  $^{125}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>lowa</sub> sind in Abbildung 97 und Abbildung 98 dargestellt. Prinzipiell erhielt man dieselben Daten wie bei der Analyse der Werte nach 5 Minuten. Auffällig war jedoch, daß hier kein Unterschied bezüglich der Verteilung des r-ApoA-I<sub>lowa</sub> bestand, unabhängig davon, welche Fraktion zur Injektion verwendet wurde.

Zur besseren Identifizierung des Assoziationsverhaltens der rekombinanten Proteine wurden ausgewählte Fraktionen der FPLC-Analyse der Kaninchenserum der Blutentnahmen 5 Minuten nach Injektion nochmals über eine Dichtegradienten-Ultrazentrifugation analysiert. Hier sollte besonders für r-ApoA-I<sub>lowa</sub> abgeklärt werden, ob eine Assoziation mit der HDL-Fraktion oder eher mit der Proteinfraction vorlag. Bei Assoziation mit der HDL-Fraktion sollte sich die Aktivität im entsprechenden Dichtebereich befinden ( $d=1,063-1,21$  g/ml). Bei Assoziation mit der Proteinfraction sollte sich die Aktivität im Dichtebereich deutlich über  $1,21$  g/ml anreichern. Eingesetzt wurden die Fraktionen 40/41 (1.Peak, ) und 47/48 (2.Peak, ) einer FPLC-Auftrennung (Abbildung 94). Die Ergebnisse sind in Abbildung 99 und Abbildung 100 dargestellt. Während die Fraktionen 40/41 in der Dichtegradienten-UZ ihr Aktivitätsmaximum eindeutig im Dichtebereich der HDL<sub>2</sub>-Fraktion hatten (Abbildung 99), stellte sich das Aktivitätsmaximum in der Analyse der Fraktionen 47/48 deutlich im Dichtebereich der HDL<sub>3</sub>-Fraktion (Abbildung 100) dar. In der Proteinfraction ( $d>1,21$  g/ml) war keine Aktivität zu finden.

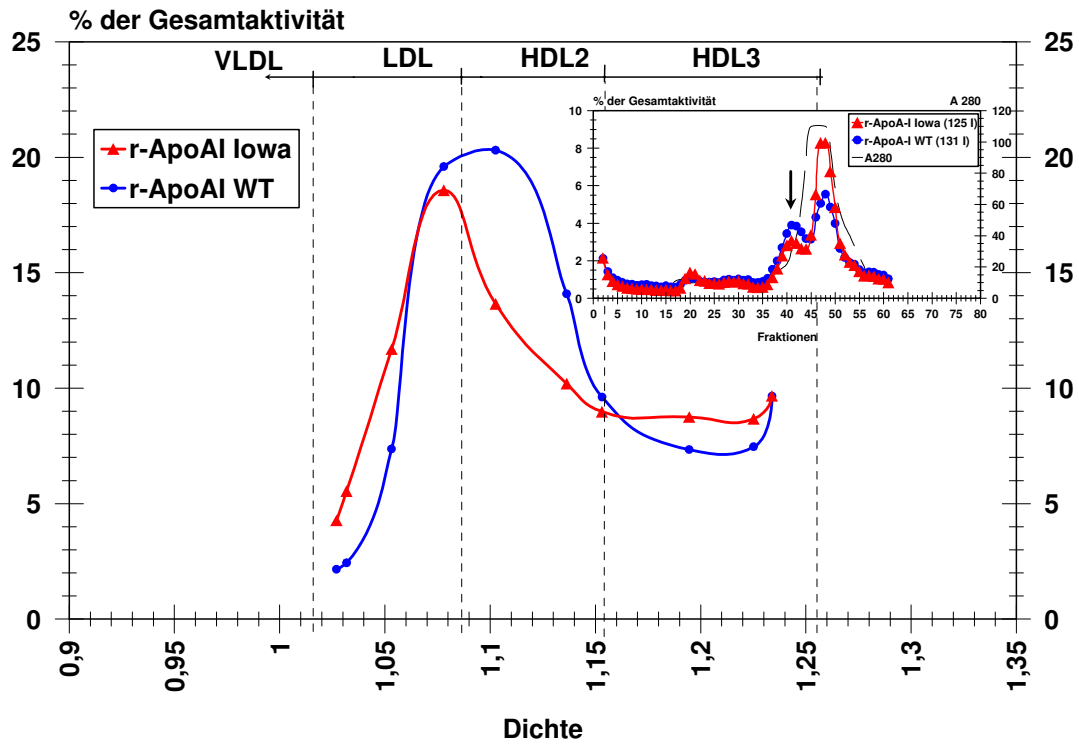


Abbildung 99: Dichtegradienten-UZ, Fraktionen 40/41 aus FPLC-Analyse des Kaninchenserums 5 Minuten nach Injektion von  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>WT</sub> bzw.  $^{125}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>

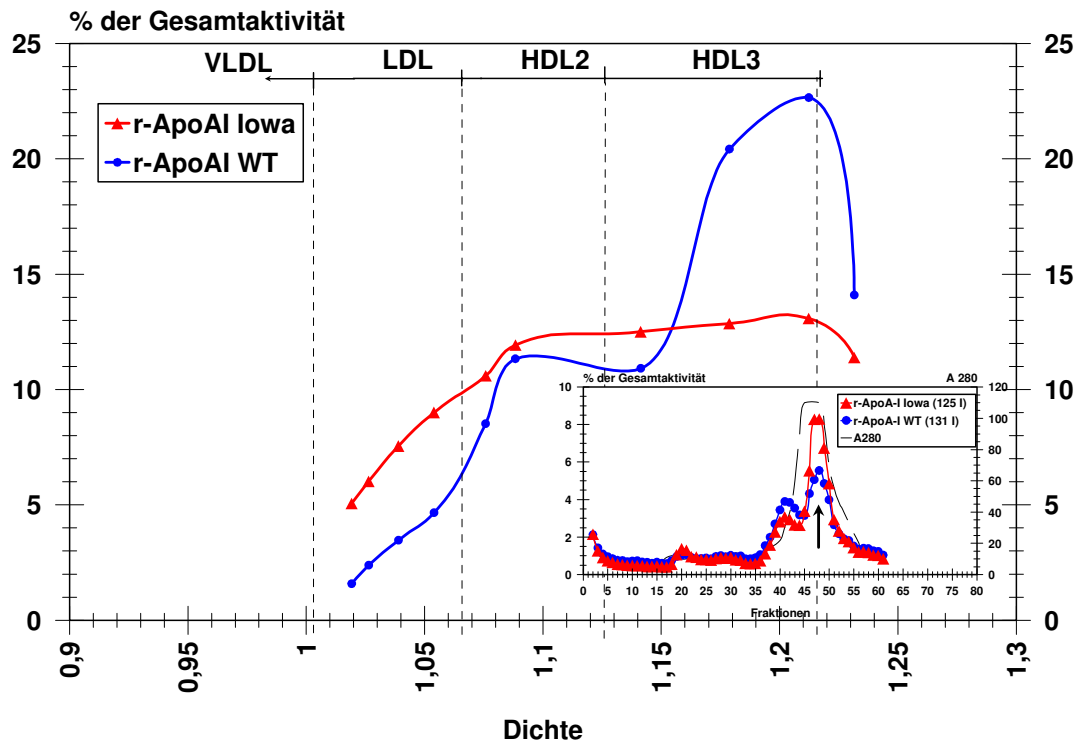


Abbildung 100: Dichtegradienten-UZ, Fraktionen 47/48 aus FPLC-Analyse des Kaninchenserums 5 Minuten nach Injektion von  $^{131}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>WT</sub> bzw.  $^{125}\text{I}$ -r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>



### 3.3.2.2.5 Inkubationen in Humanserum

Zur Untersuchung der Assoziation der markierten Apolipoproteine mit den humanen Lipidfraktionen wurden die frisch radiomarkierten Proteine nach Abtrennung der HDL-Fraktion mit Humanserum für 30 Minuten inkubiert und das Serum anschließend ebenfalls mittels Dichtegradienten-UZ und FPLC-Analyse auf seine Aktivitätsverteilung untersucht. Für r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> wurde der 1. Peak (Abbildung 90) der chromatographischen Reinigung verwendet.

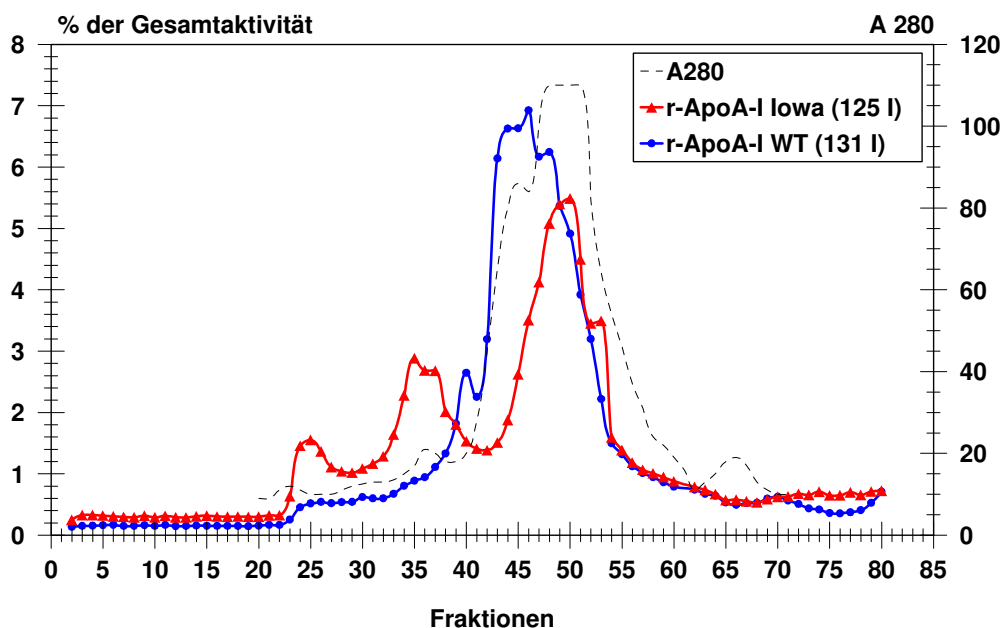


Abbildung 101: FPLC-Analyse des Humanserums nach Inkubation mit den markierten Proteinen r-ApoA-I<sub>WT</sub> und r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>

Die Verteilung der Radioaktivität nach Inkubation der markierten Proteine in Humanserum ist in Abbildung 101 dargestellt. Bei den kleineren Peaks handelte es sich um die VLDL- bzw. LDL-Fraktion des Humanserums. Für ApoA-I<sub>Iowa</sub> war eine Assoziation mit diesen Lipoproteinfraktionen zu einem gewissen Prozentsatz zu erkennen. Das Maximum der Aktivität eluierte für r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> etwas später als für r-ApoA-I<sub>WT</sub>. Diese Verschiebung des Aktivitätsmaximums r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> ließ sich hier dadurch erklären, daß eine Assoziation mit einer kleineren HDL-Dichtefraktion als mit der HDL<sub>2</sub>-Fraktion vorlag.

Die Dichtegradienten-UZ des Humanserums (Abbildung 102) nach Inkubation zeigte eine Assoziation des r-ApoA-I<sub>WT</sub> und des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> mit der HDL<sub>2</sub> bzw. HDL<sub>3</sub>-Fraktion im Dichtebereich  $d = 1,063 - 1,21$  g/ml. Beide Proteine verhielten sich hier identisch.

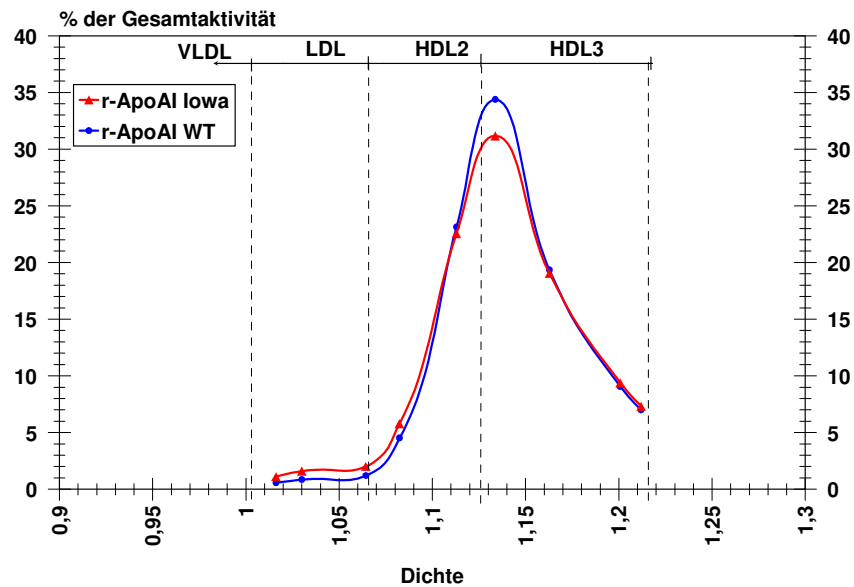


Abbildung 102: Dichtegradienten-UZ des Humanserums nach Inkubation mit den markierten Proteinen  $r\text{-ApoA-I}_{WT}$  und  $r\text{-ApoA-I}_{Iowa}$

Ein weiteres Experiment zur Analyse der Assoziation der rekombinanten Proteine wurde nach Auftrennung des Humanserums nach Inkubation mit  $r\text{-ApoA-I}_{WT}$  und  $r\text{-ApoA-I}_{Iowa}$  durchgeführt. Die Fraktionen 42-58 der FPLC-Analyse (Abbildung 101) wurden auf einem 15%iges SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Vom Gel wurde ein Westernblot angefertigt und anschließend wurde das Gel mit Coomassie angefärbt. Vom Westernblot wurde ein Autoradiogramm angefertigt. Mit einem Skalpell wurden die interessierenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und auf ihren Anteil an  $^{125}\text{I}$  bzw.  $^{131}\text{I}$  untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 103 dargestellt. Reihe A enthielt die Banden in Höhe des HDL-Standards (28 kDa). Reihe B enthielt Banden, die knapp unter dem Albumin liefen und die nicht weiter identifizierbar waren. Reihe C enthielt die Banden in Höhe des Albumins. Für die Banden in Reihe A ließ sich sowohl eine Assoziation mit  $^{131}\text{I-r-ApoA-I}_{WT}$  als auch mit  $^{125}\text{I-r-ApoA-I}_{Iowa}$  feststellen. Der prozentuale Anteil an  $^{131}\text{I-r-ApoA-I}_{WT}$  war jedoch höher. Für die Banden in Reihe B konnte ebenfalls eine Assoziation mit beiden Proteinen festgestellt werden, jedoch war hier der Anteil des  $^{125}\text{I-r-ApoA-I}_{Iowa}$  höher. In Reihe C konnte so gut wie gar kein  $^{131}\text{I-r-ApoA-I}_{WT}$  nachgewiesen werden. Hier resultierte die vorhandene Aktivität fast ausschließlich vom  $^{125}\text{I-r-ApoA-I}_{Iowa}$ . Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß leichte Assoziationen mit anderen Proteinen für beide ApoA-I-Formen nachweisbar waren. Die Affinität des  $r\text{-ApoA-I}_{Iowa}$  zu anderen Proteinen schien dabei allerdings ausgeprägter zu sein.

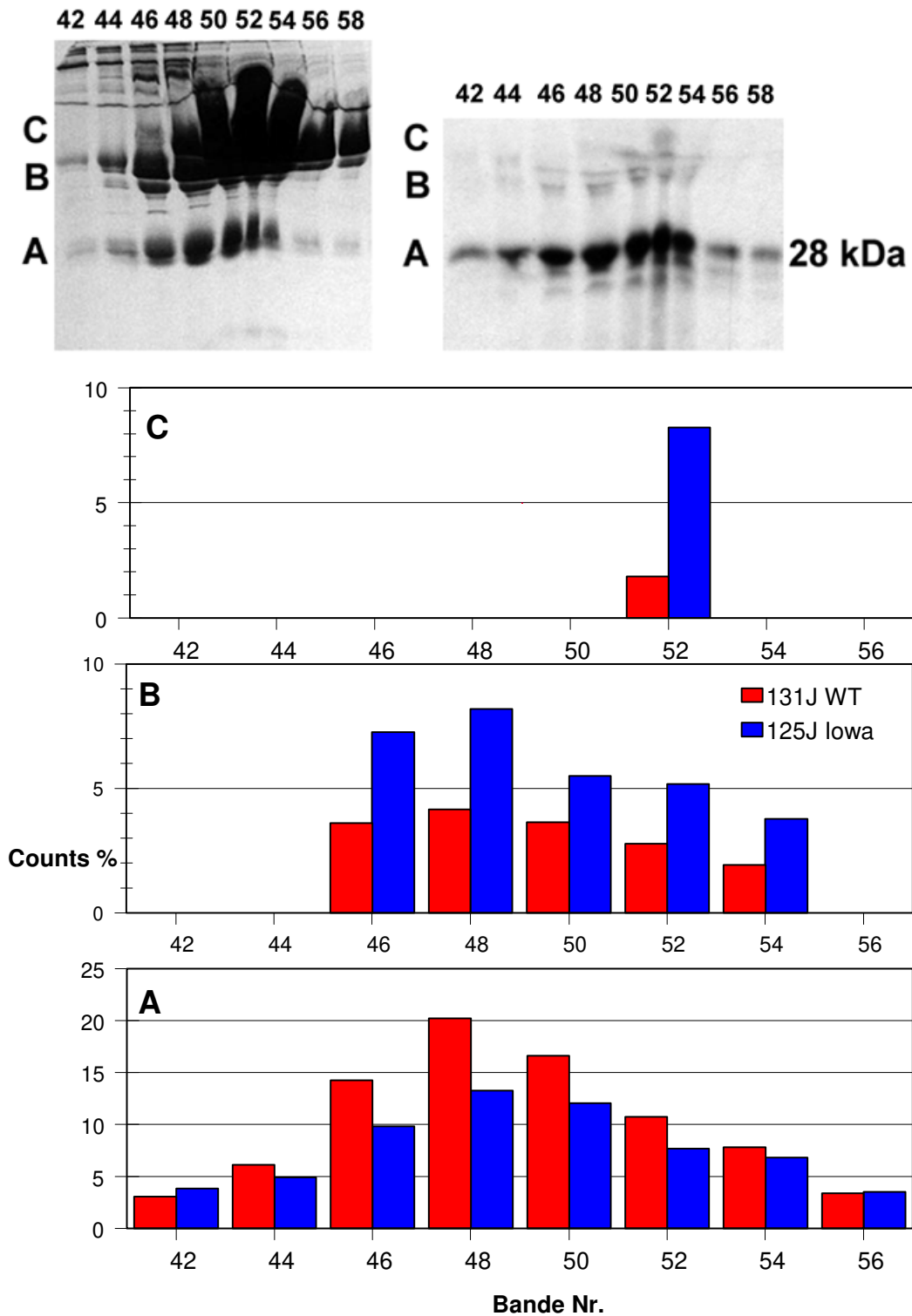


Abbildung 103: Aktivitätsanalyse einzelner Banden nach SDS-Gelelektrophorese der säulenchromatographischen Auftrennung eines Humanserums nach Inkubation mit *r-ApoA*<sub>WT</sub> und *r-ApoA*<sub>Iowa</sub>



## 4 DISKUSSION

ApoA-I ist das wesentliche Strukturprotein der HDL-Fraktion im Blut. Den HDL kommt eine besondere physiologische Bedeutung zu, da sie die einzigen bisher gut charakterisierten Partikelchen sind, die antiatherogene Eigenschaften besitzen. Die Grundlage für diese günstige Stoffwechseleigenschaft der HDL ist der reverse Cholesterintransport [15-17]. Hierbei ist das ApoA-I sowohl als Ligand für vermutete HDL-Rezeptoren als auch als Kofaktor für die HDL-ständige, LCAT-vermittelte Veresterung des Cholesterins entscheidend. Stoffwechselkinetische Studien zeigten, daß eine erniedrigte HDL-Fraktion im Blut im allgemeinen Folge eines gesteigerten Katabolismus des ApoA-I ist. Bei erhöhten HDL-Serumfraktionen konnte man als primäre Ursache eine gesteigerte Synthese des ApoA-I identifizieren [68, 108, 109]. Diese Ergebnisse dokumentieren, daß ApoA-I entscheidend für die HDL-Serumkonzentration ist. Trotz dieser Bedeutung des ApoA-I sind der eigentliche Metabolismus wie auch die funktionellen Eigenschaften der verschiedenen Epitope des Proteins nur sehr unzureichend charakterisiert. Primäres Ziel dieser Arbeit war deshalb die Etablierung eines Verfahrens, ApoA-I sowie die Variante ApoA-I<sub>Iowa</sub> rekombinant herzustellen und auf ihre Identität mit nativem, humanen ApoA-I zu überprüfen.

Die Expression rekombinanter Proteine mit Hilfe genetisch veränderter Zelllinien stellt einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung und für Untersuchungen zum Metabolismus nativer Proteine dar. Ein interessierendes Protein kann physiologisch in nur sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Mit Hilfe der Proteinexpression ist es möglich, solche Proteine in großen Mengen zu synthetisieren. Bei geeigneter Wahl der Expressionsbedingungen liegt das gesuchte Protein oftmals bereits ohne große Verunreinigungen an Fremdproteinen vor. Zusätzlich führte die Herstellung von physiologisch vorkommenden Mutanten wie auch die gezielte Herstellung nicht natürlich vorkommender Mutanten und deren Charakterisierung in den letzten Jahren zu einem deutlich verbesserten Verständnis der strukturellen und funktionellen Eigenschaften zahlreicher Proteine.

Die Expression von rekombinantem ApoA-I in CHO-Zellen wurde erstmals 1987 in der Literatur beschrieben [110]. Seitdem beschäftigen sich einige Veröffentlichungen mit dieser Thematik, eine detaillierte Methodenoptimierung wurde jedoch bisher nicht veröffentlicht. Dabei wurden Proteinexpressionsraten von r-ApoA-I zwischen 0,5 µg/ml und 10 µg/ml im Zellkulturmedium beschrieben [110-113]. Problematisch bei den

Kultivierungen ist dabei die Verwendung von serumhaltigen Medien [111]. Serum enthält Bestandteile von Apolipoproteinen, die somit bei Verwendung von Serum in der Proteinexpression von ApoA-I zu einer Verunreinigung mit den rekombinanten Proteinen führen. Neben den CHO-Zellen zur Expression von Proteinen gibt es weitere verwendete Zellsysteme. Beispielsweise werden Säugerzelllinien wie BHK-Zellen und HepG2-Zellen verwendet [114, 115]. Außerdem kommen andere Expressionssysteme wie mit Baculovirus infizierte Insektenzellen sowie Bakterienstämme der *Escherichia coli* häufig zum Einsatz [111, 116-119]. Die Proteinexpression mit Baculovirus infizierten Insektenzellen hat den Nachteil, daß hier keine stabil transfizierte Zelllinie vorliegt, sondern daß die Insektenzellen immer wieder frisch mit dem Baculovirus infiziert werden müssen. Ein weiterer Nachteil des Baculovirusystems ist die intrazelluläre Expression des Zielproteins im Falle des ApoA-I [119]. Zur Ernte des exprimierten Proteins mußten die Zellen lysiert werden, was auf der einen Seite zur Kontamination mit zelleigenen Proteinen führte, auf der anderen Seite auch die zelleigenen Proteasen freisetzte. Bei proteolytisch anfälligen Proteinen wie dem ApoA-I war dies ein gravierender Nachteil. Auch bei der Proteinexpression mit *E.coli* hatte man es mit einer intrazellulären Expression des Zielproteins zu tun, so daß auch hier eine Kontamination mit zelleigenen Proteinen bzw. Proteasen vorlag. Ein weiterer Nachteil war die Tatsache, daß *E. coli* als Prokaryonten keine posttranslationalen Modifikationen des exprimierten Proteins vornehmen können. Es gibt jedoch Hinweise, daß ApoA-I sowohl acyliert als auch phosphoryliert posttranslational modifiziert vorliegt [120, 121]. Bei der Proteinexpression können Fusionsproteine exprimiert werden, die die anschließende Aufreinigung erleichtern sollen. Die Arbeiten von Schmidt *et al.* konnten allerdings für *E.coli* zeigen, daß dies zumindest für ApoA-I keine geeignete Methode ist. Bei der anschließenden Spaltung des Fusionsproteins mittels einer sehr spezifischen Protease wurde das ApoA-I fast vollständig degradiert [116, 119]. Wie bereits zuvor ausgeführt, ist die serumfreie Expression rekombinanten ApoA-I unbedingt notwendig, da gängige Serumzusätze (von Rind, Pferd etc.) ebenfalls Apolipoproteine enthalten, die denen des Menschen sehr ähnlich sind und die sich nachfolgend nicht voneinander unterscheiden und trennen lassen. In der Zellkultur kann aber nicht ohne weiteres auf den Zusatz von Serum verzichtet werden, da im Serum Substanzen enthalten sind, die für das Wachstum der Zellen essentiell sind. Der Einfluß des Serums auf das Wachstum der Zellen in der Zellkultur ist bis heute nicht bis ins letzte Detail geklärt. Natürlich sind auch die Hersteller von Zellkulturmedien inzwischen auf dieses Problem der serumfreien Kultivierung aufmerksam geworden und bieten zahlreiche Spezialmedien für die serumfreie Kultivierung an. Neben möglichen Kreuzreaktionen mit

Proteinen aus dem Serum hat die serumhaltige Kultivierung noch den Nachteil der Kontamination des Expressionsmediums mit einer Fülle von unerwünschten Fremdproteinen. Besonders Albumin ist im Serum in großen Mengen vorhanden. Diese Fremdproteine müssen nachfolgend vom Zielprotein getrennt werden, was gegebenenfalls recht problematisch sein kann. Mit jedem zusätzlichem Anreicherungsschritt sind Verluste des gewünschten Proteins verbunden. Aus diesen Gründen müssen die Kultivierungsbedingungen optimiert werden, um in einem wirtschaftlich tragbaren Rahmen bei möglichst geringem Material- und Arbeitseinsatz ein Maximum an Protein synthetisieren und anschließend isolieren zu können. In dieser Arbeit wurden vier verschiedene serumfreie Medien zur Expression rekombinanten ApoA-I untersucht und mit den Daten einer Expression unter serumhaltigen Bedingungen verglichen. Die Medien unterschieden sich zum Teil erheblich in ihrer Zusammensetzung. Bedauerlicherweise war nicht jeder Hersteller bereit, die vollständige Zusammensetzung seines Mediums bekanntzugeben. Für das Medium HyQ CCM-5 ergab sich, daß hier Apolipoproteine enthalten waren, die immunchemisch von rekombinant exprimiertem r-ApoA-I nicht zu unterscheiden waren. Das Medium schied somit für weitere Untersuchungen aus. Die Medien-Mischung DMEM/Hams F-12 wurde für die Expression von ApoA-I bereits mehrfach beschrieben [91, 110-112]. Hier wurden Expressionsraten bis zu 10 µg/ml ApoA-I im Zellkulturmedium beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnten Expressionsraten von 2,3 µg/ml mit diesem Medium erzielt werden. Die Diskrepanz dieser erzielten Ergebnisse liegt vermutlich darin begründet, daß die Kultivierung von den genannten Arbeitsgruppen in Rollerflaschen durchgeführt wurde, während hier normale Zellkulturflaschen verwendet wurden. Bei Verwendung von Rollerflaschen kann die Kultivierung jedoch über einen längeren Zeitraum und mit einer höheren Zelldichte durchgeführt werden, was somit zu höheren Expressionsraten führen kann. Außerdem wurden in der Literatur die Expressionsraten nicht auf ihren Anteil an intaktem ApoA-I bzw. an Fragmenten von ApoA-I dokumentiert; die tatsächlichen Expressionsraten an intaktem ApoA-I könnten deshalb deutlich niedriger sein. Die Verwendung des Mediums HybridoMed DIF 1000 ist für die Kultivierung von CHO-Zellen in der Literatur beschrieben, allerdings nicht zur Expression von ApoA-I [89, 90]. Mit diesem Medium konnten zwar relativ hohe ApoA-I Konzentrationen erzielt werden, jedoch traten hier vermehrt Degradationsprodukte auf. Ein weiterer Nachteil dieses Mediums war der hohe Anteil an Albumin (1 mg/ml), der nachfolgende Anreicherungsschritte erschwerte. Das Medium CHO-S-SFM-II wurde speziell für die Proteinexpression in CHO-Zellen konzipiert [91, 92]. Auch hier liegen keine Daten für die Expression von ApoA-I vor. Dieses Medium erwies

sich als das optimale Kultivierungsmedium für CHO-Zellen zur Expression von ApoA-I. Hier wurden Konzentrationen von bis zu 30 µg/ml ApoA-I im Medium erhalten. Gleichzeitig wurde für jedes Medium eine den Metallothionin-Promotor maximal stimulierende Zinkkonzentration ermittelt. Die Stimulation des Promotors wäre auch mit anderen Elementen der 2. Nebengruppe (Cd, Hg) oder Kupfer möglich, wegen der Toxizität dieser Elemente jedoch wenig sinnvoll. Auch eine Induktion mit Steroidhormonen wäre denkbar, aber aus Kostengründen ebenfalls nicht zweckmäßig [87]. Die Unterschiede zwischen den Medien bezüglich der optimal stimulierenden Zinkkonzentration sind wohl hauptsächlich in der Ausgangssupplementierung seitens des Herstellers begründet. Außerdem können in den Medien neben  $Zn^{2+}$  auch zusätzliche Substanzen vorgelegen haben, die einen stimulierenden Einfluß auf den Promotor hatten, so daß sich die Effekte addierten. Ein weiterer wichtiger Aspekt während der Optimierung war das Auftreten von Degradationsprodukten des ApoA-I. Die Experimente zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen bei Beachtung der Fragmentbildung ergaben auch hier als günstigstes Medium das CHO-S-SFM II. Die Degradation des ApoA-I während der Expression und der nachfolgenden Anreicherung wurde immer wieder beobachtet. Bedauerlicherweise wurde in den entsprechenden Veröffentlichungen nichts darüber berichtet. Persönliche Mitteilungen verschiedener Arbeitsgruppen bestätigten jedoch die Observationen dieser Experimente. Lediglich Pyle *et al.* erwähnten eine ausgeprägte Degradation des exprimierten ApoA-I, die interessanterweise bei Einsatz der Proteaseinhibitoren Leupeptin und Pepstatin vermindert auftrat [117]. Normalerweise assoziiert ApoA-I nach seiner Sezernierung ins Plasma sofort mit Lipiden zu einer Vorstufe der HDL. Diese Assoziation stabilisiert das Protein. Bei der Expression rekombinanten ApoA-I in Zellkultur ist dies nur begrenzt möglich. Die Arbeiten von Forte *et al.* konnten zeigen, daß auch bei der Expression von r-ApoA-I in CHO-Zellen ein kleiner Anteil mit Lipiden assoziiert ist, der Hauptanteil liegt jedoch lipid-frei vor [112, 113]. Inwieweit hier Proteasen, mechanische Instabilität oder Autoproteolyse bei der Degradation eine Rolle spielen, ist bislang noch nicht geklärt.

Als ein weiterer Ansatz zur Optimierung der Expressionsbedingungen wurde der Einsatz der MiniPerm<sup>®</sup> bezüglich der Proteinexpression in CHO-Zellen untersucht. Die MiniPerm<sup>®</sup> ermöglicht es, eine sehr hohe Zellzahl in einem relativ geringen Volumen zu erzeugen, die Versorgung der Zellen ist durch Kombination von Produktionsmodul und Versorgungsmodul gewährleistet. Zur Zeit eignen sich nur Zelllinien, die auch in Suspension proliferieren können. CHO-Zellen, die normalerweise adhärent wachsen, können



unter besonderen Bedingungen auch in Suspension kultiviert werden. Speziell das verwendete CHO-S-SFM II Medium wurde auch für Anwendungen dieser Art entwickelt. Wie gezeigt werden konnte, nahm die Lebendzellzahl der CHO-Zellen während der Kultivierung ständig zu. Die Anzahl der toten Zellen blieb immer unter 5 %. Die Versuche zur Expression von rekombinantem ApoA-I mit Hilfe der MiniPerm<sup>®</sup> wurden unternommen, um eine möglichst große Anreicherung von rekombinantem Protein im Zellkulturmedium zu erreichen. Zeit- und kostenaufwendige Zellkulturarbeiten könnten minimiert werden, nachfolgende, immer mit hohen Verlusten verbundene Konzentrierungsschritte, könnten entfallen. Dies würde anschließende Isolations- oder Charakterisierungsschritte deutlich vereinfachen. Wie jedoch gezeigt werden konnte, ist diese Form der Proteinexpression für ApoA-I nicht, oder nur in begrenztem Rahmen, geeignet. Wie die Ergebnisse zeigten, konnte zwar eine hohe ApoA-I-Konzentration im Medium erzielt werden, gleichzeitig war das Protein jedoch erheblich fragmentiert. Eine Ursache für diese Fragmentierung könnten zelleigene Proteasen gewesen sein, die sich hier ebenfalls angereichert hatten. Der Einsatz von Proteaseinhibitoren zum Medium könnte hier Abhilfe verschaffen. Angesichts des großen Volumens an Medium und der Preise für Proteaseinhibitoren wäre dies aber sicherlich keine wirtschaftliche Lösung. Eine weitere Ursache der Fragmentierung könnte mechanischen Ursprungs gewesen sein. Durch die stetige Rotation der MiniPerm<sup>®</sup> wurden alle Inhaltsstoffe ständig durcheinandergemischt. Was für die Versorgung der Zellen lebensnotwendig war, könnte für das ApoA-I negative Auswirkungen gehabt haben. Ähnliche Beobachtungen bezüglich der Fragmentierung wurden auch beim Aufkonzentrieren verdünnter ApoA-I Lösungen mittels gerührter Ultrafiltration (Amicon-Kammern) gemacht, weshalb hier auf ein anderes Verfahren zurückgegriffen wurde. Eine andere, bereits oben ausgeführte Erklärung besteht in der prinzipiellen Neigung von ApoA-I in angereicherter Konzentration zu fragmentieren. Eine mögliche Autoproteolyse konnte ebenfalls bis heute nicht sicher ausgeschlossen werden. Letztendlich scheint die Expression rekombinanten ApoA-I mit der MiniPerm<sup>®</sup> trotz der vielversprechenden Möglichkeiten keine brauchbare Methode zu sein.

Die Anfälligkeit des ApoA-I für Degradation wurde bereits mehrfach erwähnt. Bekanntlich wird ApoA-I als Präproprotein synthetisiert und unterliegt bereits intrazellulär einer Proteolyse zu ProApoA-I sowie nachfolgend intraplasmatisch einer Proteolyse zu ApoA-I [122-124]. Es gibt bereits Hinweise aus *in vitro* Untersuchungen, die die Proteolyseneigung von ApoA-I belegen [125, 126]. Dabei wurden sowohl N-terminale als auch C-terminale Proteolysen dokumentiert [127-130]. Zur weiteren Analyse der

Degradation von ApoA-I wurden in dieser Arbeit zahlreiche verschiedene Proteaseinhibitoren hinsichtlich ihres Einflusses während der Proteinexpression getestet. Pyle *et al.* konnte eine verminderte Proteolyse von ApoA-I im Baculovirus Expressionssystem durch den Zusatz von Leupeptin und Pepstatin zeigen [117]. In der vorliegenden Arbeit konnte ein positiver Einfluß nur für den Inhibitor Pepstatin bestätigt werden. Bei Verwendung dieses Inhibitors während der ApoA-I-Expression in CHO-Zellen konnte sowohl eine Erhöhung der Menge an exprimiertem Protein als auch eine Verminderung der Degradationsprodukte gezeigt werden. Inwieweit hier möglicherweise eine spezifische Protease inhibiert wird, bedarf noch weiterer umfangreicher Analysen. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Veröffentlichungen von Gregg *et al.* und Kunitake *et al.* [131, 132]. Beide Arbeitsgruppen beschreiben das *in vivo* Vorkommen eines ApoA-I Fragments von ca. 26 kDa sowie eines ca. 14 kDa Fragments, welche N-terminal intakt waren. Die *in vitro* allgegenwärtige Proteolyse könnte somit eine Eigenschaft von ApoA-I darstellen, die das physiologische Verhalten reflektiert. Bemerkenswerterweise entstanden während der Proteinexpression und der nachfolgenden Anreicherung immer wieder ähnliche Fragmente. Auffällig waren dabei ein 26 kDa und 22 kDa Fragment sowie Fragmente im Bereich von 10-14 kDa. Mit zunehmender Degradation des Proteins war erst das Erscheinen eines 26 kDa Fragments zu beobachten, welches dann zugunsten des 22 kDa und der kleineren Fragmente verschwand (siehe Abbildung 42). Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei den Expressionssystemen *E. coli* und Baculovirus/Sf9-Zellen gemacht werden (Schmidt *et al.* [116, 133]). Mit Hilfe der PrepCell® konnten ein 22 kDa Fragment und ein 10 kDa Fragment isoliert werden. Eine Sequenzanalyse zeigte, daß beide Fragmente N-terminal intakt waren. Massenspektroskopische Analysen ergaben für das 22 kDa Fragment ein ApoA-I, welches aus den ersten 187 Aminosäuren des nativen ApoA-I bestand (ApoA-I<sub>(1-187)</sub>). Für das 10 kDa Fragment ergab sich daraus ein trunkiertes ApoA-I<sub>(1-87)</sub>.

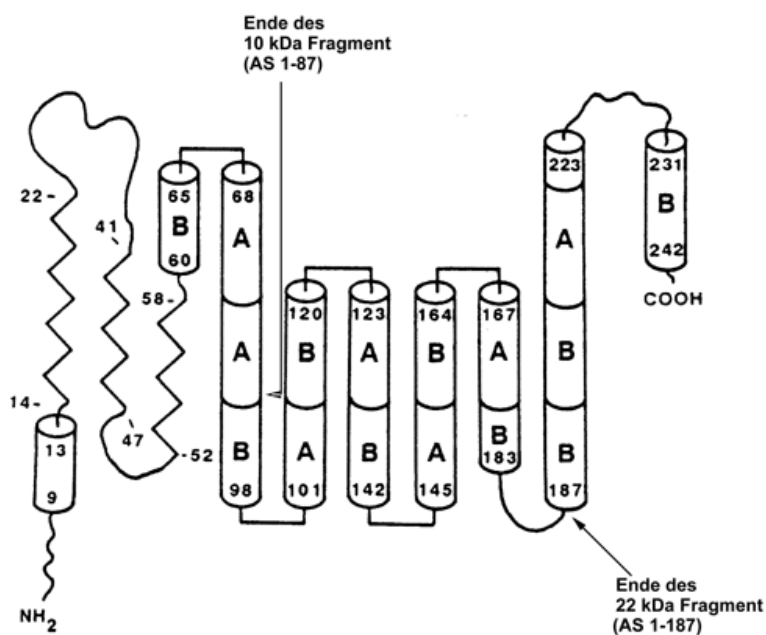


Abbildung 104: Sekundärstruktur des ApoA-I mit den Spaltstellen der identifizierten Fragmente ApoA-I(1-187) und ApoA-I(1-87)

Die Abbildung 104 stellt die vermutete Sekundärstruktur des ApoA-I dar. Die beiden identifizierten trunkierten Proteine sind markiert. Die *in vitro* Analysen legen die Vermutung nahe, daß das intakte ApoA-I über das 26 kDa Fragment zum 22 kDa Fragment und darüber hinaus zu vielen weiteren kleineren Fragmenten degradiert. Das Entstehen des 22 kDa Fragmentes führt zu dem Verlust der bekannten 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 entsprechende kleinere Fragmente bis zur kompletten Degradation von ApoA-I führt.

Bei der Anreicherung und Isolierung der rekombinant exprimierten Proteine wurden verschiedene Verfahren getestet. In der Literatur ist ein weites Spektrum an Anreicherungsverfahren beschrieben [96-98, 100, 101, 111, 134-138]. Als günstig haben sich dabei die Verfahren gezeigt, bei denen unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet werden konnte. Die Denaturierung ist in der Regel für ApoA-I unproblematisch, da es bei Inkubation mit Serum sofort mit den Lipoproteinfraktionen assoziiert und dort seine natürliche Lipoprotein-gebundene Struktur wieder annehmen kann. Anreicherungsverfahren mit dem nativen Protein wurden häufig durch massive Fragmentierung des Proteins beeinträchtigt. Das native r-ApoA-I, gewonnen durch Proteinexpression, liegt im Zellkulturmedium in einer Lipid-armen bzw. Lipid-freien Form vor, der Schutz durch die Assoziation mit den Lipoproteinen entfällt. Damit wird das

Protein gegenüber Proteasen, aber auch mechanischen Einwirkungen empfänglich. Besonders bei der Gelfiltrationschromatographie war diese Eigenschaft besonders ausgeprägt. Mögliche Ursachen könnten hierfür das Vorhandensein zellulärer Proteasen, die noch nicht abgetrennt werden konnten, aber natürlich auch ein autoproteolytischer Vorgang sowie mechanische Instabilitäten des ApoA-I sein. Unter denaturierenden Bedingungen wie z.B. bei der Reversed Phase Chromatographie und bei den elektrophoretischen Methoden war das Problem der Degradation weniger ausgeprägt. Analog kann man hier mit einer Denaturierung und damit Inaktivierung der zelleigenen Proteasen sowie der Verminderung einer eventuellen Autoproteolyse argumentieren. Ein weiteres Problem während der Anreicherung stellte die Hydrophobizität des ApoA-I dar. Aus diesem Grund löste sich das Protein nur sehr langsam von einigen Chromatographiematerialien, was zu Verbreiterungen der Peaks in der Säulenchromatographie führte. Bei allen Anwendungen, bei denen Membranen verwendet wurden, z.B. Ultrafiltrationen, mußten hohe Proteinverluste in Kauf genommen werden, da das Protein von diesen Membranen schlecht zu lösen war. So war es Ziel dieser Arbeit, einen Weg zu finden, der möglichst wenige Anreicherungs- und Konzentrierungsschritte enthielt. Die besten Ergebnisse wurden mit der Reversed Phase Chromatographie erzielt. Hier konnte das Protein in sehr guter Ausbeute und Reinheit erhalten werden. Der Anteil an Fragmenten war relativ gering. Die anschließende Konzentrierung konnte durch schonende Lyophilisierung der entsprechenden Säulenfraktionen vorgenommen werden. Die elektrophoretischen Methoden (Elektroelution, PrepCell<sup>®</sup>) haben sich prinzipiell als ebenfalls geeignete Methoden zur Anreicherung von ApoA-I erwiesen. Allerdings sind diese Methoden zeitaufwendig und somit als Standardmethoden weniger geeignet. Auch lassen sich mit Hilfe gelelektrophoretischer Methoden nur kleine Mengen an Protein anreichern, bei größeren Mengen müßten mehrere Anreicherungs-schritte durchgeführt werden. Bei der gezielten Isolation spezieller Bruchstücke hat sich jedoch die präparative Elektrophorese (PrepCell<sup>®</sup>) als ausgesprochen günstige Methode erwiesen. Mit ihr konnten ApoA-I Fragmente von wenigen kDa Unterschied im Molekulargewicht voneinander getrennt werden [139]. Bei entsprechender Optimierung sind hier sicherlich noch weitere Verbesserungen möglich.

Die Charakterisierung der rekombinant exprimierten Proteine erfolgte über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Westernblotanalyse und isoelektrische Fokussierung. Mit der SDS-PAAGE konnte das Molekulargewicht von 28 kDa für ApoA-I bestätigt werden. Als Vergleich diente ApoA-I isoliert aus humanen HDL. In der isoelektrischen

Fokussierung von r-ApoA-I<sub>WT</sub> konnten dieselben Isoformen nachgewiesen werden, die auch bei der Analyse humaner HDL erhalten werden. Zusätzlich konnte eine Bande mit einer Verschiebung um +2 gegenüber der Hauptbande nachgewiesen werden, bei der es sich um ProApoA-I handelte. Die Charakterisierung von r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> ergab eine Verschiebung der Hauptbande um +1, begründet durch den veränderten isoelektrischen Punkt des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> verglichen mit r-ApoA-I<sub>WT</sub> [59]. Ursache für die Verschiebung im IEF-Gel ist die Zunahme der Nettoladung des Proteins, bedingt durch den Austausch der Aminosäure Gly<sub>26</sub>→Arg.

Zur Untersuchung der physiologischen Integrität der rekombinant exprimierten Proteine wurden stoffwechselkinetische Untersuchungen am Kaninchenmodell durchgeführt. Stoffwechselkinetische Untersuchungen stellen ein hochsensitives Verfahren dar, um die *in vivo* Assoziationsfähigkeit der Apolipoproteine mit den entsprechenden Lipoproteinfraktionen sowie ihren *in vivo* Metabolismus zu überprüfen. Durch die Verwendung verschiedener Marker ist es möglich, den Metabolismus mehrerer Proteine simultan in einem Kaninchen zu verfolgen. Das Kaninchen stellt ein geeignetes und gut charakterisiertes Modell für den menschlichen Lipoproteinstoffwechsel dar [102-107, 140, 141]. Für die stoffwechselkinetischen Untersuchungen war es notwendig, möglichst fragmentfreies ApoA-I einzusetzen. Die amphiphilen Apolipoproteine sind jedoch im nativen, nicht mit Lipiden assoziierten Zustand sehr anfällig bezüglich einer Degradation und Oxidation. Oxidierte oder degradierte Proteine können nicht mehr oder nur noch teilweise mit der HDL-Fraktion assoziieren. Aus diesem Grund war es notwendig, nach der Radioiodmarkierung die markierten Proteine nochmals aufzureinigen. Zur Abtrennung der Fragmente wurden deshalb die radiomarkierten Proteine sofort nach der Markierung mit autologem Kaninchenserum inkubiert. Im Serum findet sofort ein Austausch der markierten Apolipoproteine mit den Apolipoproteinen des Kaninchens statt. Nur intaktes ApoA-I kann mit der HDL-Fraktion assoziieren. Nach Isolation der HDL-Fraktion hat man deshalb nur noch die auch tatsächlich assoziierten Apolipoproteine vorliegen. Zunächst wurde die Abtrennung der HDL mittels Ultrazentrifugation vorgenommen, später auch mit Hilfe gelchromatographischer Methoden. Mit diesen stoffwechselkinetischen Untersuchungen wurden zunächst rekombinant exprimiertes ApoA-I<sub>WT</sub> mit ApoA-I isoliert aus humanen HDL verglichen. *In vitro* konnte die Identität zwischen humanem ApoA-I und r-ApoA-I<sub>WT</sub> bereits gezeigt werden. Erstmals liegen nun mit Hilfe der stoffwechselkinetischen Untersuchungen *in vivo* Daten vor. Der Vergleich humanen ApoA-I mit r-ApoA-I<sub>WT</sub> bestätigte nun auch die physiologische Identität der

beiden Proteine. Die Stoffwechselkinetik sowie nachfolgende Analysen der Kaninchenserum waren für natives humanes ApoA-I sowie für rekombinant hergestelltes ApoA-I identisch.

Verschiedene natürlich vorkommende Mutationen von ApoA-I wurden beschrieben, welche die Funktionen des ApoA-I beleuchten [55, 57, 64, 67, 70-72, 74-76, 142-146]. Hierbei sind Mutationen im N-terminalen Bereich von ApoA-I beschrieben, die zu Amyloidablagerungen führen [58-63]. Diese Ablagerungen bestehen aus Proteinfibrillen mit  $\beta$ -Faltblattstruktur. Analyse der Fibrillen ergab, daß sie aus N-terminalen Fragmenten des ApoA-I bestehen (Aminosäure 1-83 bis 97). Stellvertretend für diese Mutationen wurde die als ApoA-I<sub>Iowa</sub> beschriebene Mutante mit Hilfe des beschriebenen Zellsystems exprimiert. Der strukturchemische Einfluß dieser Mutation wurde nach Aufreinigung des Proteins mit Hilfe der Stoffwechselkinetiken analysiert. Erste stoffwechselkinetische Untersuchungen wurden 1986 von Rader *et al.* durchgeführt, der ApoA-I<sub>Iowa</sub> aus dem Serum entsprechender Patienten isolierte [60]. Diese Patienten waren jedoch hinsichtlich der vorliegenden Mutation heterozygot, so daß neben ApoA-I<sub>Iowa</sub> auch immer normales ApoA-I vorlag. Eine Trennung der beiden ApoA-I-Formen war nicht möglich, so daß auch in den entsprechenden kinetischen Untersuchungen beide Varianten parallel vorlagen. In dieser Arbeit liegen nun Ergebnisse aus Untersuchungen mit reinem r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> im Tiermodell vor. In einem weiteren stoffwechselkinetischen Experiment wurden r-ApoA-I<sub>WT</sub> und r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> miteinander verglichen. Der Vergleich r-ApoA-I<sub>WT</sub> mit r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> zeigte einen deutlich beschleunigten Katabolismus des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>. Der gesteigerte Katabolismus liegt vermutlich in einer veränderten Sekundärstruktur des ApoA-I<sub>Iowa</sub> begründet, verursacht durch den Austausch der Aminosäure Gly<sub>26</sub>→Arg und der damit verbundenen Ladungsänderung des Proteins. Diese strukturchemische Veränderung könnte mit einer Veränderung der HDL-Affinität verbunden sein sowie mit einer erhöhten Anfälligkeit zur Proteolyse. Die Amyloidablagerungen bei ApoA-I<sub>Iowa</sub> bestehen aus N-terminalen Fragmenten mit 1-83 Aminosäuren [58, 59]. Inwieweit der Aminosäureaustausch an Position 26 der Aminosäuresequenz die Spaltung an Position 83 beeinflusst, ist derzeit noch ungeklärt. Sehr interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Matsunaga *et al.*, der eine ApoA-I Variante entdecken konnte, die aufgrund einer Nonsense-Mutation im Codon 84 des ApoA-I Gens nur aus einem N-terminalen 1-83 Aminosäure langen Fragment des normalen ApoA-I besteht [145]. Bei dem betroffenen Patienten sind jedoch keinerlei Amyloidablagerungen nachweisbar, was bedeutet, daß das Vorhandensein des N-terminalen Fragments allein nicht ausreicht, um

Amyloidablagerungen zu bilden. Die Ablagerung des Fragmentes bei ApoA-I<sub>Iowa</sub> ist deshalb eine Folge der Ladungsverschiebung und damit verbundener struktureller Veränderungen. Zusätzlich ergaben die stoffwechselkinetischen Untersuchungen, daß r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>, verglichen mit dem Wildtyp, ein etwas anderes Assoziationsverhalten zeigte. So erwies sich bereits bei der Isolation der HDL-Fraktion mittels Gelchromatographie, daß das Aktivitätsmaximum für r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> etwas später von der Säule eluierte als bei r-ApoA-I<sub>WT</sub>. Mögliche Ursachen hierfür könnten eine Assoziation des ApoA-I<sub>Iowa</sub> mit HDL-Fraktionen höherer Dichte sein. Im Falle einer schnellen Degradation des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> wäre eine weitere Möglichkeit das Vorliegen von Fragmenten, welche mit der Albuminfraktion assoziiert sind. Für die stoffwechselkinetischen Untersuchungen wurden deshalb zwei Fraktionen der gelchromatographischen Auftrennung des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> eingesetzt. Ein Teil der Experimente wurden mit der Fraktion des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> durchgeführt, die der eigentlichen HDL-Fraktion entsprechen sollte (erstes Aktivitätsmaximum für r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>) und mit r-ApoA-I<sub>WT</sub> verglichen. Der andere Teil der Experimente wurde mit dem eigentlichen Aktivitätsmaximum des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> durchgeführt und ebenfalls mit r-ApoA-I<sub>WT</sub> verglichen. Beide Experimente zeigten einen vergleichbaren beschleunigten Metabolismus des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>. Anschließende Analysen der zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion der markierten Proteine gewonnenen Kaninchenserum zeigten sowohl in der gelchromatographischen Analyse wie auch in der Dichtegradienten-UZ ein verändertes Assoziationsverhalten des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> im Vergleich zum r-ApoA-I<sub>WT</sub>. Die Auftrennung des Kaninchenserums über eine Superose 6-Säule lieferte zwei dicht aufeinander folgende Aktivitätspeaks. Zur Identifikation dieser beiden Aktivitätsmaxima bei den säulenchromatographischen Auftrennungen wurden die Fraktionen der FPLC-Analyse des Serums 5 Minuten nach Injektion von r-ApoA-I<sub>WT</sub> und r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> (nach Injektion des ersten Aktivitätsmaximums für r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>) nochmals über eine Dichtegradienten-UZ aufgetrennt. Die beiden Peaks konnten dabei eindeutig als HDL<sub>2</sub>- bzw HDL<sub>3</sub>-Fraktion identifiziert werden (vergl. Abbildung 99 und Abbildung 100). In beiden Aktivitätspeaks der säulenchromatographischen Auftrennung war ebenfalls r-ApoA-I<sub>WT</sub> zu finden, der Hauptanteil des r-ApoA-I<sub>WT</sub> war jedoch mit der HDL<sub>2</sub>-Fraktion assoziiert. Die Analysen der Seren der Blutentnahmen 5 Minuten nach Injektion des ersten Aktivitätsmaximums von r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> zeigten in der Dichtegradienten-UZ ein Assoziationsverhalten ähnlich dem r-ApoA-I<sub>WT</sub>, d.h. verstärkt mit der HDL<sub>2</sub>-Fraktion. Die Analysen der Seren nach Injektion des 2. Aktivitätsmaximums zeigten verstärkt eine Assoziation mit der HDL<sub>3</sub>-Fraktion. Interessanterweise waren diese Unterschiede bei der Analyse der Seren 1 Stunde nach

Injektion nicht mehr vorzufinden. Unabhängig davon, welche Aktivitätsfraktion des r-ApoA-I<sub>lowa</sub> den Kaninchen injiziert wurde, fand man eine verstärkte Assoziation von r-ApoA-I<sub>lowa</sub> mit der HDL<sub>3</sub>-Fraktion in FPLC und Dichtegradienten-UZ. Das veränderte Assoziationsverhalten von r-ApoA-I<sub>lowa</sub> wird durch die Ergebnisse von Rader *et al.* bestätigt [60]. Möglicherweise sind die unterschiedlichen Affinitäten des r-ApoA-I<sub>lowa</sub> zu den verschiedenen Zeitpunkten Momentaufnahmen des beschleunigten Katabolismus. Entstehende HDL<sub>2</sub>-r-ApoA-I<sub>lowa</sub>-Partikel tauschen ihr r-ApoA-I<sub>lowa</sub> sehr schnell mit HDL<sub>3</sub>-Partikeln aus, welche anscheinend schneller metabolisiert werden.

Ein weiteres Experiment sollte klären, inwiefern eine Assoziation der rekombinanten Proteine mit der Albuminfraktion des Serums vorlag. Dazu wurden die Fraktionen einer FPLC-Auftrennung eines Kaninchenserums nach Injektion der markierten Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und einzelne Banden dieses Elektrophoresegels auf ihren Gehalt an <sup>131</sup>I-r-ApoA-I<sub>WT</sub> und <sup>125</sup>I-r-ApoA-I<sub>lowa</sub> untersucht. In den Albumin enthaltenden Gelbanden konnten beide Proteine nachgewiesen werden, jedoch war der Anteil des r-ApoA-I<sub>lowa</sub> deutlich höher. Inwieweit hier eine Assoziation des intakten Proteins oder vielleicht eine Anreicherung und Assoziation entstandener Fragmente mit der Albuminfraktion vorlag, kann zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden

In der vorliegenden Arbeit wurde eine gesteigerte Degradationsanfälligkeit des nativen, d.h. lipidfreien ApoA-I *in vitro* immer wieder beobachtet. Für r-ApoA-I<sub>lowa</sub> konnte *in vivo* zusätzlich eine veränderte Lipidassoziation und ein schnellerer Katabolismus aufgezeigt werden. Aufgrund einer vermutlich verminderten Lipidassoziation könnte das r-ApoA-I<sub>lowa</sub> schneller in einen lipidfreien Zustand übergehen, dort einer Degradation unterliegen und somit schneller katabolisiert werden. Inwieweit bei der Degradation spezifische Proteasen beteiligt sind, mechanische Instabilität eine Rolle spielt oder vielleicht ein autoproteolytischer Prozeß vorliegt, konnte bislang noch nicht geklärt werden.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

High Density Lipoproteine (HDL) spielen als antiatherogener Faktor infolge der Funktion im reversen Cholesterintransport eine besondere physiologische Rolle. Das Hauptstrukturprotein der HDL, das Apolipoprotein A-I (ApoA-I), determiniert die Serumkonzentration der HDL-Fraktion im Plasma. Eine gesteigerte Synthese von ApoA-I führt zu erhöhten Serumkonzentrationen der HDL-Fraktion, während ein gesteigerter ApoA-I Katabolismus typischerweise zu einer erniedrigten HDL-Fraktion führt. Der katabole Weg von ApoA-I ist bisher nicht näher charakterisiert worden. Kenntnisse dieses Katabolismus tragen deshalb dazu bei, die Verstoffwechslung der HDL zu verstehen. Mutationen im ApoA-I können drastische Störungen im ApoA-I- und HDL-Stoffwechsel bewirken. So führt z.B. eine Punktmutation des ApoA-I (ApoA-I<sub>Iowa</sub>, Gly<sub>26</sub>→Arg) zu einem deutlich veränderten Metabolismus; die Folge sind ApoA-I<sub>(1-83)</sub> Fragmente, die aggregiert im Gewebe nachzuweisen sind.

Gegenstand dieser Arbeit war die Optimierung der Genexpression von rekombinantem humanem ApoA-I und r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> in CHO-Zellen sowie die nachfolgende Anreicherung und Charakterisierung der rekombinanten Proteine. Die CHO-Zellen waren mit der Gensequenz für humanes ApoA-I bzw. ApoA-I<sub>Iowa</sub> sowie einem vorgeschalteten Zink-induzierbaren Metallothioninpromotor stabil transfiziert. Besonderer Wert wurde, neben der Maximierung der Expressionsrate, auf eine Minimierung des Auftretens von Fragmenten des ApoA-I gelegt, da ApoA-I im lipidfreien Zustand sehr degradationsanfällig ist. Als optimales Expressionsmedium erwies sich CHO-S-SFM II (Gibco, Life Technologies, Berlin, Deutschland) bei einer Zinkkonzentration von 80 µM und einer Kultivierungsdauer von 72 Stunden. Die hierbei erzielte Expressionsrate lag bei 20-30 µg/ml ApoA-I im Zellkulturmedium. Interessanterweise wurden sowohl bei der Expression als auch später bei den Aufreinigungsschritten stetig ApoA-I Fragmente nachgewiesen. Infolge einer möglichen Proteolyse wurde deshalb zur Minimierung der Fragmentbildung der Einfluß verschiedener Proteaseinhibitoren während der Proteinexpression getestet. Eine verminderte Degradation sowie eine Erhöhung der exprimierten ApoA-I Menge konnte unter dem Einfluß des Inhibitors Pepstatin festgestellt werden.

Bei der Anreicherung der rekombinant exprimierten Proteine wurden verschiedene Verfahren getestet, ebenfalls unter Berücksichtigung der Fragmentbildung. Als günstig bezüglich der ApoA-I Degradation haben sich solche Verfahren erwiesen, die unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurden. Die Denaturierung stellt für ApoA-I kein Problem dar, da es unter physiologischen Bedingungen sofort mit der HDL-Fraktion

assoziiieren und dort seine entsprechende Struktur wieder einnehmen kann. Als Standardverfahren zur quantitativen Isolation der rekombinanten Proteine wurde die Reversed Phase Chromatographie etabliert. Mit Hilfe der präparativen Elektrophorese konnte zusätzlich ein Verfahren entwickelt werden, mit dem sich ApoA-I Fragmente von wenigen kDa Unterschied im Molekulargewicht voneinander trennen ließen. Die Aminosäuresequenz- und massenspektroskopische Analyse der Bruchstücke ergab N-terminal intakte ApoA-I Fragmente mit 187 bzw. 87 Aminosäuren (ApoA-I<sub>(1-187)</sub> und ApoA-I<sub>(1-87)</sub>). Die Neigung zur carboxyterminalen Spaltung des ApoA-I konnte damit belegt werden.

Zur Untersuchung des physiologischen Verhaltens wurden stoffwechselkinetische Untersuchungen im Kaninchenmodell durchgeführt. Hier wurde zunächst rekombinant exprimiertes r-ApoA-I<sub>WT</sub> mit ApoA-I isoliert aus humanen HDL (h-ApoA-I) verglichen. Für beide Proteine konnte ein identischer *in vivo* Metabolismus und eine vergleichbare Lipidassoziation nachgewiesen werden. Die identische Lipidassoziation von r-ApoA-I<sub>WT</sub> und h-ApoA-I konnte auch nach Inkubation im Humanserum bestätigt werden. Die *in vivo* Charakterisierung von r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> ergab im Vergleich zu r-ApoA-I<sub>WT</sub> einen deutlich beschleunigten Katabolismus des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>. Außerdem konnte eine höhere Affinität des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> zu dichteren HDL-Partikeln nachgewiesen werden. Die veränderte Lipidassoziation von r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> ist bedingt durch die Punktmutation und die daraus wahrscheinlich resultierenden strukturellen Veränderungen des r-ApoA-I<sub>Iowa</sub>. Eine Hypothese zur Erklärung dieser Daten ist, daß das mit dichteren HDL-Fractionen assoziierte r-ApoA-I<sub>Iowa</sub> schneller in einen lipidfreien Zustand übergeht, dort einer Degradation unterliegt und somit schneller katabolisiert wird. Inwieweit bei der Degradation spezifische Proteasen beteiligt sind bzw. eine Autoproteolyse vorliegt oder eine mechanische Instabilität eine Rolle spielt, konnte noch nicht geklärt werden.

## 6 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

|                          |  |
|--------------------------|--|
| ApoA-I                   | Apolipoprotein A-I                         |
| ApoA-II                  | Apolipoprotein A-II                        |
| ApoA-IV                  | Apolipoprotein A-IV                        |
| ApoB                     | Apolipoprotein B                           |
| ApoC                     | Apolipoprotein C                           |
| ApoE                     | Apolipoprotein E                           |
| bidest. H <sub>2</sub> O | bidestilliertes Wasser                     |
| BSA                      | Bovine Serum Albumin                       |
| C-terminal               | carboxyterminal                            |
| cDNA                     | coding Desoxy Ribonucleic Acid             |
| CE                       | Cholesterinester                           |
| CETP                     | Cholesterinestertransferprotein            |
| CHO-Zellen               | Chinese Hamster Ovary Zellen               |
| CM                       | Chylomikronen                              |
| CM-R                     | Chylomikronen-Remnants                     |
| dH <sub>2</sub> O        | destilliertes Wasser                       |
| DMSO                     | Dimethylsulfoxid                           |
| DTT                      | Dithiotreitol                              |
| EDTA                     | Ethylendiamintetraacetat                   |
| FCS                      | Fetal Calf Serum                           |
| FPLC                     | Fast Protein Liquid Chromatography         |
| HAc                      | Essigsäure                                 |
| HDL                      | High Density Lipoprotein                   |
| HTGL                     | Hepatische Triglyzerid Lipase              |
| IDL                      | Intermediate Density Lipoprotein           |
| IEF                      | Isoelektrische Fokussierung                |
| L-Glu                    | L-Glutamin                                 |
| LCAT                     | Lecithin:Cholesterin Acyltransferase       |
| LDL                      | Low Density Lipoprotein                    |
| Lp(a)                    | Lipoprotein (a)                            |
| LPL                      | Lipoproteinlipase                          |
| LRP                      | LDL-Rezeptor related Protein               |
| N-terminal               | aminoterminal                              |
| nasc. HDL                | nascierende High Density Lipoproteine      |
| NZW                      | New Zealand White                          |
| PAAGE                    | Polyacrylamidgelelektrophorese             |
| PBS                      | Phosphat Buffered Saline                   |
| Pen/Strep                | Penicillin/Streptomycin                    |
| r-ApoA-I <sub>Iowa</sub> | rekombinantes Apolipoprotein A-I (Iowa)    |
| r-ApoA-I                 | rekombinantes Apolipoprotein A-I           |
| r-ApoA-I <sub>WT</sub>   | rekombinantes Apolipoprotein A-I (Wildtyp) |
| RPC                      | Reversed Phase Chromatographie             |
| rpm                      | rounds per minute                          |
| SDS                      | Sodiumdodecylsulfat                        |
| Sf9-Zellen               | Spodoptera fungiperda Insektenzellen       |
| TCA                      | Trichloric Acid                            |
| TEMED                    | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin         |
| TFA                      | Trifluoressigsäure                         |
| UZ                       | Ultrazentrifugation                        |
| VHDL                     | Very High Density Lipoprotein              |
| VLDL                     | Very Low Density Lipoprotein               |



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Dargel, R., Biochemie und Pathobiochemie der Lipoproteine: Lipoproteine und Atherosklerose. **1991**, Berlin: Akademie Verlag.
2. Kostner, G.M. and W. März, Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine, in *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*, P. Schwandt and W.O. Richter, Editors. **1995**, Schattauer: Stuttgart. p. 4-47.
3. Sheperd, J., Lipoprotein metabolism. *Drugs*, **1994**. 47 Suppl. 2: p. 1-10.
4. Osborne, J.C. and H.B. Brewer, The Plasma Lipoproteins. *Advances in Protein Chemistry*, **1977**. 31: p. 253-336.
5. Morrisett, J.D., R.L. Jackson, and A.M.j. Gotto, Lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1977**. 472: p. 93-133.
6. Dominiczak, M.H., Lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, **1996**. 7: p. U85-U91.
7. Schaefer, E.J., S. Eisenberg, and R.I. Levy, Lipoprotein apoprotein metabolism. *Journal of Lipid Research*, **1996**. 19: p. 667-687.
8. Cham, B.E., Importance of apolipoproteins in lipid metabolism. *Chemical and Biological Interactions*, **1978**. 20: p. 263-277.
9. Jackson, R.L., J.D. Morrisett, A.M.j. Gotto, and J.P. Segrest, The mechanism of lipid-binding by plasma lipoproteins. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **1975**. 6 No1: p. 43-50.
10. 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.
11. Anantharamaiah, G.M., C.G. Brouillette, J.A. Engler, H. De Loof, Y.V. Venkatachalapathi, J. Boogaerts, and J.P. Segrest, Role of amphipathic helices in HDL structure/function. *Advanced Experimental Medicinal Biology*, **1991**. 285: p. 131-140.
12. Frank, P.G., J. Bergeron, F. Emmanuel, J.-P. Lavigne, D.L. Sparks, P. Deneffe, E. Rassart, and Y.L. Marcel, Deletion of central  $\alpha$ -helices in human apolipoprotein A-I: effect on phospholipid association. *Biochemistry*, **1997**. 36: p. 1798-1806.
13. Leblond, L. and Y.L. Marcel, The amphipathic  $\alpha$ -helical repeats of apolipoprotein A-I are responsible for binding of high density lipoproteins to HepG<sub>2</sub> cells. *Journal of Biological Chemistry*, **1991**. 266 No10: p. 6058-6067.
14. 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.

15. Barter, P.J. and K.-A. Rye, Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. *Current Opinion in Lipidology*, **1996**. 7: p. 82-87.
16. Fielding, C.J. and P.E. Fielding, Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *Journal of Lipid Research*, **1995**. 36: p. 211-228.
17. Schmidt, H.H.-J. and M.P. Manns, Reverse cholesterol transport. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, **1996**. 34: p. 386-391.
18. Meng, Q.H., J. Bergeron, D.L. Sparks, and Y.L. Marcel, Role of apolipoprotein A-I in cholesterol transfer between lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, **1995**. 270 No15: p. 8588-8596.
19. Francone, O.L. and C.J. Fielding, Initial steps in reverse cholesterol transport: the role of short-lived cholesterol acceptors. *European Heart Journal*, **1990**. 11 Suppl E: p. 218-224.
20. Davidson, W.S., S. Lund-Katz, W.J. Johnson, G.M. Anantharamaiah, M.N. Palgunachari, J.P. Segrest, G.H. Rothblat, and M.C. Phillips, The influence of apolipoprotein A-I structure on the efflux of cellular free cholesterol to high density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, **1994**. 269: p. 22957-22982.
21. Bierman, E.L., J. Oram, and A. Mendez, HDL receptor-mediated cholesterol efflux from cells and its regulation. *Advanced Experimental Medicinal Biology*, **1991**. 285: p. 81-83.
22. Pownall, H.J., J.D. Morrisett, J.T. Sparrow, L.C. Smith, J. Shepherd, R.L. Jackson, and A.M.j. Gotto, A review of the unique features of HDL apoproteins. *Lipids*, **1979**. 14 No4: p. 428-434.
23. McLean, L.R. and M.C. Phillips, Mechanism of cholesterol and phosphatidylcholine exchange or transfer between unilamellar vesicles. *Biochemistry*, **1981**. 20: p. 2893-2900.
24. 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.
25. Bruckdorfer, K.R., J. Crowe, and M.K. Sherry, Evidence of water soluble intermedicate in exchange of cholesterol between membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1884**. 778: p. 489-496.
26. Barrans, A., B. Jaspard, B. R., H. Chap, B. Perret, and X. Collet, Pre- $\beta$  HDL: structure and metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1996**. 1300: p. 73-85.
27. Brewer, H.B., D. Rader, S. Fojo, and J.M. Hoeg, Frontiers in the analysis of HDL structure, function, and metabolism, in *Disorders of HDL*, L.A. Carlson, Editor. **1990**, Smith-Gordon. p. 51-58.
28. Kostner, G.M., High-density-Lipoproteine: Der Status quo. *Wiener Klinische Wochenschrift*, **1980**. 19: p. 665-672.

29. Loeb, J. and G. Dawson, High density lipoprotein exchange reactions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **1983**. 52: p. 161-176.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Barbaras, R., P. Puchois, A. Pradines-Figueroes, A. Steinmetz, V. Clavey, N. Ghalim, J.-C. Fruchart, and G. Ailhaud, Binding of apolipoproteins A to adipose cells: role of receptors sites in cholesterol efflux and purification of binding proteins. *Advanced Experimental Medicinal Biology*, **1991**. 285: p. 85-92.
34. 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 No 28: p. 18780-18785.
35. Brouillette, C.G. and G.M. Anantharamaiah, Structural models of human apolipoprotein A-I. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1995**. 1256: p. 103-129.
36. 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.
37. 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.
38. Brewer, H.B., T. Fairwell, A. LaRue, R. Ronan, A. Houser, and T.J. Bronzert, The amino acid sequence of human apoA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1978**. 80: p. 623-630.
39. Brewer, H.B., T. Fairwell, T. Kay, M. Meng, R. Ronan, S. Law, and J.A. Light, Human plasma proApoA-I: Isolation and amino-terminal sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1983**. 113: p. 626-632.
40. Cheung, P. and L. Chan, Nucleotidesequence of cloned cDNA of human apolipoprotein A-I. *Nucleic Acid Research*, **1983**. 11: p. 3703-3715.
41. Karathanasis, S.K., V.I. Zannis, and J.L. Breslow, Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **1983**. 80: p. 6147-6151.

42. Law, S.W. and H.B. Brewer, Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human apolipoprotein A-I mRNA. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **1984**. 81: p. 66-77.
43. 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.
44. Segrest, J.P., M.K. Jones, H. De Loof, C.G. Brouillette, 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. Benvenega, S., H.J. Cahnmann, and J. Robbins, The thyroxine-binding site of human apolipoprotein A-I: Location in the N-terminal domain. *Endocrinology*, **1991**. 128(1): p. 547-552.
49. Banka, C.L., A.S. Black, and L.K. Curtiss, Localization of an apolipoprotein A-I epitope critical for lipoprotein-mediated cholesterol efflux from monocytic cells. *Journal of Biological Chemistry*, **1994**. 269 No14: p. 10288-10297.
50. Laccotripe, M., S.C. Makrides, A. Jonas, and V.I. Zannis, The carboxyl-terminal hydrophobic residues of apolipoprotein A-I affect its rate of phospholipid binding and its association with high density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, **1997**. 272 no 28: p. 17511-22.
51. Meng, Q.H., L. Calabresi, J.-C. Fruchart, and Y.L. Marcel, Apolipoprotein A-I domains involved in the activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, **1993**. 268 No23: p. 16966-16973.
52. 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 No 23: p. 16553-16560.
53. Fielding, C.J., V.G. Shore, and P.E. Fielding, A protein cofactor of lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1972**. 46 No.4: p. 1493-1498.



54. Sorci-Thomas, M., M.W. Kearns, and J.P. Lee, Apolipoprotein A-I domains involved in lecithin cholesterol acyltransferase activation. *Journal of Biological Chemistry*, **1993**. 268 No.28: p. 21403-21409.
55. Von Eckardstein, A., H. Funke, M. Walter, K. Altland, A. Benninghoven, and G. Assmann, Structural analysis of human apolipoprotein A-I variants. *Journal of Biological Chemistry*, **1990**. 265(15): p. 8610-8617.
56. Assmann, G. and H.J. Menzel, Frequency of apolipoprotein A-I mutants in the german population. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, **1984**. 22: p. 585-589.
57. Ladas, J.A.A., P.O. Kwiterovich, H.H. Smith, S.K. Karathanasis, and S.E. Antonarakis, Apolipoprotein A-I Baltimore (Arg10-Leu), a new apoA-I variant. *Human Genetics*, **1990**. 84: p. 439-445.
58. Nichols, W.C., F.E. Dwulet, J. Liepnieks, and M.D. Benson, Variant apolipoprotein AI as a major constituent of a human hereditary amyloid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1988**. 156 No 2: p. 762-768.
59. Nichols, W.C., R.E. Gregg, H.B. Brewer, and M.D. Benson, A mutation in apolipoprotein A-I in the Iowa type of familial amyloidotic polyneuropathy. *Genomics*, **1990**. 8: p. 318-323.
60. 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.
61. Booth, D.R., S.-Y. Tan, S.E. Booth, J.J. Hsuan, N.F. Totty, *et al.*, A new apolipoprotein A-I variant, Trp50Arg, causes hereditary amyloidosis. *Quarterly Journal of Medicine*, **1995**. 88: p. 695-702.
62. Soutar, A.K., P.N. Hawkins, D.M. Vigushin, G.A. Tennent, S.E. Booth, *et al.*, Apolipoprotein AI mutation Arg-60 causes autosomal dominant amyloidosis. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **1992**. 89: p. 7389-7393.
63. Booth, D.R., S.-Y. Tan, S.E. Booth, G.A. Tennent, W.L. Hutchinson, *et al.*, Hereditary hepatic and systemic amyloidosis caused by a new deletion/insertion mutation in the apolipoprotein A-I gene. *Journal of Clinical Investigation*, **1996**. 97 No12: p. 2714-2721.
64. Utermann, G., A. Steinmetz, R. Peatzold, J. Wilk, G. Feussner, *et al.*, Apolipoprotein A-I Marburg: Studies on two kindreds with a mutant of human apolipoprotein A-I. *Human Genetics*, **1982**. 61: p. 329-337.
65. Rall, S.C., K.H. Weisgraber, R.W. Mahley, Y. Ogawa, C.J. Fielding, *et al.*, Abnormal Lecithin:Cholesterol Acyltransferase activation by a human apolipoprotein A-I variant in which a single lysine residue is deleted. *Journal of Biological Chemistry*, **1984**. 259(16): p. 10063-10070.

66. Rall, S.C., K.H. Weisgraber, R.W. Mahley, C. Ehnholm, O. Schamaun, B. Olaisen, J.P. Blomhoff, and P. Teisberg, Identification of homozygosity for a human apolipoprotein A-I variant. *Journal of Lipid Research*, **1986**. 27: p. 436-441.
67. Utermann, G., J. Haas, A. Steinmetz, R. Paetzold, S.C. Rall, K.H. Weisgraber, and R.W. Mahley, Apolipoprotein A-I Giessen (Pro 143--Arg). *European Journal of Biochemistry*, **1984**. 144: p. 325-331.
68. 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 No 21: p. 13654-13660.
69. Gylling, H., H. Relas, H.E. Miettinen, R. Radhakrishnan, and T.A. Miettinen, Delayed postprandial retinyl palmitate and squalene removal in a patient heterozygous for apolipoprotein A-I<sub>FIN</sub> mutation (Leu159-Arg) and low HDL cholesterol level without coronary artery disease. *Atherosclerosis*, **1996**. 127: p. 239-243.
70. Leren, T.P., K.S. Bakken, U. Daum, L. Ose, K. Berg, G. Assmann, and A. Von Eckardstein, Heterozygosity for apolipoprotein A-I (R160L)<sub>OSLO</sub> is associated with low levels of high density lipoprotein cholesterol and HDL-subclass LpA-I/A-II but normal levels of HDL-subclass LpA-I. *Journal of Lipid Research*, **1997**. 38: p. 121-131.
71. Von Eckardstein, A., H. Funke, A. Henke, K. Altland, A. Benninghoven, and G. Assmann, Apolipoprotein A-I variants. *Journal of Clinical Investigation*, **1989**. 84: p. 1722-1730.
72. Weisgraber, K.H., T.P. Bersot, R.W. Mahley, G. Franceschini, and C.R. Sirtori, A-I Milano apoprotein. *Journal of Clinical Investigation*, **1980**. 66: p. 901-907.
73. Weisgraber, K.H., S.C. Rall, T.P. Bersot, R.W. Mahley, G. Franceschini, and C.R. Sirtori, Apolipoprotein A-I Milano. *Journal of Biological Chemistry*, **1983**. 258(4): p. 2508-2513.
74. Franceschini, G., L. Calabresi, C. Tosi, G. Gianfranceschi, C.R. Sirtori, and A.V. Nichols, Apolipoprotein A-I Milano. *Journal of Biological Chemistry*, **1990**. 265(21): p. 12224-12231.
75. Franceschini, G., C.R. Sirtori, A. Capurso, K.H. Weisgraber, and R.W. Mahley, A-I Milano apoprotein. *Journal of Clinical Investigation*, **1980**. 66: p. 892-900.
76. Strobl, W., H.-U. Jabs, M. Hayde, T. Holzinger, G. Assmann, and K. Widhalm, Apolipoprotein A-I (Glu 198-Lsy): a mutant of the major apolipoprotein of high-density lipoproteins occurring in a family with dyslipoproteinemia. *Pediatric Research*, **1988**. 24: p. 222-228.
77. Benson, M.D., Inherited amyloidosis. *Journal of Medicine and Genetic*, **1991**. 28: p. 73-78.

78. Glenner, G.G., Amyloid deposits and amyloidosis. *The New England Journal of Medicine*, **1980**. 302 No24: p. 1333-1343.
79. Skare, J.C., M.J.M. Saraiva, I.L. Alves, I.B. Skare, A. Milunsky, A.S. Cohen, and M. Skinner, A new mutation causing familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1989**. 164 No3: p. 1240-1246.
80. Van Allen, M.W., J.A. Fröhlich, and J.D. Davis, Inherited predisposition to generalized amyloidosis. *Neurology*, **1969**. 19: p. 10-25.
81. Benson, M.D. and T. Uemichi, Transthyretin amyloidosis. Amyloid. *International Journal of Experimental Clinical Investigations*, **1996**. 3(44-56).
82. Terry, C.J., A.M. Damas, P. Oliveira, M.J. Saraiva, I.L. Alves, P.P. Costa, P.M. Matias, Y. Sakaki, and C.C. Blake, Structure of Met30 variant of transthyretin and its amyloidotic implications. *EMBO Journal*, **1993**. 12: p. 735-741.
83. Murakami, T., S. Maeda, S. Yi, S. Ikegawa, E. Kawashima, S. Onodera, K. Shimada, and S. Araki, A novel transthyretin mutation associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1992**. 182: p. 520-526.
84. Puck, T.T., S.J. Cieciura, and A. Robinson, Genetics of somatic mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*, **1958**. 108: p. 945-955.
85. Kao, F.T. and T.T. Puck, Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in chinese hamster cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **1968**. 60(4): p. 1275-1281.
86. Remaley, A.T. and J.M. Hoeg, Polarized secretion of apoA-I and ApoA-II by transfected MDCK cells. *Journal of Lipid Research*, **1995**. 36: p. 407-413.
87. Karin, M. and I.R. Richards, Human metallothionein genes--primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. *Nature*, **1982**. 299: p. 797-802.
88. Ham, R.G., Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **1965**. 53: p. 288-293.
89. Jäger, V., J. Lehmann, and P. Friedl, Serum-free growth medium for the cultivation of a wide spectrum of mammalian cells in stirred bioreactors. *Cytotechnology*, **1988**. 1: p. 319-329.
90. Lütkemeyer, D., M. Bretschneider, H. Büntemeyer, and J. Lehmann, Membrane chromatography for rapid purification of recombinant antithrombin III and monoclonal antibodies from cell culture supernatant. *Journal of Chromatography*, **1993**. 639: p. 57-66.

91. Kouts, S., C.L. Bunn, A. Steinkasserer, and S. Krilis, Expression of human recombinant  $\beta_2$ -glycoprotein I with anticardiolipin antibody cofactor activity. *FEBS*, **1993**. 326(1,2,3): p. 105-108.
92. Wang, M.-H., T. Yoshimura, A. Skeel, and E.J. Leonard, Proteolytic conversion of single chain precursor macrophage-stimulating protein to a biologically active heterodimer by contact enzymes of the coagulation cascade. *Journal of Biological Chemistry*, **1994**. 269 No 5: p. 3436-3440.
93. Falkenberg, F.W., T. Henglage, M. Krane, I. Bartels, A. Albrecht, N. Holtmeier, and M. Wüthrich, A simple and inexpensive high density dialysis tubing cell culture system for the in vitro production of monoclonal antibodies in high concentration. *Journal of Immunological Methods*, **1993**. 165: p. 193-206.
94. 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.
95. Wicher, 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.
96. Edelstein, C., L.L. Lewis, J.R. Shainhoff, H. Naito, and A.M. Scanu, Isolation and characterization of a dog serum lipoprotein having apolipoprotein A-I as its predominant protein constituent. *Biochemistry*, **1976**. 15 No.9: p. 1934-1941.
97. Norfeldt, P.-I.P., S.-O. Olofsson, G. Fager, and G. Bondjers, Isolation and partial characterization of the lipoprotein families A and A-I from high density lipoproteins of human serum. *European Journal of Biochemistry*, **1981**. 118: p. 1-8.
98. McVicar, J.P., S.T. Kunitake, R.L. Hamilton, and J.P. Kane, Characteristics of human lipoproteins isolated by selected-affinity immunosorption of apolipoprotein A-I. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **1984**. 81: p. 1356-1360.
99. James, R.W., D. Hochstrasser, J.-D. Tissot, M. Funk, R. Appel, F. Barja, C. Pellegrini, A.F. Muller, and D. Pometta, Protein heterogeneity of lipoprotein particles containing apolipoprotein A-I without apolipoprotein A-II and apolipoprotein A-I with apolipoprotein A-II isolated from human plasma. *Journal of Lipid Research*, **1988**. 29: p. 1557-1571.
100. 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.
101. 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.
102. 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 No 1: p. 1-8.

103. 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.
104. 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.
105. Carlson, T.L. and B.A. Kottke, ApoA-I secretion by rabbit intestinal mucosa cell cultures. *Lipids*, **1991**. 26(9): p. 684-688.
106. Quig, D.W. and D.B. Zilversmit, High density lipoprotein metabolism in a rabbit model of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*, **1989**. 76: p. 9-19.
107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. 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.
114. Cohen, M.D., C.B. Klein, and M. Costa, Forward mutations and DNA-protein crosslinks induced by ammonium metavanadate in cultured mammalian cells. *Mutation Research*, **1992**. 269: p. 141-148.
115. Dixon, J.L., R. Battini, S. Ferrari, C.M. Redman, and D. Banerjee, Expression and secretion of chicken apolipoprotein A-I in transfected COS cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1989**. 1009: p. 47-53.

116. 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 No 10: p. 5469-5475.
117. 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.
118. 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.
119. 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 physiological intact human recombinant apolipoprotein A-I: comparing three different expression systems. *Clinical Chimica Acta*, **1997**(in press).
120. 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.
121. 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.
122. Bojanovski, D., R.E. Gregg, G. Ghiselli, E.J. Schaefer, J.A. Jight, and H.B.j. Brewer, Human apolipoprotein A-I isoprotein metabolism: proapo A-I conversion to mature apo A-I. *Journal of Lipid Research*, **1985**. 26: p. 185-193.
123. 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.
124. Bojanovski, D., R.E. Gregg, and H.B.j. Brewer, Tangier disease. In vitro conversion of proapoA-I to apoA-I. *Journal of Biological Chemistry*, **1984**. 259: p. 6049-6051.
125. 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**. 529No3: p. 319-330.
126. Bausserman, L.L. and P.N. Herbert, Degradation of serum amyloid A and apolipoproteins by serum proteases. *Biochemistry*, **1984**. 23 No10: p. 2241-2245.
127. 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.

128. 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.
129. 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.
130. Scanu, A.M., Proteolytic enzymes in the biogenesis and metabolism of plasma HDL, in *Atherosclerosis Reviews*, A.L. Catapano, Editor. **1987**, Raven Press: New York. p. 9-18.
131. 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.
132. 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 No.1: p. 25-30.
133. 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.
134. Moguilevsky, N., C. Roobol, R. Loriau, J.-P. Guillaume, P. Jacobs, *et al.*, Production of human recombinant proapolipoprotein A-I in *Escherichia coli*: Purification and biochemical characterization. *DNA*, **1989**. 8 No 6: p. 429-436.
135. Nestruck, C., P.D. Niedmann, H. Wieland, and D. Seidel, Chromatofocusing of human high density lipoproteins and isolation of lipoproteins a and A-I. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1983**. 753: p. 65-73.
136. Scanu, A.M., J. Toth, C. Edelstein, S. Koga, and E. Stiller, Fractionation of human serum high density lipoprotein in urea solutions. Evidence for polypeptide heterogeneity. *Biochemistry*, **1969**. 8 No.8: p. 3309-3316.
137. Weinberg, R., C. Patton, and B. DaGue, Analytic and preparative separation of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV by reverse phase high pressure liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, **1988**. 29: p. 819-824.
138. Weisweiler, P., Isolation and quantitation of apolipoproteins A-I and A-II from human high density lipoproteins by fast-protein liquid chromatography. *Clinical Chimica Acta*, **1987**. 169: p. 249-254.
139. Schmidt, H.H.-J., J. Genschel, R. Haas, and M.P. Manns, Preparative electrophoresis: An improved method for the isolation of human recombinant apolipoprotein A-I. *Biotechniques*, **1997**: p. in press.
140. 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.

141. 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.
142. Funke, H., A. Von Eckardstein, P.H. Pritchard, M. Karas, J.J. Albers, and G. Assmann, A frameshift mutation in the human apolipoprotein A-I gene causes high density lipoprotein deficiency, partial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency, and corneal opacities. *Journal of Clinical Investigation*, **1991**. 87: p. 371-376.
143. Utermann, G., G. Feussner, G. Franceschini, J. Haas, and A. Steinmetz, Genetic variants of group A apolipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, **1982**. 257(1): p. 501-507.
144. Nakata, K., K. Kobayashi, H. Yanagi, Y. Shimakura, S. Tsuchiya, T. Arinami, and H. Hamaguchi, Autosomal dominant hypoalphalipoproteinemia due to a completely defective apolipoprotein A-I gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1993**. 196(2): p. 950-955.
145. Matsunaga, T., Y. Hiasa, H. Yanagi, T. Maeda, N. Hattori, *et al.*, Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of the apolipoprotein A-I gene. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **1991**. 88: p. 2793-2797.
146. Makrides, S.C., N. Ruiz-Opazo, M. Hayden, A.L. Nussbaum, L. Breslow, and V.I. Zannis, Sequence and expression of Tangier *apoA-I* gene. *European Journal of Biochemistry*, **1988**. 173: p. 465-471.



## WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

Janine Genschel

geboren am 09.08.1967 in Hannover

|               |   |
|---------------|---|
| 1973-1977     | Grundschule, Kurt-Schuhmacher Schule in Hannover  |
| 1977-1983     | Realschule, Freiherr-vom-Stein Schule in Hannover   |
| 1983-1986     | Gymnasium, Käthe-Kollwitz-Schule Schule in Hannover   |
| 1986-1988     | Ausbildung zur Chemisch-Technischen Assistentin   |
| 1988-1993     | Studium der Chemie an der Universität Hannover  |
| November 1993 | Diplom  |
| April 1994    | Beginn der Promotion in der Abteilung<br>Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen<br>Hochschule Hannover |
| November 1997 | Abgabe der Dissertation   |
| Januar 1998   | Mündliche Prüfung   |