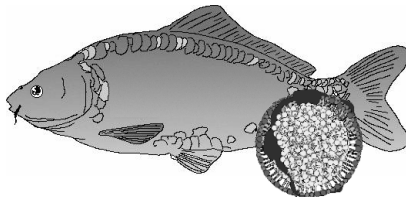


Untersuchungen zur  
LDL-Rezeptoraktivität des Karpfen (*Cyprinus carpio* L.)



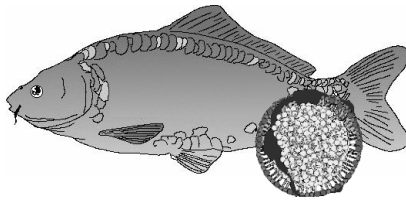
Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
Martin Landolf Lobemeier

Kiel  
2000



Untersuchungen zur  
LDL-Rezeptoraktivität des Karpfen (*Cyprinus carpio* L.)



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
Martin Landolf Lobemeier

Kiel  
2000

Referent/in: PD Dr. E. Wodtke  
Korreferent/in: Prof. Dr. W. Wünnenberg  
Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 2000  
Zum Druck genehmigt: Kiel, den

---

Der Dekan

## ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Charakterisierung der Bindungseigenschaften des LDL-Rezeptors von Vertretern verschiedener Wirbeltierklassen mit besonderem Schwerpunkt auf Untersuchungen am Karpfen (*Cyprinus carpio*). Zusätzlich wurden Präparationen von Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) von Mensch, Forelle und Karpfen auf ihre Bindungsfähigkeit an Geweben von Mensch, Rind, Forelle und Karpfen überprüft.

In Mikrosomenpräparationen der Leber von zweisömmerigen Karpfen konnte eine spezifische, rezeptor-vermittelte Bindung von Karpfen-LDL (cLDL) nachgewiesen werden, die den Bindungsparametern des Säuger-LDL-Rezeptors ähnlich ist. Der relative Rezeptorproteingehalt ist dabei in Membranpräparationen der Karpfenleber von 8.000 - 100.000 g ungefähr dreimal höher als in Präparationen von 700 - 100.000 g. Die gemessene maximale Bindungskapazität der Karpfen-Lebermembranen ist bei einer Versuchstemperatur von 37 °C um den Faktor 1,7 höher als bei 4 °C. Der wesentliche Unterschied zum Säugersystem liegt darin, daß EDTA im Gegensatz zu Suramin die spezifische Bindung von cLDL nicht vollständig unterbinden kann. Eine Calciumabhängigkeit der Bindung muß damit in Frage gestellt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß cLDL und Karpfen-Lipoproteine sehr geringer Dichte (cVLDL), nicht aber Karpfen-Lipoproteine hoher Dichte (cHDL) mit <sup>125</sup>I-markierten cLDL um die Bindung konkurrieren.

Zusätzlich wurden vorbereitende Untersuchungen zur Regulation des Karpfen-LDL-Rezeptors vorgenommen, die an Ergebnisse aus bereits von der Arbeitsgruppe veröffentlichten Befunden zum Lipidmetabolismus des Karpfen anknüpfen. Während die Fütterungsmenge offenbar keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften des LDL-Rezeptors besitzt, konnte ein Einfluß der Adaptationstemperatur nachgewiesen werden. Demnach binden <sup>125</sup>I-markierte cLDL an Membranen von an 10 °C angepaßten Tieren (n=3) mit einem K<sub>D</sub> von 79,9 ± 62,2 µg <sup>125</sup>I-cLDL / ml und einem B<sub>max</sub> von 1361,5 ± 684,4 ng <sup>125</sup>I-cLDL / mg Membranprotein. Die Bindung an Membranen von an 22 °C adaptierten Tieren (n=3) erfolgte mit einem ähnlichen K<sub>D</sub> von 118,5 ± 32,7 µg <sup>125</sup>I-cLDL / ml und einem signifikant höheren B<sub>max</sub> von 2916,2 ± 239,5 ng <sup>125</sup>I-cLDL / mg Membranprotein.

Entgegen den Angaben von FAINARU *et al.* (Comp Biochem Physiol [B]. 1988; 91: 331-338) konnte eine spezifische Bindung von Human-LDL weder an Lebermembranen des Karpfen, noch an Lebermembranen der Forelle nachgewiesen werden. Auch für Forellen-LDL konnte eine spezifische Bindung an Human-Lebermembranen nicht gezeigt werden. Dagegen wurden die oben genannten LDL-Präparationen von den untersuchten Membrantypen der verschiedenen Wirbeltierspezies rezeptor-vermittelt gebunden. Prinzipiell binden LDL von Fischen mit niedrigerer Affinität als Säuger-LDL an Säuger-Membranpräparationen und umgekehrt.

Die Untersuchungen wurden von einer kritischen Analyse der Methoden zur Auswertung der Proteinbestimmung nach LOWRY und der Auswertung von Rezeptorbindungsstudien begleitet, zu deren objektiven Durchführung zwei Computerprogramme entwickelt wurden.

## SUMMARY

In the present study the characteristics and binding parameters of the interaction of low density lipoproteins (LDL) with the LDL-receptor from species of different vertebrate classes were investigated with emphasis on the LDL-receptor in carp (*Cyprinus carpio*). Additionally the capability of the LDL-receptor of bovine, human, trout and carp tissues in binding human, carp or trout LDL was examined.

Microsome preparations from liver of adult carp exhibited specific, receptor-mediated binding of carp-LDL (cLDL) with similar characteristics to the LDL-receptor-system in mammals. The relative LDL-receptor content in preparations from 8,000 to 100,000 g is about three fold higher than in preparations from 700 to 100,000 g and the maximum binding-capacity is 1.7 higher at an experimental temperature of 37 °C compared to 4 °C. While Suramin inhibited specific binding of cLDL to the receptor, EDTA showed almost no effect, suggesting that calcium is not necessary for the binding of cLDL to the LDL-receptor in carp. Furthermore cLDL and carp very low density lipoproteins (cVLDL), but not carp high density lipoproteins (cHDL) competed with <sup>125</sup>I-labelled cLDL for receptor-binding.

Provisional experiments enhance recent results on the lipid-metabolism in carp for the LDL-receptor as a regulatory factor in cholesterol-homeostasis. While different masses of feed showed no differences, an effect of the adaptation temperature on the binding parameters could be revealed. It proved that <sup>125</sup>I-labelled cLDL bound specifically to membranes of carp adapted to 10 °C with a K<sub>D</sub> of 79,9 ± 62,2 µg <sup>125</sup>I-cLDL / ml and B<sub>max</sub> of 1361,5 ± 684,4 ng <sup>125</sup>I-cLDL / mg membrane protein and to membranes of carp adapted to 22 °C with a comparable K<sub>D</sub> of 118,5 ± 32,7 µg <sup>125</sup>I-cLDL / ml and a significantly higher B<sub>max</sub> of 2916,2 ± 239,5 ng <sup>125</sup>I-cLDL / mg membrane protein respectively.

In contrast to the findings of FAINARU *et al.* (Comp Biochem Physiol [B]. 1988; 91: 331-338) a specific binding of human LDL could not be detected neither to liver membranes of carp nor trout. Likewise trout LDL did not bind specifically to membranes of human liver. All other investigated membrane types in this study did bind LDL independent of their origin. Fish-LDL bind with lower affinity to membranes of mammals as compared to LDL of mammals and *vice versa*.

These experiments were accompanied by a critical analysis of methods for the evaluation of the LOWRY protein determination and receptor-binding studies, for which two computer programmes were conceived and written.



## **DANKSAGUNG**

Natürlich wäre mir die Anfertigung und Zusammenstellung dieser Arbeit ohne Anregung und Unterstützung von „Außen“ schwerer gefallen. Mein besonderer Dank gilt deshalb den folgenden Personen:

Für die Überlassung des Themas, des Arbeitsplatzes und für die großzügige Bereitstellung der finanziellen Mittel danke ich Herrn PD Dr. Ekkehart Wodtke, der sich darüber hinaus stets Zeit nahm, neue wie alte Erkenntnisse ausführlich zu diskutieren und mir bei Problemen immer einen reibungslosen Arbeitsablauf ermöglichte.

Herr Prof. Dr. Wolf Wünnenberg veranlaßte meine Beschäftigung als wissenschaftlicher Angestellter und sorgte somit für eine gewisse finanzielle Unabhängigkeit.

Eine dauerhafte Hilfe fand ich in Frau Britta Laubenstein, die mich bei allen Experimenten tatkräftig unterstützte und vor allem die Elektrophoresen gewohnt professionell durchführte.

Herrn Dr. Heiko Künnemann und Frau Helga Ponick danke ich für die freundliche Aufnahme an meinem zweiten ständigen Arbeitsplatz im Isotopenlabor des Biologiezentrums, sowie die fachliche Beratung.

Den Männern der Werkstatt danke ich für die freundschaftliche Aufnahme und Hilfestellung. Besonders Herrn Hannes Freitag bin ich zu Dank verpflichtet, daß er neben den Aquarienanlagen auch noch mich selbst 'zum Laufen' brachte.

Ohne die Kooperationsbereitschaft der Leitungsgremien und Mitarbeiter der Blutspendezentrale und der Pathologie des Universitätsklinikums wären die vorliegenden Untersuchungen in diesem Umfang nicht möglich gewesen. Michael Schunck (Hautklinik des Universitätsklinikums) danke ich für die Möglichkeit, Prism2 zu benutzen.

Über die Kieler Stadtgrenze hinaus danke ich besonders den Wissenschaftlern, die sich via Email spontan hilfs- und diskussionsbereit gezeigt haben und mir viele wertvolle Tips geben konnten; dies sind: Andreas Niemeyer (UKE Hamburg, D; AG U. Beisiegel), Muriel Caslake (Royal Infirmary Glasgow, UK; AG J. Shepherd) und Wolfgang J. Schneider (Universität Wien, A).

Den Mitarbeitern des Biochemischen und besonders des Zoologischen Instituts danke ich für die freundliche Aufnahme, Trostpflaster und einige Tassen Kaffee. Ina Berndt, Hans Jürgen Braune, Michael Fuhrmann, Gregor Kölsch, Klaus Kottowski, Britta Laubenstein, Heidi Mard-Azad, Birte von Patay, Lee Shaw, Michael Voss: DANKE!

Maike und Eva Lotta Ehmsen.





---

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 LIPIDTRANSPORT, CHOLESTEROLHOMÖOSTASE UND REZEPTORVERMITTELTE ENDOCYTOSE.....	2
1.2 STRUKTUR UND FUNKTION DES LDL-REZEPTORS.....	6
1.3 VORAUSGEHENDE BEFUNDE AUS DER ARBEITSGRUPPE UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	10
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
2.1 ÜBERSICHT ÜBER DEN VERSUCHSABLAUF UND METHODISCHE VORÜBERLEGUNGEN ..	11
2.2 DAS VERSUCHSTIER.....	14
2.2.1 Hälterung .....	14
2.2.2 Markierung der Tiere .....	16
2.2.3 Behandlung der Tiere bei Krankheitsbefall .....	17
2.3 PRÄPARATION VON ISOLIERTEN MEMBRANEN.....	17
2.3.1 Präparation von isolierten Rinder-Nebennierenrinden-Membranen .....	17
2.3.2 Präparation von isolierten Karpfenleber-Membranen.....	19
2.4 ISOLIERUNG VON PLASMALIPOPOTEINEN .....	20
2.4.1 Isolierung von Human Plasmalipoproteinen.....	20
2.4.2 Isolierung von Karpfen Plasmalipoproteinen.....	22
2.5 BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTS .....	24
2.5.1 Photometrische Proteinbestimmung bei $\lambda = 280$ nm.....	25
2.5.2 Proteinbestimmung nach LOWRY <i>et al.</i> (1951) .....	25
2.5.3 Proteinbestimmung mit einer modifizierten LOWRY-Methode .....	26
2.5.4 Auswertung der modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY mit dem VBA-Programm LOWRY for Excel 97 .....	26
2.5.5 Proteinbestimmung mit Fluorescamin .....	30
2.6 DEAE-CHROMATOGRAPHIE VON SOLUBILISIERTEN CLM UND BNNR-MEMBRANEN ....	30
2.7 SDS-PAGE UND BLOTTING VON SOLUBILISIERTEN CLM- UND BNNR-PRÄPARATIONEN .....	31
2.7.1 Vorbereitungen zur SDS-PAGE .....	31
2.7.2 Probenvorbereitung und Probenauftrag.....	32
2.7.3 Blotting-Prozedur .....	32
2.7.4 Anfärbung der Blotstreifen .....	33
2.7.5 Molekulargewichtskalibrierung von SDS-PAGE-Gelen.....	33
2.8 SDS-PAGE VON SOLUBILISIERTEN CLDL UND HLDL .....	34
2.9 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON PLASMA-LIPOPOTEINEN MIT <sup>125</sup> IOD.....	34
2.10 DETEKTION DES APO-B/E-REZEPTORS MIT DEM MONOKLONALEN ANTIKÖRPER $\alpha$ -BLDLR C7 NACH SDS-PAGE UND BLOTTING .....	38
2.11 DETEKTION DER APO-B/E-REZEPTORAKTIVITÄT MIT NATIVEN UND <sup>125</sup> I-MARKIERTEN LDL NACH SDS-PAGE UND BLOTTING.....	39
2.12 BINDUNGSASSAY ZUR CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN DES LDL-REZEPTORS.....	41
2.12.1 Filtrationsassay.....	41
2.12.2 Zentrifugationsassay.....	42

---

2.12.3	Vergleich von Filtrations- und Zentrifugationsassay .....	43
2.12.4	Auswertung der Bindungsexperimente.....	44
<b>2.13</b>	<b>STATISTISCHE BEHANDLUNG DER DATEN.....</b>	<b>52</b>
<b>2.14</b>	<b>ÜBERSICHT ÜBER DIE DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE AUS BINDUNGSVERSUCHEN .....</b>	<b>54</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>DIE PROTEINBESTIMMUNG ALS GRUNDLAGE DER EXPERIMENTELLEN DATENERFASSUNG UND AUSWERTUNG .....</b>	<b>57</b>
3.1.1	Zur Auswertung der modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY .....	57
3.1.2	Qualitativer Vergleich der verwendeten Methoden der Proteinbestimmung .	60
3.1.2.1	Vergleich der Original LOWRY-Methode mit der modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY .....	60
3.1.2.2	Vergleich der photometrischen Proteinbestimmung bei $\lambda = 280$ nm mit der modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY.....	61
3.1.2.3	Vergleich der Proteinbestimmung mit Fluorescamin mit der modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY .....	62
<b>3.2</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER PLASMALIPOPROTEIN-PRÄPARATIONEN AUS HUMAN- UND KARPFFEN-PLASMA .....</b>	<b>63</b>
<b>3.3</b>	<b>BINDUNG VON HUMAN-LDL AN ISOLIERTE MEMBRANEN VON VERTRETERN VERSCHIEDENER WIRBELTIERKLASSEN .....</b>	<b>67</b>
3.3.1	Bindung von Human-LDL an Rinder-Nebennierenrinden-Membranen .....	67
3.3.2	Bindung von Human-LDL an isolierte Lebermembranen des Menschen.....	71
3.3.3	Bindung von Human-LDL an aus Fischen isolierte Membranen .....	73
<b>3.4</b>	<b>BINDUNG VON KARPFFEN-LDL AN ISOLIERTE MEMBRANEN VON VERTRETERN VERSCHIEDENER WIRBELTIERKLASSEN .....</b>	<b>75</b>
3.4.1	Bindung von Karpfen-LDL an isolierte Membranen des Karpfen.....	75
3.4.1.1	Der Einfluß der Fütterung der Versuchstiere auf Bindungsparameter des LDL-Rezeptors .....	75
3.4.1.2	Der Einfluß der Membranpräparation auf Bindungsparameter des LDL-Rezeptors .....	80
3.4.1.3	Der Einfluß der Versuchstemperatur auf Bindungsparameter des LDL-Rezeptors .....	82
3.4.1.4	Untersuchungen zur Rezeptorspezifität.....	85
3.4.1.5	Der Einfluß von EDTA und Suramin auf die Ligandenbindung .....	86
3.4.1.6	Der Einfluß der Adaptationtemperatur auf Bindungsparameter des LDL-Rezeptors .....	88
3.4.2	Bindung von Karpfen-LDL an isolierte Membranen der Forelle .....	95
3.4.3	Bindung von Karpfen-LDL an isolierte Membranen des Menschen .....	96
3.4.4	Bindung von Karpfen LDL an isolierte Membranen des Rinds .....	98
<b>3.5</b>	<b>BINDUNG VON FORELLEN-LDL AN ISOLIERTE MEMBRANEN VON VERTRETERN VERSCHIEDENER WIRBELTIERKLASSEN .....</b>	<b>100</b>
3.5.1	Bindung von Forellen-LDL an isolierte Membranen der Forelle .....	100
3.5.2	Bindung von Forellen-LDL an isolierte Membranen des Karpfen .....	101
3.5.3	Bindung von Forellen-LDL an isolierte Membranen des Menschen.....	103
3.5.4	Bindung von Forellen-LDL an isolierte Membranen des Rinds .....	104
<b>3.5</b>	<b>LIGANDEN- UND IMMUNOBLOT DES LDL-REZEPTORS .....</b>	<b>106</b>

---

---

<b>4 ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION</b>	114
<b>4.1 VERGLEICHENDE DISKUSSION DER BINDUNGSPARAMETER ALLER EXPERIMENTE ...</b>	114
<b>4.2 ERWEITERTE KRITIK AUSGEWÄHLTER METHODISCHER ASPEKTE .....</b>	117
4.2.1 Präparation von isolierten Membranen.....	117
4.2.2 Präparation von Plasmalipoproteinen .....	117
4.2.3 Proteinbestimmung .....	118
4.2.4 <sup>125</sup> I-Markierung der Plasmalipoproteine .....	119
4.2.5 Vergleich der Auswertung von Bindungsexperimenten durch nicht-lineare Regression und durch den SCATCHARD-Plot.....	120
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	122
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	125
<b>7 ANHANG</b>	134
<b>7.1 DAS PROGRAMM LOWRY FOR EXCEL 97 .....</b>	134
7.1.1 Allgemeiner Programmaufbau.....	134
7.1.2 Elemente im Tabellenblatt Sheet1 (Lowry Protein Determination) .....	135
7.1.3 Das Modul <i>estimation_for_hyperbola</i> .....	136
7.1.4 Das Modul <i>iteration</i> .....	137
7.1.5 Das Modul <i>lineweaver_burk</i> .....	138
7.1.6 Das Modul <i>number_of_data</i> .....	139
7.1.7 Das Modul <i>polynom</i> .....	140
7.1.8 Das Modul <i>samples</i> .....	141
7.1.9 Das Modul <i>Stauffer</i> .....	142
<b>7.2 DAS PROGRAMM HYPERBOLA FOR EXCEL 97 .....</b>	143
7.2.1 Allgemeiner Programmaufbau.....	143
7.2.2 Elemente in Tabellenblatt <i>Sheet1 (data)</i> .....	144
7.2.3 VBA-Script der Dialogbox <i>Hyperbola</i> .....	144
<b>7.3 ALLGEMEINE VERSUCHSANGABEN .....</b>	150
<b>7.4 REAGENZIEN .....</b>	153
<b>7.5 LÖSUNGEN .....</b>	154
<b>7.6 ANTIKÖRPER .....</b>	156
<b>7.7 GERÄTE .....</b>	156
<b>7.8 PIPETTEN, PIPETTENZUBEHÖR UND REAKTIONSGEFÄßE .....</b>	157
<b>7.9 ANDERE VERBRAUCHSMATERIALIEN .....</b>	157
<b>7.10 VERWENDETE SOFTWARE .....</b>	158

---

## Abkürzungsverzeichnis

<sup>125</sup> I-....	<sup>125</sup> Jod-markierte Lipoproteine	SA	Streptavidin
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser	SD	Standardabweichung
α-...	anti-...	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
AK	Antikörper	t...	<i>trout</i> , Forellen-...
Apo	Apolipoprotein	TCA	Trichloressigsäure
APS	Ammoniumpersulfat	tLDL	Forellen-LDL
AT	Adaptationstemperatur	tLM	isolierte Forellen-Lebermembranen
AT10	Adaptationstemperatur 10 °C	Upm	Umdrehungen pro Minute
AT22	Adaptationstemperatur 22 °C	VBA	Visual Basic for Applications
b...	<i>bovine</i> , Rinder-...	VLDL	Lipoproteine sehr geringer Dichte
bNNR	bovine Nebennierenrinde	VT	Versuchstemperatur
BSA	bovines Serumalbumin	VTG	Vitellogenin
c...	<i>carp</i> , Karpfen-...	w	weiblich
cLDL	Karpfen-LDL		
cLM	isolierte Karpfen-Lebermembranen		
CM	Chylomikronen		
CMR	Chylomikronenreste		
d	Dichte (in g/cm <sup>3</sup> )		
DEAE	Di-Ethyl-Amino-Ethyl-Cellulose		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor		
GSI	Gonadosomatischer Index		
HDL	Lipoproteine hoher Dichte		
hLDL	LDL des Menschen		
hLM	isolierte Human-Lebermembranen		
IDL	Lipoproteine mittlerer Dichte		
IgG	Immunglobulin G		
K <sub>1</sub>	einsömmeriger Karpfen		
K <sub>2</sub>	zweisömmeriger Karpfen		
kB	Kilobytes		
KG	Körpergewicht		
LDL	Lipoproteine geringer Dichte		
LDLR	LDL-Rezeptor		
LM	isolierte Lebermembranen		
LSI	Lebersomatischer Index		
m	männlich		
n.s.	nicht signifikant		
n.sp.	nicht-spezifisch		
N <sub>2;gas</sub>	Stickstoff, gasförmig		
N <sub>2;liq</sub>	Stickstoff, flüssig		
NPxY	Consensus-Sequenz des cytoplasmatischen Anteils des LDLR		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung		
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid		
RT	Raumtemperatur		

---

## 1 Einleitung

Lipide stellen für den tierischen Organismus eine wichtige Quelle für die Energiegewinnung bzw. -konservierung, den Membranaufbau von Zellen und der thermischen und elektrischen Isolierung dar (KOOLMAN und RÖHM 1994). Daneben besitzen einige dieser Substanzen besondere Funktion als Hormone, Mediatoren und Wachstumsfaktoren. Gemeinsam ist ihnen die geringe Wasserlöslichkeit, die sich im tierischen Körper durch spezifische Anpassungsmechanismen zur Aufnahme und Verteilung im Organismus äußert (STRYER 1988).

Der Transport von Triglyceriden (TG), Phospholipiden (PL), Cholesterolestern (CE) und Cholesterol (Chol) wird durch das komplexe System der Plasmalipoproteine organisiert (CHAPMAN 1980). Dabei handelt es sich um verschiedenartig zusammengesetzte Aggregate von Proteinen und Lipiden, deren unpolarer Kern aus Triglyceriden und Cholesterolestern von einer polaren Hülle aus amphiphilen Lipiden (PL, Chol) und einem oder mehreren Proteinmolekülen umfaßt wird (SHEN *et al.* 1977). Letztere, sogenannte Apolipoproteine, dienen dabei der spezifischen Wechselwirkung mit Enzymen und auf den Zellmembranen der Zielorgane lokalisierten Rezeptorstrukturen (DOLPHIN 1985).

Im Gegensatz zu Untersuchungen an Säugetieren ist über die Interaktion der Plasmalipoproteine und ihrer Rezeptoren, insbesondere des LDL - Rezeptors (Apolipoprotein B/E - Rezeptors), bei „niederen“ Wirbeltieren, wie beispielsweise Fischen, verhältnismäßig wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit werden, unter besonderer Berücksichtigung der Untersuchungs- und Auswertungsmethoden, biochemische Parameter zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften des Apolipoprotein B/E - Rezeptors des Karpfen (*Cyprinus carpio*) vorgestellt. Anhand vergleichender Untersuchungen mit Plasmalipoprotein- und Rezeptorpräparationen anderer Wirbeltierspezies wird ein universelles, evolutiv-konserviertes Rezeptor-Liganden-System diskutiert.

Die Grundlagen des Lipidtransportes werden zunächst aus der Literatur durch an Säugetieren beobachteten Zusammenhängen dargestellt und sofern möglich durch Untersuchungen an Vertretern anderer Wirbeltierklassen ergänzt.

## 1.1 Lipidtransport, Cholesterolumöstase und rezeptorvermittelte Endocytose

Mit der Nahrung aufgenommene Lipide werden im Duodenum mit Hilfe der Gallensalze emulgiert, z.T. enzymatisch gespalten und in die Epithelzellen der Darmwand aufgenommen. Dort werden resorbierte langkettige Fettsäuren mit Monacylglycerol zu Neutralfetten resynthetisiert und zusammen mit anderen Lipiden (Chol, CE, PL) und Apolipoproteinen zu Chylomikronen (CM) zusammengefügt (RHOADES und PFLANZER 1989). Durch Exocytose werden die CM zunächst in die intestinalen Lymphgefäße entlassen und gelangen schließlich über den *Ductus thoracicus* in das Blutgefäßsystem (PENZLIN 1996). An Fett- und Muskelgewebe aktivieren die CM das Enzym Lipoproteinlipase (LPL), geben dadurch den größten Teil ihrer Triglyceride ab und werden als Chylomikronen-Remnants (CM-Reste; CMR) von der Leber durch Rezeptor-vermittelte Endocytose aus dem Kreislauf entfernt.

**Tab. 1: Charakteristika der Plasmalipoproteinklassen.**

(zusammengefaßt nach DOLPHIN 1985, KOOLMAN und RÖHM 1994, MYANT 1990, STRYER 1988)

Plasmalipoproteinklasse	Dichte ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ )	Durchmesser (nm)	Apolipoproteine <sup>‡</sup>
CM	< 0,95	~ 200	A-I, A-II, A-IV, B-48
CMR	†	†	B-48, E
VLDL	0,950 - 1,006	~ 60	B-100, C-I, C-II, C-III, E
IDL	1,006 - 1,019	~ 30	B-100, E
LDL	1,019 - 1,063	~ 20	B-100
HDL	1,030 - 1,210	~ 10	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, E

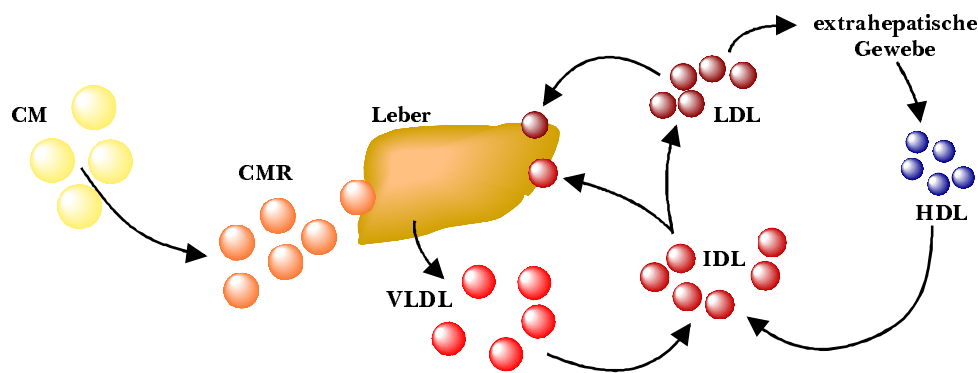
† keine Angaben

‡ Funktion der Apolipoproteine: **A-I**: LCAT-Aktivierung, Rezeptorbindung; **A-II**: Aktivierung der hepatischen Lipase; **A-IV**: LCAT-Aktivierung; **B-48**: Aufbau der VLDL; **B-100**: Aufbau der LDL, Rezeptorbindung; **C-I**: LCAT-Aktivierung; **C-II**: LPL-Aktivierung; **C-III**: LPL-Inhibitor, verhindert verfrühte Entfernung der CMR aus dem Plasma; **E**: LCAT-Aktivierung, Rezeptorbindung

In der Leber werden aus diesen aus der Nahrung aufgenommenen (*exogenen*) Lipiden und aus (*endogenen*) Speicherlipiden (Plasma-)Lipoproteine sehr geringer Dichte (*very low density lipoprotein*; VLDL) synthetisiert und in die Blutlaufbahn abgegeben. Durch schrittweisen Verlust der Triglyceride und Variation ihrer Apolipoprotein-Zusammensetzung verändern sich die VLDL-Partikel und werden aufgrund ihrer Dichte sukzessive in Lipoproteine mittlerer Dichte (*intermediate density lipoprotein*; IDL), geringer Dichte (*low density lipoprotein*; LDL) und hoher Dichte (*high density lipoprotein*;

HDL) eingeteilt und können als Plasmalipoproteinklassen aufgefaßt werden (Tabelle 1; vgl. auch ALAUPOVIC 1980).

Während der Transport von Triglyceriden, Phospholipiden, freiem und verestertem Cholesterol zu den Zielzellen der Organe durch VLDL, IDL und LDL organisiert ist, wird überschüssiges Cholesterol aus z.B. absterbenden Zellen von (in der Leber und im Darm synthetisierten) HDL aufgenommen, auf IDL übertragen und teilweise aus dem Kreislauf entfernt. Der Lipidtransport durch die Plasmalipoproteine ist schematisch in Abbildung 1 wiedergegeben.



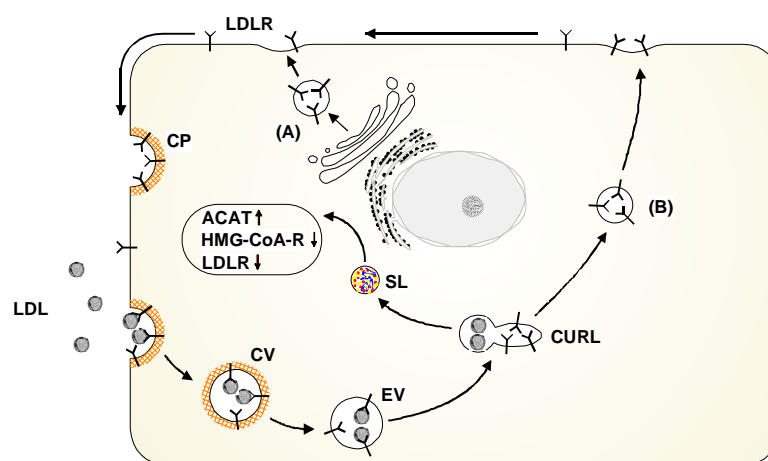
**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Triglycerid- und Cholesteroltransports durch Plasmalipoproteine.

**CM:** Chylomikronen, **CMR:** Chylomikronen-Remnants, **HDL:** Lipoproteine hoher Dichte, **IDL:** Lipoproteine mittlerer Dichte, **LDL:** Lipoproteine geringer Dichte, **VLDL:** Lipoproteine sehr geringer Dichte. CMR, IDL und LDL werden durch rezeptorvermittelte Endocytose in das Gewebe aufgenommen.

Eine zentrale Rolle bei der Regulation des Cholesterolangebots im Blutplasma hat dabei die Leber: durch Aufnahme, Ausscheidung in Form von Gallensalzen, Speicherung und Bereitstellung von exogenem bzw. endogenem Cholesterol reguliert sie die Menge an im Plasma transportiertem Cholesterol. Durch die Entdeckung mehrerer Mutationen im menschlichen LDL-Rezeptor-Gen (TOLLESHAUG *et al.* 1983), die zu einer verminderten Cholesterolaufnahme der Gewebe, einem gleichzeitig erhöhten Cholesterol-Plasmaspiegel und dem damit verbundenen Krankheitsbild der Familiären Hypercholesterinämie (FH) führen, wurde die Aufklärung des Regulationsmechanismus ermöglicht (BROWN und GOLDSTEIN 1979, vgl. MYANT 1990).

Erste von BROWN und GOLDSTEIN durchgeführte Arbeiten konnten zeigen, daß prinzipiell alle Gewebe zur *de novo* - Synthese von Cholesterol in der Lage sind, jedoch die Transkription des für die HMG-CoA-Reduktase codierenden Gens, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterolsynthese, unter physiologischen Bedingungen durch LDL-Cholesterol aus dem Plasma gehemmt wird, so daß eine *de novo* - Synthese unterbleibt (BROWN *et al.* 1973, BROWN und GOLDSTEIN 1974). Die LDL-Partikel werden dabei an LDL-Rezeptormoleküle gebunden, durch rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen und dem Zellmetabolismus zugeführt.

Abbildung 2 veranschaulicht die zellulären Vorgänge. Bindungskompetente LDL-Rezeptoren sind in hoher Dichte über ein Clathrin-assoziiertes Protein an mit Clathrin ausgekleidete Strukturen gebunden, die als *coated pits* (Korbgrube, Stachelsaumgrübchen) bezeichnet werden (*siehe* Kap. 1.2). Durch Einstülpung dieser Strukturen werden an den LDL-Rezeptor (und andere Rezeptoren) gebundene Liganden internalisiert (*coated vesicle*, CV) und nach Verlust der Clathrinhülle (*endocytic vesicle*, EV) in ein als CURL (*compartment of uncoupling of receptor and ligand*) bezeichnetes Kompartiment überführt, in dem Ligand und Rezeptor aufgrund erniedrigter pH-Bedingungen voneinander gelöst und räumlich getrennt werden.



**Abb. 2: Schematischer Ablauf der rezeptorvermittelten Endocytose des LDL-Rezeptors.**

Erklärung *siehe Text*. (A) Rezeptor *de novo* - Synthese. (B) Rezeptor-Recycling. **ACAT**: Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase, **CP**: *coated pit* (Korbgrube, Stachelsaumgrübchen), **CV**: *coated vesicle* (Korbvesikel), **EV**: *endocytic vesicle* (glattes Vesikel), **CURL**: *compartment of uncoupling of receptor and ligand* (Endosom), **HMG-CoA-R**: HMG-CoA-Reduktase, **LDL**: *low density lipoprotein* (Lipoprotein geringer Dichte), **LDLR**: LDL-Rezeptor, **SL**: sekundäres Lysosom (nach BROWN und GOLDSTEIN 1979, MYANT 1990, WEHNER und GEHRING 1990).



Der Rezeptor gelangt in Vesikel verpackt an die Zelloberfläche und wandert diffus in der Plasmamembran bis er schließlich wieder in den *coated pits* gebunden wird - dieser Zyklus kann mehrfach durchgeführt werden. Die im Kompartiment verbleibenden LDL-Partikel hingegen fusionieren mit primären Lysosomen zu einem sekundären Lysosom, in dem sie fragmentiert werden. Das dabei frei werdende Cholesterin greift regulatorisch in den Zellmetabolismus ein:

- Die Transkription der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coa-Reduktase (HMG-CoA-R) wird gehemmt.
- Die Transkriptionsrate des LDL-Rezeptors wird gesenkt.
- Freies Cholesterin aktiviert die AcylCoa:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT).

Durch diesen Eingriff ist gewährleistet, daß bei einer erhöhten Cholesterolkonzentration im Cytoplasma, die *de novo* - Synthese suprimiert, die Zufuhr an Cholesterin verringert und das freie Cholesterin als Cholesterolester gespeichert wird.

Die Ligandenspezifität des LDL-Rezeptors beschränkt sich auf Plasmalipoproteine, die die Apolipoproteine ApoB-100 und ApoE tragen (LDLR = ApoB/E-Rezeptor; vgl. Tab. 1). Dadurch konkurrieren VLDL, IDL, LDL und eine Unterklasse von HDL um die Rezeptorbindung und können so den Zellstoffwechsel und über die Leber den Gesamtkörperstoffwechsel regulierende Stimuli darstellen.

Im folgenden soll kurz die Struktur des Rezeptors in Hinblick auf seine Funktion und seine evolutive Herkunft dargestellt werden.

## 1.2 Struktur und Funktion des LDL - Rezeptors

Der LDL - Rezeptor bildet mit sechs weiteren integralen Membranproteinen die LDL-Rezeptor Genfamilie (Abb. 3; BROWN *et al.* 1997, SAPPINGTON und RAIKHEL 1998). Allen Mitgliedern dieser Verwandtschaft gemeinsam ist ein serieller Aufbau von vier bis fünf distinkten Domänen, die ihrerseits zu Proteinen anderer Genfamilien homologisiert werden können (RUSSELL *et al.* 1984, STANLEY *et al.* 1985, SUZUKI und RIGGS 1993, WESSEL 1995). Diese Domänen sollen kurz am Beispiel des Human-LDL-Rezeptors in der Reihenfolge der Aminosäuresequenz vom extrazellulären Aminoterminus aus dargestellt werden:

- **Die Ligandenbindungsdomäne**

Die Ligandenbindungsdomäne besteht aus 292 Aminosäuren (AS), die zu sieben sich wiederholenden Schleifen (*repeats*) mit ungefähr je 40 AS zusammengefaßt sind. Der hohe Cystein-Anteil organisiert die Tertiärstruktur der Bindungsdomäne vermutlich so, daß negativ geladene AS-Residuen an der Oberfläche exponiert werden und mit positiv geladenen Residuen der Apolipoproteine B-100 und E bei der Bindung der Liganden in Wechselwirkung treten (SCHNEIDER *et al.* 1982). Neuere (kristallographische) Untersuchungen des *repeat 5* zeigen hingegen, daß die negativen Koordinationsstellen mit  $\text{Ca}^{2+}$  belegt sind und nicht für eine Ligandenbindung bereitstehen (FASS *et al.* 1997).

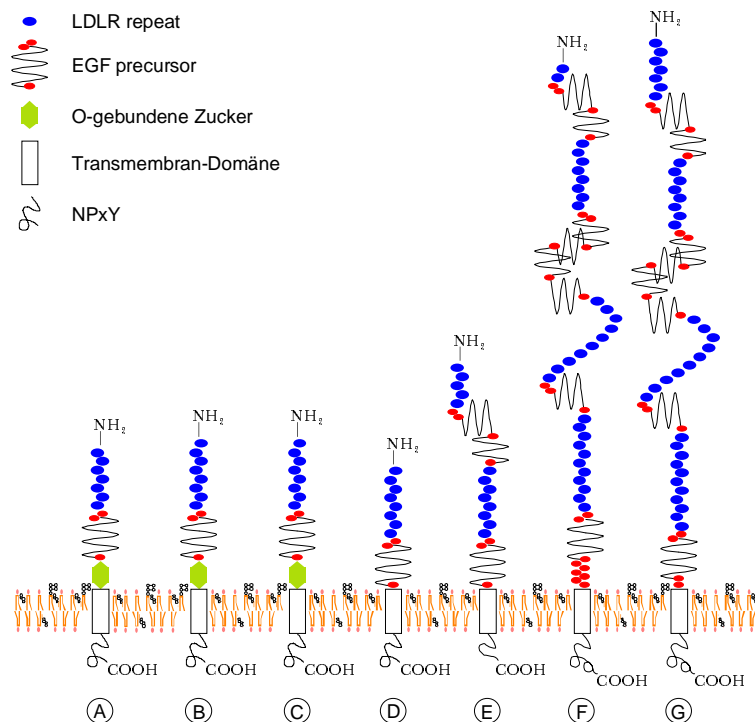
- **Die EGF-Precursor-Homologie Domäne**

Weitere mögliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen finden sich in dem sich anschließenden ca. 400 Aminosäuren umfassenden Abschnitt (STENFLO *et al.* 1988), der dem Precursor des epidermalen Wachstumsfaktors zu 35% identisch ist (RUSSELL *et al.* 1984). Daneben vermittelt diese Domäne die pH-abhängige Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes (DAVIS *et al.* 1987).

- **Domäne mit O-gebundenen Zuckern**

Diese dritte Domäne besteht aus 58 Aminosäuren, von denen vermutlich alle 18 hydroxylierten AS glykosiliert sind (CUMMINGS *et al.* 1983). Die O-gebundenen Zucker unterlaufen eine posttranslationale Elongation, die sich in einer verringerten Mobilität in SDS-Page Applikationen äußert (TOLLESHAUG *et al.* 1982). Eine für die

Rezeptoraktivität notwendige Funktion konnte bislang nicht nachgewiesen werden (SCHNEIDER 1989).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Proteine der Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (LDLR) Genfamilie.**

**A.** LDL-Rezeptor (*Homo sapiens* - YAMAMOTO *et al.* 1984, *Xenopus laevis* - METHA *et al.* 1991, *Chyloscyllium plagiosum* - MEHTA *et al.* 1996). **B.** VLDL-Rezeptor (*Oryctolagus cuniculus* - TAKAHASHI *et al.* 1992). **C.** Neuro-Apo E / LR8B Rezeptor. (*Gallus gallus* - NOVAK *et al.* 1996) **D.** Vitellogenin-Rezeptor (*Gallus gallus* - BUJO *et al.* 1994). **E.** Vitellogenin-Rezeptor (*Drosophila melanogaster* - SCHONBAUM *et al.* 1995, *Aedes aegypti* - SAPPINGTON *et al.* 1996). **F.** Lipoprotein-Rezeptor-  
verwandter Rezeptor (*Homo sapiens* - HERZ *et al.* 1988, *Gallus gallus*). **G.** Megalin / gp330 Rezeptor (*Rattus norvegicus* - SAITO *et al.* 1994, *Caenorhabditis elegans*, YOCHEN *et al.* 1993). Abbildung verändert nach BROWN *et al.* (1997).

- **Transmembran-Domäne**

Diese konservative Sequenz aus 22-25 hydrophoben AS ermöglicht die Verankerung des Rezeptors in der Lipid-Doppelschicht (RUSSELL *et al.* 1984). Mutagene Deletion dieses Bereichs führt zur Sekretion eines verkürzten Rezeptormoleküls (LEHRMAN *et al.* 1987).

- **Cytoplasmatische Domäne**

Die Konsensus-Sequenz NPxY (x = beliebige AS) dieses 50 AS langen Bereichs verankert den Rezeptor durch Interaktion mit einem Clathrin-assoziierten Protein in den *coated pits* (CHEN *et al.* 1990).

Die Gesamtlänge des Rezeptormoleküls wird aus Untersuchungen einer fötalen Human-cDNA-Nukleotidsequenz mit 839 AS angegeben (YAMAMOTO *et al.* 1984). Das apparente Molekulargewicht wird für den menschlichen, den bovinen und den caninen Rezeptor übereinstimmend mit 160 kD unter reduzierenden (SCHNEIDER *et al.* 1982, TOLLESHAUG *et al.* 1982, DANIEL *et al.* 1983, HUI *et al.* 1986) bzw. 130 kD unter nicht-reduzierenden SDS-PAGE Bedingungen angegeben (DANIEL *et al.* 1983, WADE *et al.* 1985, HUI *et al.* 1986, SOUTAR *et al.* 1986). Widersprüchliche Angaben hingegen finden sich bei BEISIEGEL *et al.* (1982), in deren Arbeit ein apparentes Molekulargewicht von 160 kD unter ebenfalls nicht reduzierenden Bedingungen angegeben wird.

Bislang ist nicht bekannt, welchen Ursprung die LDLR-Genfamilie besitzt. Sequenzvergleiche von cDNA-Banken weisen daraufhin, daß die Proteine dieser Familie möglicherweise in einem gemeinsamen Vorfahren des VLDL-Rezeptors wurzeln (SAPPINGTON und RAIKHEL 1998). Das für die Bindungsdomäne codierende Gen läßt sich sogar zu einem hohen Prozentsatz mit DNA-Sequenzen „niederer“ Invertebraten zur Übereinstimmung bringen (G-Protein gekoppelter Rezeptor aus *Lymnaea stagnalis*, MEHTA *et al.* 1996; Hämoglobin aus *Lumbricus terrestris*, SUZUKI und RIGGS 1993). Dabei bleibt allerdings ungeklärt, ob die identische Struktur auf eine direkte Verwandtschaft oder eine funktionelle Notwendigkeit zurückzuführen ist. Es ist sogar ein LDL-bindendes Protein bei *Trypanosoma brucei* (Protozoa, Flagellata) beschrieben worden (COPPENS *et al.* 1992); eine phylogenetische Einordnung dieses Proteins ist meiner Kenntnis nach noch nicht vorgenommen worden.

Aufgrund dieser Untersuchungen verwundert es kaum, daß die verschiedenen Lipoproteinklassen an artfremde Lipoproteinrezeptoren innerhalb der Wirbeltiere zu binden vermögen. In Tabelle 2 sind einige der Experimente, in denen eine positive Kreuzreaktivität (also eine spezifische Bindung) nachgewiesen werden konnte, zusammengefaßt.

**Tab. 2: Übersicht über bereits durchgeführte Untersuchungen zu Plasmalipoprotein-Bindungseigenschaften an Lipoproteinrezeptoren von Vertretern verschiedener Wirbeltierklassen.**

		LIGAND							
		Mensch	Rind	Hund	Hase	Maus	Frosch	Vogel	Fisch
R E Z E P T O R	Mensch	S,F	--	--	--	--		--	F
	Rind	K1,K2, SCH1, SCH2	K2	--	--	--		--	--
	Hund	H <sup>*</sup>	--	H	--	--		--	--
	Hase	--	--	--	--	--		--	--
	Maus	--	--	--	B	B		--	--
	Frosch	ME	--	ME	ME	--	ME	--	STI
	Vogel	ST1	--	--	ST1	--		ST1,ST2, SU	STI
	Fisch	F	--	--	--	--		--	F,G,M, STI
* ungenaue Angaben -- z.Zt. lagen keine Untersuchungen vor		<b>B:</b> BALASUBRAMANIAM <i>et al.</i> 1994, <b>F:</b> FAINARU <i>et al.</i> 1988, <b>G:</b> GJØEN und BERG 1992, <b>H:</b> HUI <i>et al.</i> 1986, <b>K1:</b> KOVANEN <i>et al.</i> 1979a, <b>K2:</b> KOVANEN <i>et al.</i> 1979b, <b>M:</b> MAÑANÓS <i>et al.</i> 1997, <b>ME:</b> MEHTA <i>et al.</i> 1991, <b>S:</b> SOUTAR <i>et al.</i> 1986, <b>ST1:</b> STEYRER <i>et al.</i> 1990, <b>ST2:</b> STEYRER <i>et al.</i> 1995, <b>STI:</b> STIFANI <i>et al.</i> 1990, <b>SU:</b> SULISTİYANI und ST. CLAIR 1991.							

Dabei haben sich Untersuchungen interspezifischer Art häufig auf das System Mensch - Rind gestützt, das sich für vergleichende Aspekte als Standardmodell gut eignet. Experimente zum Plasmalipoprotein-Metabolismus der Fische befassen sich hauptsächlich mit dem Vitellogeninrezeptor (VTGR). Nur eine einzige Arbeit (FAINARU *et al.* 1988) konnte eine spezifische Bindungsfähigkeit von menschlichen Plasmalipoproteinen (LDL) an Membranen von Fischen (*Cyprinus carpio*) nachweisen.

### 1.3 Vorausgehende Befunde aus der Arbeitsgruppe und Zielsetzung der Arbeit

Mehrere, aus der Arbeitsgruppe hervorgegangene Untersuchungen liegen bereits zum Lipidstoffwechsel des Karpfen vor. Diese beinhalten, neben anderen Arbeiten, die Charakterisierung der Plasmalipoproteine warm- und kalt-angepaßter Karpfen (WODTKE und THUN 1990), Arbeiten zum Temperatureinfluß auf die Eigenschaften von Membranen (z.B. WODTKE und COSSINS 1991) und Untersuchungen zum Cholesterollowerstand auf der Ebene der HMG-Co-Reduktase und der ACAT (TEICHERT und WODTKE 1992). Damit liegen für einen weiten Bereich Befunde vor, die einen Beitrag zum Verständnis der Cholesterollowerstand bei ektothermen Wirbeltieren darstellen.

Für die vorliegende Arbeit sollten für diese Arbeitsgruppe erstmalig Methoden etabliert werden, die einen physiologischen Nachweis und eine biochemische Charakterisierung des LDL-Rezeptors in Karpfen in Bezug auf die Bindungsparameter  $K_D$  und  $B_{max}$ , die Spezifität der Ligandenbindung, die Calciumabhängigkeit der Bindung, das Molekulargewicht des Rezeptors u.a. ermöglichen. Diese Untersuchungen waren notwendig geworden, da die bereits vorliegenden Experimente, analog zum System der Säuger, auf eine Beteiligung des LDL-Rezeptors an der Cholesterollowerstand hindeuteten, aber eine biochemische Charakterisierung des LDL-Rezeptors bei Fischen bislang nicht vorlag.

Dazu sollte auch in ersten (Vor-)Untersuchungen der Einfluß der Fütterung und der Adaptationstemperatur als die Cholesterollowerstand beeinflussende Faktoren geklärt werden, um eine vorläufige Einordnung in oben genannte Befunde vornehmen zu können. Darüber hinaus sollte der Befund von FAINARU *et al.* (1988), daß Human-LDL an den Karpfen-LDL-Rezeptor binden, überprüft werden. Zusätzlich sollte an Gewebe ausgewählter Spezies die Frage geklärt werden, ob LDL prinzipiell an artfremde LDL-Rezeptoren zu binden vermögen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Übersicht über den Versuchsablauf und methodische Vorüberlegungen

Die Durchführung von Rezeptorbindungsstudien erfordert hohen methodischen Aufwand und die Anwendung vieler, unterschiedlicher Techniken (HULME 1992). Insbesondere bedürfen Untersuchungen an Plasmalipoprotein-Rezeptoren der Präparation sowohl rezeptorhaltigen Gewebes, als auch des Liganden in Form der Plasmalipoproteine. Dadurch ist das Ergebnis aus diesen Bindungsstudien stets vom methodischen bzw. experimentellen Fehler der vorausgehenden Einzelexperimente mitbeeinflusst. Damit der experimentelle Fehler aller Versuche möglichst gering ausfällt, muß also eine wohl definierte Grundlage geschaffen werden, die - einschließlich der Auswertung - eine hinreichend genaue Reproduzierbarkeit der Methoden gewährleistet.

In Vorversuchen stellte sich beispielsweise die Menge der isolierten Lipoproteine (in mg Protein) als die Anzahl der durchzuführenden Versuche limitierender Faktor heraus (vgl. Kap. 7.3). Mit der Möglichkeit nur einige wenige Experimente unter gleichen Bedingungen durchzuführen, wurde auch gleichzeitig die Möglichkeit eine statistische Analyse mit einer hohen Versuchsanzahl vorzunehmen, stark eingeschränkt.

Untersucht man Befunde bereits veröffentlichter Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, stellt man fest, daß die dort beschriebenen Bindungsparameter - vermutlich aufgrund ähnlicher Überlegungen - meistens aus nur einem „repräsentativen“ Experiment hervorgegangen sind, dem in der Regel auch nur eine Liganden- bzw. eine Membranpräparation zugrunde liegt (siehe KOVANEN *et al.* 1979a, KOVANEN *et al.* 1979b, GEORGE *et al.* 1987). Auch die von FAINARU *et al.* (1988) bestimmten Bindungsparameter für das Bindungsexperiment von <sup>125</sup>I-hLDL an Lebermembranen des Karpfen basieren nur auf einer Kurvendarstellung von je 6 Datenpunkten, die mit zwei (Lipoprotein?-) Präparationen und einer nicht genau definierten *gepoolten* Membranpräparation mehrerer Tiere durchgeführt worden ist. Man kann also davon ausgehen, daß diese Vorgehensweise zumindest für Plasmalipoprotein-Bindungsstudien durchaus üblich ist.

Um dennoch eine möglichst hohe Aussagekraft der Experimente zu erreichen, wurden die Versuche so angelegt, daß vergleichende Aspekte möglichst mit nur einer Liganden- und nur einer Membranpräparation untersucht wurden. Damit wurde gewährleistet, daß Unterschiede im Bindungsverhalten des Liganden an die Membranen „biologische“, nicht aber methodische Unterschiede widerspiegeln. Zusätzlich stammten sowohl die verwendeten Membranen als auch die isolierten Lipoproteine von *gepoolten* Präparationen mehrerer Tiere (mind. drei Individuen), so daß es sich bei den Präparationen weitestgehend um ein repräsentatives Kollektiv und nicht um nicht-repräsentative Einzeltiere gehandelt haben dürfte.

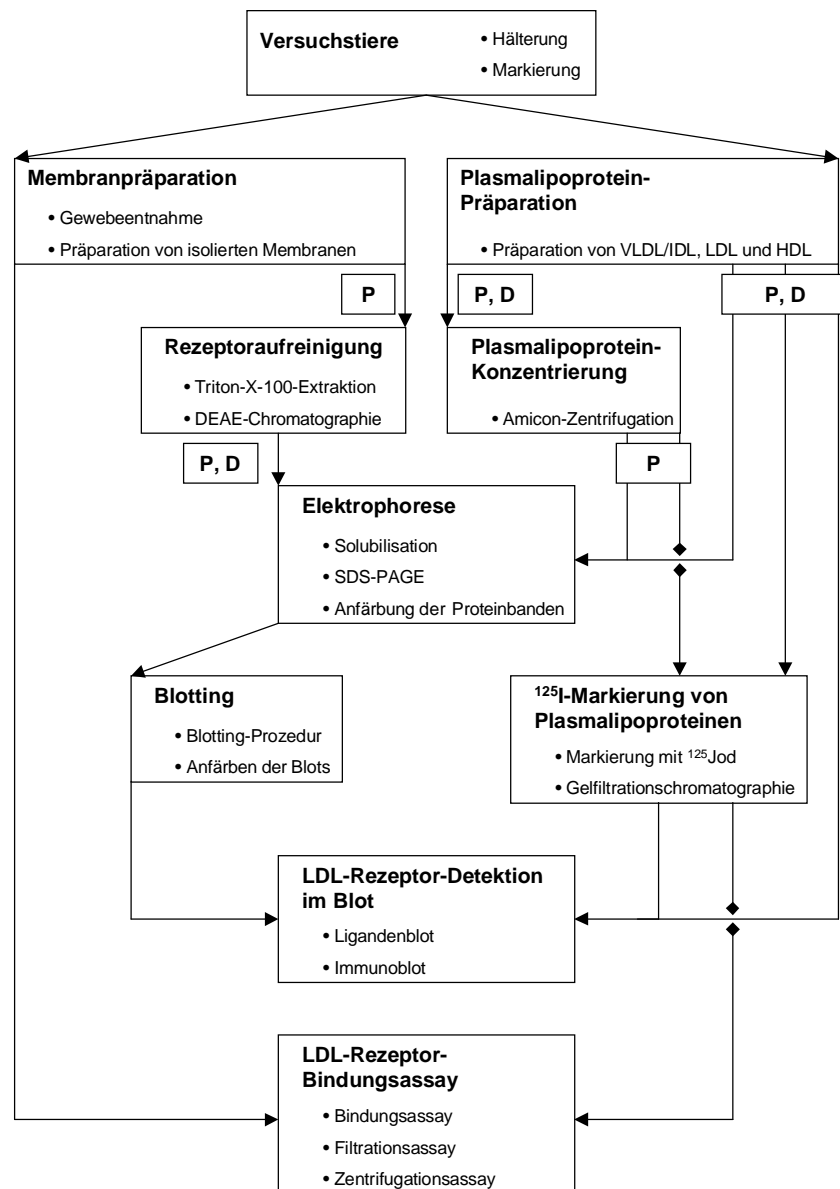
Zunächst wurden die Versuchstiere den Hälterungsbedingungen langfristig angepaßt ( vgl. Kap 2.2). Die Membran- und Lipoproteinpräparationen erfolgten nach den Anweisungen in den Kapiteln 2.3 bzw. 2.4 und wurden darauf entsprechend den oben angestellten Überlegungen für die Versuche eingesetzt.

Die rezeptorhaltigen Membranen wurden größtenteils direkt in den *LDL-Rezeptor-Bindungsassay* eingesetzt (Kap. 2.12). Daneben habe ich versucht, den Rezeptorgehalt dieser Präparation zu erhöhen (Abb. 4: *Proteinaufreinigung*), sowie das Molekulargewicht des Rezeptors in geblotteten SDS-PAGE-Präparationen zu bestimmen. Dazu wurden sowohl native als auch <sup>125</sup>I-gekoppelte Lipoproteinpräparationen eingesetzt (*Ligandenblot*). Zusätzlich konnte ein gegen den bovinen LDL-Rezeptor hergestellter, monoklonaler Antikörper für die Untersuchungen herangezogen werden (*Immunoblot*).

Die Lipoproteinpräparationen wurden größtenteils mit <sup>125</sup>Jod gekoppelt und im Bindungsassay mit den nativen Membranen eingesetzt. Außerdem wurden diese modifizierten Lipoproteine für die *LDL-Rezeptor-Detektion im Blot* verwendet. Die besondere Bedeutung der nativen LDL liegt in deren Verwendung in hohem Überschuß zur Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung in Bindungsexperimenten (*Ligandenblot* und *Bindungsassay*; vgl. 2.12.4). Zusätzlich wurde das Apolipoproteinmuster der Lipoproteinfraktionen von Karpfen- und Human-Plasma nach SDS-PAGE miteinander verglichen.

Eine schematische Übersicht über den experimentellen Ablauf findet sich in Abbildung 4.





**Abb. 4:** Schematische Übersicht zum Versuchsablauf.

D: Dialyse, P: Proteinbestimmung.

Die Auswertung der verwendeten Methoden war teilweise erschwert, da mehrere theoretische Anschauungsmodelle in der Literatur diskutiert wurden. Dieses ist nicht verwunderlich, da viele biochemische Analyseverfahren erst seit relativ kurzer Zeit existieren und einige Aspekte in ihrer Beurteilung noch nicht abgeschlossen sind. Diese Vielfalt kann, wie bereits gezeigt wurde, zur falsch begründeten Anwendung mathematischer Modelle führen (LOBEMEIER 2000).

Deshalb wurde darauf geachtet, daß die Anwendbarkeit einer bestimmten Auswertungsmethode, im Vergleich zu anderen Verfahren, in jedem Fall belegt wurde (vgl. MOTULSKY und RANSNAS 1987, RUSLING und KUMOSINSKI 1996).

Insbesondere soll an dieser Stelle auf die Kapitel zur Auswertung der Proteinbestimmung (Kap. 2.5) und Analyse der Bindungsassays (Kap. 2.12.4) verwiesen werden, in denen versucht wurde, eine objektive Bemessungsgrundlage zu schaffen, die es erlaubt eine bestimmte Auswertungsmethode anderen Verfahren vorzuziehen. Dazu wurden Computerprogramme geschrieben, die sich kommentiert im Anhang (Kap. 7) befinden.

## **2.2 Das Versuchstier**

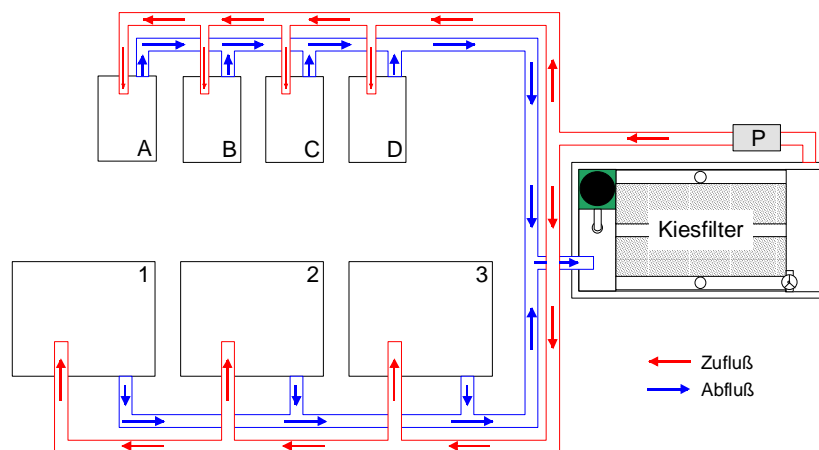
Der Karpfen (*Cyprinus carpio* LINNÉ 1758) ist als bedeutender Speisefisch der namengebende Vertreter der Familie *Cyprinidae* (Karpfenartige; BROHMER 1988). Sein natürliches Verbreitungsgebiet ist auf Teiche, Seen und langsam fließende Gewässer mit einem maximalem Salzgehalt von 0,9 bis 0,1 % begrenzt, in denen er sich hauptsächlich von kleinerer Wasserfauna ernährt (STEFFENS 1980). Aus dem ursprünglichen, vermutlich kontinuierlichem Verbreitungsgebiet Eurasiens, daß sich heute in 4 bis 5 geographische Gebiete mit endemischen Unterarten der Wildform unterteilen läßt, hat der Karpfen in seinen Zuchtformen weltweite Verbreitung gefunden (BILLARD 1999). Für die hier vorgestellten Experimente wurden Spiegelkarpfen verwendet. Eine exakte Zuordnung konnte allerdings nicht vorgenommen werden, da bei den gehälterten Fischen auch mitunter Individuen auftraten, die vom Habitus eher als Zeilenkarpfen anzusprechen waren; diese wurden jedoch nicht für die Experimente verwendet.

### **2.2.1 Hälterung**

Spiegelkarpfen beider Geschlechter wurden von der Fischzucht REESE, Sarlhusen und der Fischzucht Walessa, Lütjenburg, als K<sub>2</sub> mit einem Gewicht von 300 bis 500 g und von der Fischzucht Walessa als K<sub>2</sub> mit einem Gewicht von 500 bis 700 g bezogen. Daneben wurden auch Tiere (K<sub>1</sub>) mit einem Gewicht von durchschnittlich 80 g aus der Zucht der BUNDESANSTALT FÜR FISCHEREI (Ahrensburg) gehältert. Bei der Anlieferung wurden die Tiere in der Regel wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben behandelt. Nach drei- bis vierwöchiger Quarantäne wurden neue Tiere an den Wasserkreislauf des Altbestandes mitangeschlossen.

Die Hälterung der Karpfen erfolgte in  $10 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $22 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  klimatisierten Räumen mit einer Photoperiode von 12 h Licht / 12 Dunkel (Lichtphase von 6<sup>00</sup> - 18<sup>00</sup> Uhr MEZ). Ausgehend von der Wassertemperatur des Zuchtbetriebes wurde die jeweilige Umgebungstemperatur durch Absenken bzw. Erhöhen um  $1 \text{ }^\circ\text{C}$  pro Tag erreicht. Vor Versuchsbeginn waren die Tiere mindestens 30 Tage an die jeweilige Temperatur adaptiert.

Die Tiere befanden sich in einem geschlossenen Wasserkreislauf, der schematisch in Abbildung 5 wiedergegeben ist. Schwarzgefärbte Glasfiberbecken mit einem Volumen von 90 bzw. 280 l waren an die Kiesfilterkompaktanlage der Fa. Sander Elektroapparatebau GmbH & Co. KG. (vgl. Abb. 6) angeschlossen. Die Gesamtwassermenge der Anlage im  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ -Raum betrug ca. 2000 l und im  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ -Raum mit zwei installierten 280 l Becken ca. 1400 l. Zusätzlich zur Raumklimaanlage wurde im  $22^\circ\text{C}$  Raum ein Thermostat (Julabo) in den Wasserkreislauf eingesetzt, um bei Ausfall der Klimaanlage eine konstante Temperatur zu gewährleisten.

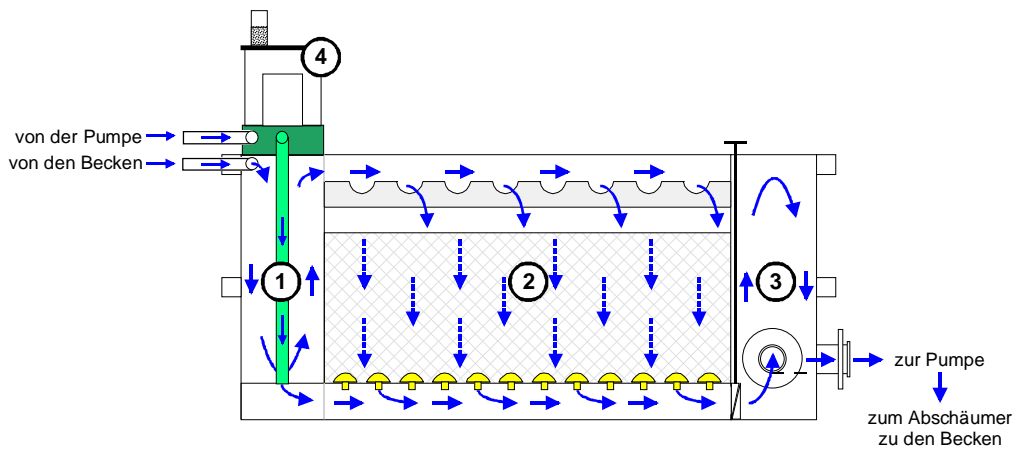


**Abb. 5:** Schematischer Aufbau der Aquariumsanlage im  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ -Raum.

Das Wasser wird über die Pumpe (P) aktiv in die Becken (1-3: je 280 l Volumen; A-D: je 90 l Volumen) gepumpt und fließt schwerkraftgetrieben wieder in das Kiesfilter (Fassungsvermögen des Kiesfilters: ca. 900 l) zurück.

Die Besatzdichte lag bei maximal 50 g Fisch / l Beckenwasser. Die Säuberung der Kiesfilteranlage erfolgte während der Versuchszeit täglich zwischen 9<sup>00</sup> und 11<sup>00</sup> Uhr. Dabei wurde zunächst die Anlage nach Vorschrift gesäubert und dabei ungefähr 900 l Wasser aus dem Kreislauf gegen temperiertes Frischwasser ausgetauscht, erst dann erfolgte die Fütterung. Ein Schnelltest auf Nitrat und Nitrit (Merckoquant<sup>®</sup> Nitrat-Test) verlief nur dann negativ, wenn die beschriebene Reihenfolge eingehalten wurde. Fütterte man hingegen

zuerst und säuberte anschließend, konnten kurzzeitig geringe Mengen Nitrat (10-25 mg  $\text{NO}_3^-$  / l Aquarienwasser) nachgewiesen werden.



**Abb. 6:** Fließschema der Kiesfilteranlage.

1: Vorklärkammer, 2: Kiesfilter, 3: Klarwasserkammer, 4: Abschäumer.

Die Tiere wurden ein bis zweimal täglich mit Ecovit Forellenfutter Typ 252 gefüttert. Auf der Basis des Körpergewichts wurden täglich Futtermengen von 0,5 %, 1,0 % und 2,0 % des Körpergewichts verfüttert. Dazu wurden die Karpfen wie nachfolgend beschrieben markiert und alle drei bis vier Wochen einzeln gewogen, um ernährungsphysiologische Parameter wie Gewichtszunahme, Wachstum und Futterausnutzung besser abschätzen zu können. Unabhängig von der Hälterungstemperatur nahmen alle Fische kontinuierlich Futter auf.

### 2.2.2 Markierung der Tiere

Da bis zu 25 Tiere in einem Becken zusammen gehalten wurden, konnte zwar eine bestimmte Futtermenge vorgegeben, jedoch weder die Futtermenge jedem Tier einzeln zugeteilt noch die individuelle Futteraufnahme kontrolliert werden. Die zuverlässige Bestimmung einer Gewichtszunahme bzw. -abnahme, sowie des ernährungsphysiologischen Zustandes war somit nur durch Markierung und Einzelwägung der Tiere zu erreichen.

Für das Verfahren der Kaltbrandmarkierung (vgl. GOERLICH 1983) wurden die Zahlen Null bis Neun aus Aluminiumdraht ( $\varnothing$  2 mm) zu einem Stempel geformt. Nach kurzem Eintauchen in flüssigen Stickstoff wurden diese den Tieren für ca. 15 Sekunden auf den

oberen Rückenbereich der linken Körperhälfte gedrückt. Die Markierung blieb mehrere Monate gut sichtbar.

### **2.2.3 Behandlung der Tiere bei Krankheitsbefall**

Während Befall mit Ektoparasiten wie *Argulus* oder *Pisciola* mit bloßem Auge erkannt und entsprechend behandelt werden konnte, wurde auf eine mikroskopische Analyse der Hauttrübung verursachenden Einzeller verzichtet. Es handelte sich dabei aber wohl hauptsächlich um *Ichtiophthyrius* und *Costia*, die aufgrund ihrer z.T. charakteristischen Symptome erkannt und bekämpft wurden.

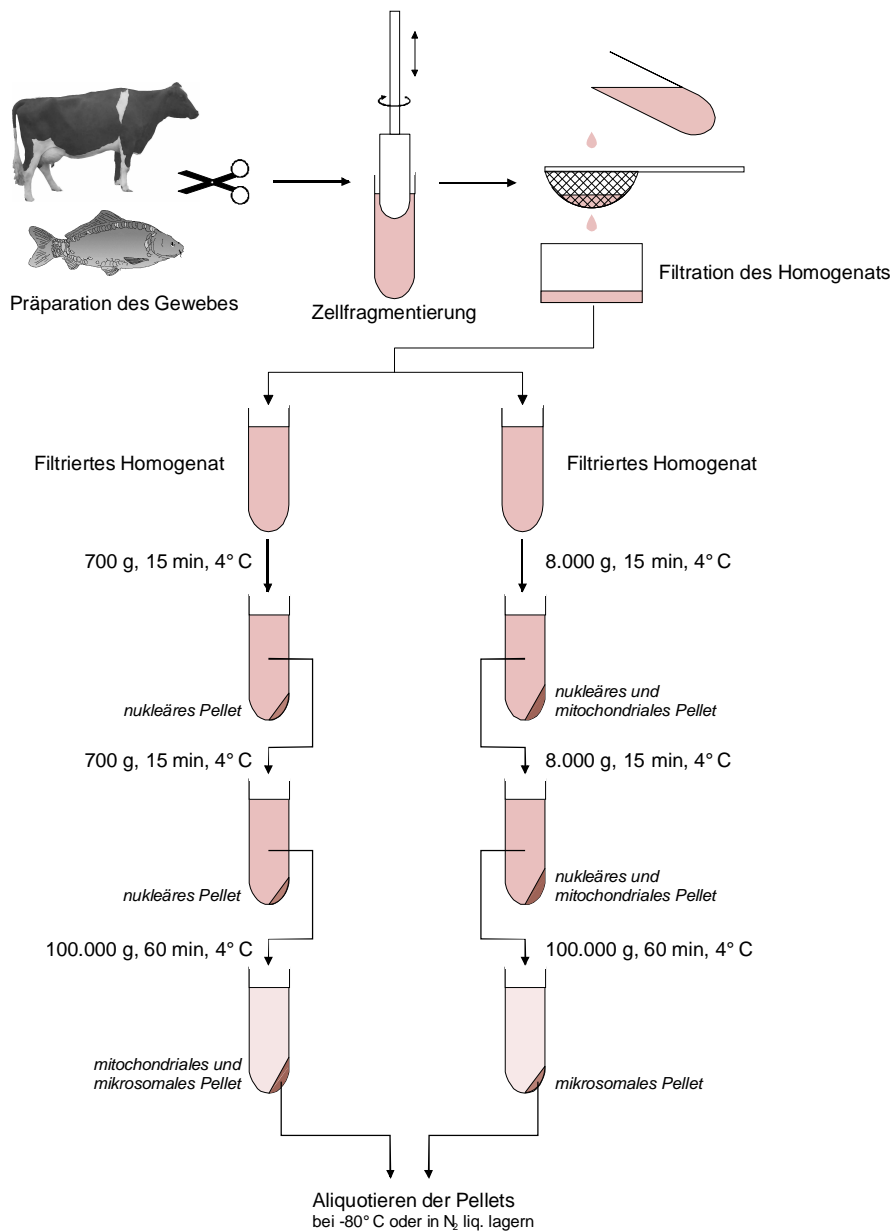
Obwohl eine therapeutische Wirkung von Kochsalzbädern in wissenschaftlichen Beiträgen oftmals in Frage gestellt wird (vgl. SCHÄPERCLAUS 1954), kam dieses Mittel auf Anraten mehrerer Fischzüchter mit gutem Erfolg zum Einsatz. Zusätzlich wurde ein Analogon eines Präparats, das im Handel unter dem Namen EXTRAPID<sup>®</sup> erhältlich ist, verwendet. Beide Therapeutika kamen als Kurzzeitbäder zum Einsatz und wurden nach einer Woche wiederholt. In der Regel traten danach keine Symptome mehr auf. Die Tiere waren mindestens 30 Tage vor Versuchsbeginn symptomfrei und dementsprechend während dieser Zeit unbehandelt.

## **2.3 Präparation von isolierten Membranen**

### **2.3.1 Präparation von isolierten Rinder-Nebennierenrinden-Membranen**

Rinder-Nebennieren wurden direkt vom örtlichen Schlachthof (Löblein GmbH, Kiel) ungefähr 15 Minuten nach Schlachtung bezogen und in eisgekühlter NaCl-Lösung (150 mM) innerhalb einer Stunde zum Institut gebracht. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt und folgen grundsätzlich der Arbeitsanweisung von KOVANEN *et al.* (1979b; vgl. Abb. 7). Die Nebennieren wurden gründlich von Fettgewebe befreit, aufgeschnitten und das Nebennierenmark entfernt. Die Nebennierenrinde von 6 - 12 Nebennieren wurde mit einem Skalpell vom Bindegewebe abgelöst, gesammelt und mit PMSF-Puffer mehrmals gespült. Das Gewebe wurde zerkleinert, gewogen und in PMSF-Puffer aufgenommen. Die Endkonzentration des Homogenats sollte ungefähr bei 10 - 20 % (w/v) liegen. Zunächst wurden die Gewebestücke jedoch nur in einem Drittel des Endvolumens aufgenommen und

bei 200 Upm in einem POTTER-ELVEHJEM-Homogenisator (30 ml Gefäß mit vorgekühltem Teflon-Pistill) bei 20 bis 25 Auf- und Abbewegungen mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde mit PMSF-Puffer auf das Endvolumen aufgefüllt und das Homogenat 5 min bei 700 g bzw. 8.000 g und 4 °C zweimal zentrifugiert (Kontron-Hermle Centricon H-401). Der Überstand wurden daraufhin 60 min bei 100.000 g und 4 °C sedimentiert.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes zur Präparation isolierter Membranen.

Angaben nach KOVANEN *et al.* 1979a, FAINARU *et al.* 1988, EVANS und GRAHAM 1991.

Die Pellets wurden vereinigt, zweimal durch einen Steptip 3 der Finpipette Stepette (Labsystems) gedrückt und in vorher ausgewogene 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert. Der Proteingehalt eines Aliquots wurde bestimmt und die übrigen Reaktionsgefäße bei -80°C eingefroren. Die Relation von Proteingehalt zum Frischgewicht des Pellets des untersuchten Aliquots, diente als Berechnungsgrundlage für den unbekanntem Proteingehalt der Proben, deren Frischgewicht bestimmt worden war.

Zusätzlich zu diesen Angaben wurden bei -80 °C gelagerte Human-Leber-Biopsieproben nach den oben angeführten Schritten verarbeitet.

### **2.3.2 Präparation von isolierten Karpfenleber-Membranen**

Die Karpfen wurden durch einen kräftigen Schlag auf den Schädel betäubt und anschließend durch Decapitieren getötet. Die Tiere wurden zur Ermittlung verschiedener Parameter (z.B. Lebersomatischer Index, *LSI*) gewogen und vermessen. Die Bauchhöhle wurde geöffnet und der gesamte Eingeweidetrakt entnommen (vgl. MEYER 1977). Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Gallenblase wurde vorsichtig abgetrennt, die Leber vom Darm gezogen, gewogen und mit PMSF-Puffer gespült. Das Gewebe wurde dann zunächst grob, darauf fein zerkleinert. Durch wiederholtes Spülen wurde die Leber von Bindegewebsresten und Blutgerinnseln befreit. Die Präparation der isolierten Lebermembranen folgt nach diesem Schritt der Anleitung zur Herstellung von Membranen aus Rinder-Nebennieren (vgl. Kap. 2.3.1) und ist in Abbildung 7 zusammengefaßt.

Die Präparation der Membranen erfolgte in der Regel, wenn nicht anders beschrieben, aus gesammeltem und gemeinsam verarbeitetem (*gepooltem*) Gewebe von je drei Tieren. Nach denselben Angaben wurden auch die Lebermembranen der Forelle präpariert.

## 2.4 Isolierung von Plasmalipoproteinen

Die Plasma-Lipoproteinfraktionen wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert (HAVEL *et al.* 1955). Dabei wurden die einzelnen Plasma-Lipoproteinfraktionen durch Erhöhung der Plasma-Dichte mit NaBr sukzessive isoliert. Die Masse des zuzuweigenden Natriumbromids berechnet sich mit der nachstehenden Formel (aus MILLS *et al.* 1984):

$$M = \frac{v \cdot (d_2 - d_1)}{1 - \bar{v} \cdot d_2}$$

d1:	vorhandene Dichte
d2:	einzustellende Dichte
M:	Masse des zuzuweigenden NaBr
v:	partielles Volumen des Wassers
$\bar{v}$ :	partielles spezifisches Volumen von NaBr

**Tab. 3: Partielles Volumen von NaBr bei 20 ° C in Abhängigkeit von der Dichte**

Dichte	$\bar{v}_{\text{NaBr; 20°C}}$
1,0200	0,2324
1,063	0,2386
1,085	0,2413
1,21	0,2521

Das partielle spezifische Volumen des Natriumbromids ist abhängig von der Temperatur und der Dichte der Lösung; die Angaben wurden den Angaben von MILLS *et al.* (1984) entnommen und sind für die hier verwendeten Dichten in Tabelle 3 aufgelistet.

Die Isolierung der Lipoproteinfraktionen erfolgte für Human-Plasma nach den Angaben von DOLPHIN (1985) und für Karpfen-Plasma in Anlehnung an die Angaben von SKINNER und ROGIE (1978).

### 2.4.1 Isolierung von Human Plasmalipoproteinen

Für erste Untersuchungen begab ich mich in die Blutspendezentrale des Universitätsklinikums, Kiel und ließ mir dort jeweils ca. 400 ml Blut abnehmen, das aus dem Venenast der Armbeuge direkt in ein Glasgefäß floß und unter stetigem Schwenken mit einer hochkonzentrierten EDTA-Lösung so verdünnt wurde, daß etwa ein 1 %-iges EDTA-Blut-Gemisch vorlag. Das Blut wurde auf Eis gekühlt ins Zoologische Institut gebracht, mit Pefabloc-Stammlösung (1:100) vermischt und dort bei 2.500 Upm, 15 min und 4 °C zentrifugiert (Heraeus Sepatech). Das Plasma wurde mit 2 µl Na-Azid-Stammlösung / ml versetzt.



In weiteren Versuchen wurde „Plasma aus Überständen“ verwendet. Dabei handelt es sich um ungefähr 10 ml Spenderblut Freiwilliger beider Geschlechter, das während einer Blutspende für serologische Untersuchungen abgenommen wurde. Direkt im Anschluß an die Spende wurden die zellulären Anteile sedimentiert und das Plasma über Nacht bei 4 °C gelagert. Nach 24 h wurde das Plasma von ungefähr 50 Spendern vereint, mit 2 µl Na-Azid-

**Tab. 4: Einteilung der Dichtebereiche für die Isolierung von Human-Plasmalipoproteinen.**

Lipoproteinklasse	Dichtebereich
Chylomikronen	$d < 1,006$
VLDL	$1,006 \leq d < 1,020$
LDL	$1,020 \leq d < 1,063$
HDL	$1,063 \leq d < 1,21$

Stammlösung / ml versetzt und im Zoologischen Institut weiterverarbeitet. Die Human Plasmalipoproteine wurden nach der Einteilung der Dichtebereiche aus Tabelle 4 isoliert.

Das Plasma wurde mit Dichtelösung ( $d=1,006$ ) überschichtet und bei 11.500 Upm für 30 min bei 10 °C zentrifugiert (Beckman L8-55). Die Chylomikronen wurden mit einer 1000 µl Eppendorf Pipette abgenommen, deren Spitze mit einem ausgezogenen und rechtwinklig abgewinkelten Schlauchaufsatz ( $\varnothing$  0,5 mm) versehen war und bei 4 °C unter  $N_{2,gas}$  im Dunkeln aufbewahrt. Der Unterstand wurde mit NaBr auf  $d = 1,020 \text{ g / cm}^3$  aufgesalzen, bei 40.000 Upm, 20 h und 10 °C zentrifugiert, die VLDL-Fraktion abgenommen und bei 4 °C unter  $N_2$ -gas dunkel aufbewahrt. Der Unterstand wurde mit NaBr auf  $d = 1,063 \text{ g / cm}^3$  aufgesalzen, bei 40.000 Upm, 20 h und 10 °C zentrifugiert, die LDL-Fraktion abgenommen und bei 4 °C unter  $N_2$  dunkel aufbewahrt. Der Unterstand wurde mit NaBr auf  $d = 1,21 \text{ g / cm}^3$  aufgesalzen und bei 40.000 Upm, 40 h und 10 °C zentrifugiert. Die HDL-Fraktion wurde abgenommen und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Die einzelnen Plasma-Lipoproteinfraktionen wurden schnellstmöglich mit den korrespondierenden Dichtelösungen aufgefüllt und ein weiteres Mal den Isolationsbedingungen entsprechend zentrifugiert. Die so gewaschenen Plasma-Lipoproteinfraktionen wurden mindestens 24 h bei 4-5 Wechseln gegen Dialysepuffer dialysiert. Die dialysierten Fraktionen wurden unter  $N_2$  bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Der methodische Ablauf für die Präparation von Human-Plasmalipoproteinen ist schematisch in Abbildung 8 wiedergegeben.

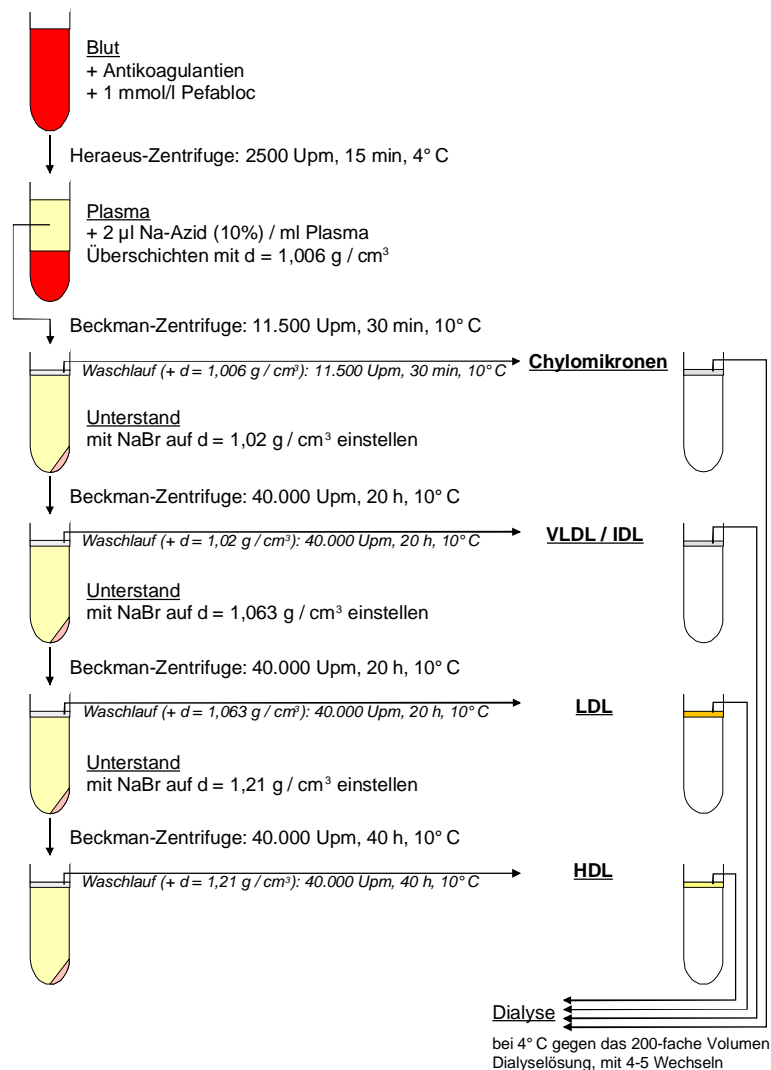


Abb. 8: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes zur Human-Lipoproteinpräparation.

### 2.4.2 Isolierung von Karpfen Plasmalipoproteinen

Vor der Blutentnahme wurden Karpfen verschiedener Größe mit 1 g MS 222 in 10 l Wasser

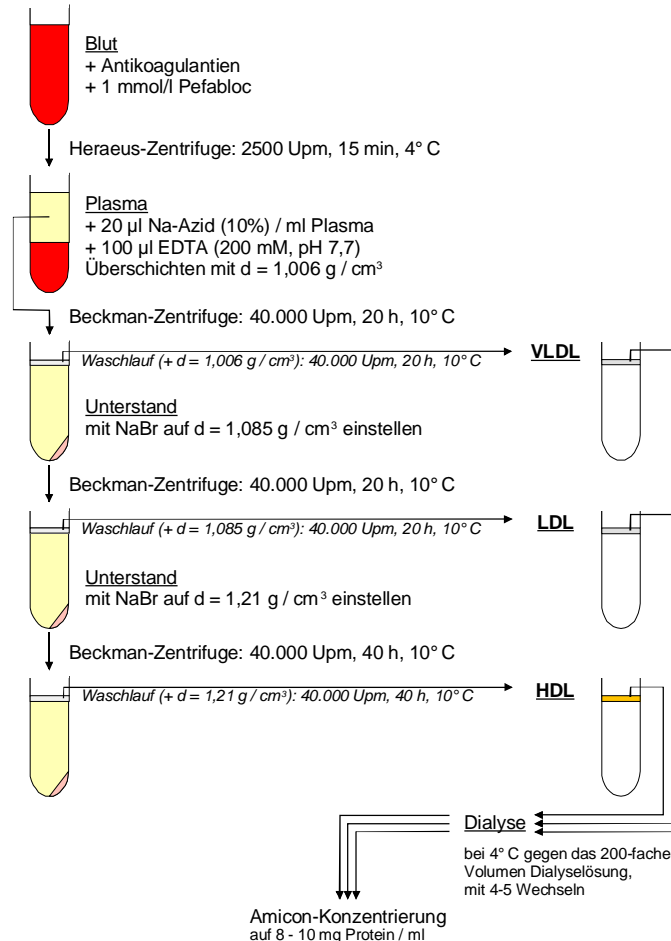
Tab. 5: Einteilung der Dichtebereiche für die Isolierung von Karpfen-Plasmalipoproteinen.

Lipoproteinklasse	Dichtebereich
VLDL	$d < 1,006$
LDL	$1,006 \leq d < 1,085$
HDL	$1,085 \leq d < 1,21$

betäubt und nach Verlust der Reflexe (Stadium III, BILLARD 1999) dem Wasser entnommen und dorsad auf Eis gelegt. Durch Herz- und Caudalvenenpunktion wurde das Blut durch heparinisierte 20G-Kanülen in 10 ml Spritzen aufgenommen, die bereits mit 200 µl Heparinlösung und 100 µl Pefabloclösung

beschickt waren (vgl. SCHÄPERCLAUS 1954, GOERLICH 1983). Das Blut mehrerer Karpfen wurde vereinigt und bei 2500 Upm, 15 min und 4 °C zentrifugiert (Heraeus Sepatech).

10 ml Plasma wurden mit 20  $\mu$ l Na-Azid-Stammlösung und 100  $\mu$ l EDTA-Stammlösung versetzt. Die Isolierung der Plasmalipoproteine erfolgte nach den in Tabelle 5 angegebenen Dichtebereichen.



**Abb. 9: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes zur Karpfen-Lipoprotein-Präparation.**

Auf eine getrennte Isolierung der Chylomikronen wurde verzichtet, da Chylomikronen im Karpfenplasma z.T. nicht eindeutig nachzuweisen sind und wohl nur einen äußerst geringen Anteil am Plasma ausmachen (WODTKE, unveröffentlicht). Das weitere Vorgehen entspricht weitestgehend dem bereits in Kapitel 2.4.1 vorgestellten Verfahren. Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration der Karpfen-Plasmalipoproteine nach der Dialyse durch Filtration auf ungefähr 8-10 mg Protein / ml erhöht. Dazu wurden die dialysierten Plasmalipoproteine nach Vorschrift in mit Dialysepuffer gewaschenen Centricon-10 Röhrchen bei 5.000 Upm, 60-120 min bei 4 °C zentrifugiert (Kontron-Hermle). Eine Übersicht des methodischen Ablaufs ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt.

## 2.5 Bestimmung des Proteingehalts

Zur Standardisierung von biochemischen Analyseverfahren, wie z.B. Isolierung und Reinigung von Substanzen, elektrophoretischen Anwendungen und auch Rezeptorbindungsstudien, ist es oftmals notwendig eine Bezugsgröße für die Charakterisierung des biologischen Materials zu schaffen. Diesen Bezugspunkt stellt meistens, wie auch hier in diesem Zusammenhang, der Proteingehalt der zu untersuchenden Probe dar (CLARK 1984).

Insbesondere kamen im Verlauf der Untersuchungen

- die photometrische Bestimmung des Proteingehalts bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  (Kap. 2.5.1),
- die Proteinbestimmung nach LOWRY *et al.* (1951; Kap. 2.5.2),
- eine modifizierte LOWRY-Methode (Kap. 2.5.3) und
- ein fluorimetrischer Proteinassay (Kap. 2.5.5)

zur Anwendung. Die Werte wurden miteinander verglichen und gegebenenfalls korreliert, um eine einheitliche Bezugsgröße zu erhalten, die einen direkten Vergleich zwischen den Experimenten und mit bereits veröffentlichten Befunden erlaubt.

Die Proteinbestimmung nach LOWRY *et al.* (1951) kam standardmäßig am häufigsten zum Einsatz und bedarf wegen der Uneinigkeit in der Fachliteratur bei der Erstellung einer Eichkurve einer gesonderten Besprechung:

Eine repräsentative Studie des COMMITTEE ON APOLIPOPROTEINS OF THE INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY und der CENTERS FOR DISEASE CONTROL zeigte, daß 61% der befragten Laboratorien die Methode zur Proteinbestimmung nach LOWRY *et al.* (1951) routinemäßig einsetzen (HENDERSON *et al.* 1990). Oftmals werden Modifikationen dieser Methode angewendet, die den Einfluß störender Substanzen (z.B. EDTA, verschiedene Detergentien) auf die Messung eliminieren (BENSADOUN und WEINSTEIN 1976, PETERSON 1979, RODRÍGUEZ-VICO *et al.* 1989).

Trotz der weiten Verbreitung der Methode beklagen mehrere Autoren den Umstand, daß die Standardprotein-Eichreihe keinen linearen Zusammenhang liefert und eine Auswertung dadurch erschwert ist (LOWRY *et al.* 1951, MARKWELL *et al.* 1978, PETERSON 1979, FRYER *et al.* 1986). Andere Autoren haben wiederum verschiedene mathematische Modelle

entwickelt, die eine objektive Bewertung ermöglichen (STAUFFER 1975, CAMPBELL 1983, GRANT 1990, HARRINGTON 1990); der Mechanismus der Farbreaktion ist noch nicht im Detail geklärt (LEGLER *et al.* 1985).

Solange der Reaktionsmechanismus nicht geklärt und keine Einigkeit in Bezug auf die Bildung und Auswertung der Standard-Eichreihe erzielt wurde, sollten alle Methoden der Evaluierung erwogen werden (s.o.). Die Anwendbarkeit einer oder mehrerer Methoden ist daraufhin durch geeignete mathematische Kriterien zu ermitteln, die für die Auswertung der modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY in Kapitel 2.5.4 näher dargestellt sind. Um die Berechnung der Proteinkonzentrationen zu erleichtern und zu beschleunigen, wurde dazu ein umfangreiches Computerprogramm (LOWRY for Excel 97) erstellt, das sich zum leichteren Verständnis kommentiert im Anhang befindet (Kap. 7.1).

### **2.5.1 Photometrische Proteinbestimmung bei $\lambda = 280$ nm**

Human-Plasmaproteine geringer Dichte wurden nach abgeschlossener Dialyse geeignet mit Dialysepuffer verdünnt und die Extinktion in einer Quarzküvette ( $d = 1$  cm) bei  $\lambda = 280$  nm gegen Dialysepuffer gemessen. Der Extinktionskoeffizient wurde mit  $1 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  festgesetzt (M. CASLAKE, Dept. Of Pathological Biochemistry, Royal Infirmary, University of Glasgow, Fax vom 22.04.1997). Somit entsprach der LDL-Proteingehalt in mg / ml dem Zahlenwert des Produkts aus der Extinktion und dem Verdünnungsfaktor.

### **2.5.2 Proteinbestimmung nach LOWRY *et al.* (1951)**

Die Proteinbestimmung nach LOWRY *et al.* (1951) richtete sich nach den Angaben der Originalarbeit. Als Eichreihe wurde eine wässrige Lösung mit bovinem Serumalbumin (BSA) mit Konzentrationen zwischen 0 und 1 mg BSA / ml A. bidest. angesetzt; die Methode soll nur kurz dargestellt werden:

Zu 0,2 ml einer geeignet mit Dialysepuffer vorverdünnten Probe wurden 1 ml einer Lösung aus 50 Teilen LOWRY-Lösung A und einem Teil LOWRY-Lösung B zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml wässrigem Folin-Ciocalteus-Reagenz und schnellem, kräftigen Mischen wurde nach 30 min die Extinktion bei  $\lambda = 546$  nm gegen Dialysepuffer gemessen. Die Auswertung erfolgte graphisch.

### **2.5.3 Proteinbestimmung mit einer modifizierten LOWRY-Methode**

Eine Eichreihe aus BSA mit Konzentrationen zwischen 0 und 2 mg BSA / ml wurde in 10% SDS angesetzt und bei -20°C eingefroren. Sie wurde bei Bedarf aufgetaut und 1 : 1 mit 1 N NaOH versetzt, so daß Konzentrationen von 0 bis 1 mg / ml vorlagen. Die biologischen Proben wurden mit 10% SDS geeignet vorverdünnt und ebenfalls 1 : 1 mit 1 N NaOH versetzt. Während einer folgenden halbstündigen Inkubation traten manchmal Trübungen auf, die durch Erwärmen auf ungefähr 30 °C wieder entfernt wurden. 20 µl Aliquots der Eichreihe und der zu untersuchenden Proben wurden in einer 96 well Microtiterplatte zu 100 µl alkalischer Kupferlösung gegeben und die gesamte Platte auf einem Titertek-Schüttelgerät gut durchmischt. Nach 15 min wurden weitere 100 µl 10% SDS dazupipettiert und erneut geschüttelt. Nun wurden unter Schütteln 10 µl des Folin-Ciocalteus-Reagenz eingespritzt und die Extinktion nach 30 min im Titertek Titerplattenphotometer bei 690 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben.

### **2.5.4 Auswertung der modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY mit dem VBA-Programm LOWRY for Excel 97**

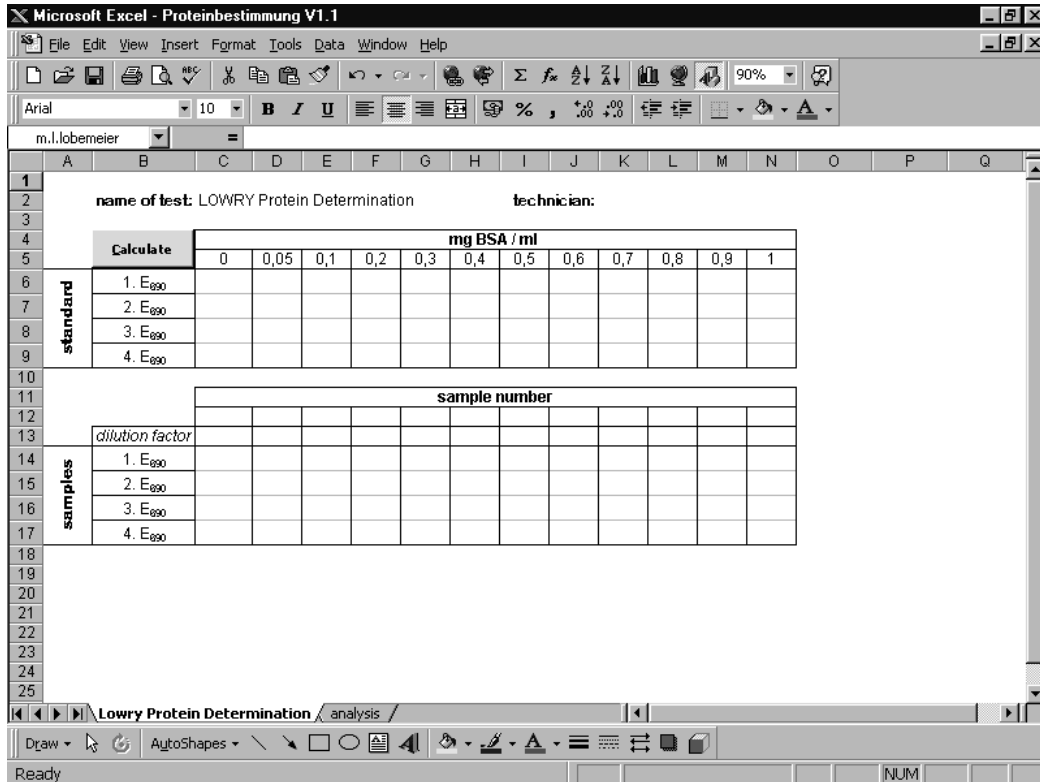
Bisher sind grundsätzlich vier verschiedene mathematische Modelle vorgestellt worden, die durch Regressionanalyse eine objektive Evaluation der Standard-Eichreihe und somit die exakte Berechnung der zu bestimmenden Proteinkonzentrationen ermöglichen; dieses sind:

- die Anpassung eines Polynom 4. Grades (verändert nach HARRINGTON 1990);
- die Anpassung einer rechtwinkligen Hyperbel (nach GRANT 1990);
- die Transformation zur Linearisierung der Daten in einen log-log-Plot (STAUFFER 1975);
- die Transformation zur Linearisierung der Daten in einen doppelt-reziproken Plot (CAMPBELL 1983).

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Anpassungskurven zeigte sich jedoch, daß nicht jedes dieser Modelle den Kurvenverlauf der Datenpunkte gleich gut beschreibt.

Deshalb wurde für MICROSOFT EXCEL 97 ein Programm in der Programmiersprache VISUAL BASIC FOR APPLICATIONS (VBA; vgl. PRUDENZI 1997) entworfen, das eine simultane Auswertung der Standardeichreihe, sowie die Einordnung der Extinktionen der zu

bestimmenden Proben in das jeweilige Regressionsmodell ermöglicht. Damit konnte nicht nur die Anpassungsgüte eines Modells, sondern auch die Abweichung der ermittelten Proteinkonzentrationen zwischen den Modellen überprüft werden.



**Abb. 10:**        **Bildschirmdarstellung der Eingabeseite von *Lowry for Excel 97*.**  
*Erläuterung siehe Text.*

Das Programm ist grundsätzlich in ein Ein- und ein Ausgabefenster unterteilt (Abb. 10 und Abb. 11), die miteinander über ein VBA-Element verbunden sind. Im Eingabefenster werden im oberen Bereich die Extinktionen der Eichreihe, im unteren Bereich der Name, der Verdünnungsfaktor und die Extinktionen der zu bestimmenden Proben eingegeben; es können maximal Vierfachbestimmungen ausgewertet werden. Durch Anklicken des *Calculate*-Knopfes wird die automatische Auswertung der Eichreihe und die Berechnung der unbekannt Proteinkonzentrationen gestartet und im Ausgabefenster dargestellt.

Das Programm ist 204 kB groß und benötigt bei maximaler Dateneingabe für die Berechnung der Eichkurven und Proteinkonzentrationen weniger als zehn Sekunden. Damit kann die Proteinbestimmung in deutlich weniger als zehn Minuten ausgewertet werden und liefert außer der Güte des Experiments an sich, noch Informationen zur Güte der Anpassung des gewählten Modells im Vergleich zu drei anderen Auswertungsmethoden.

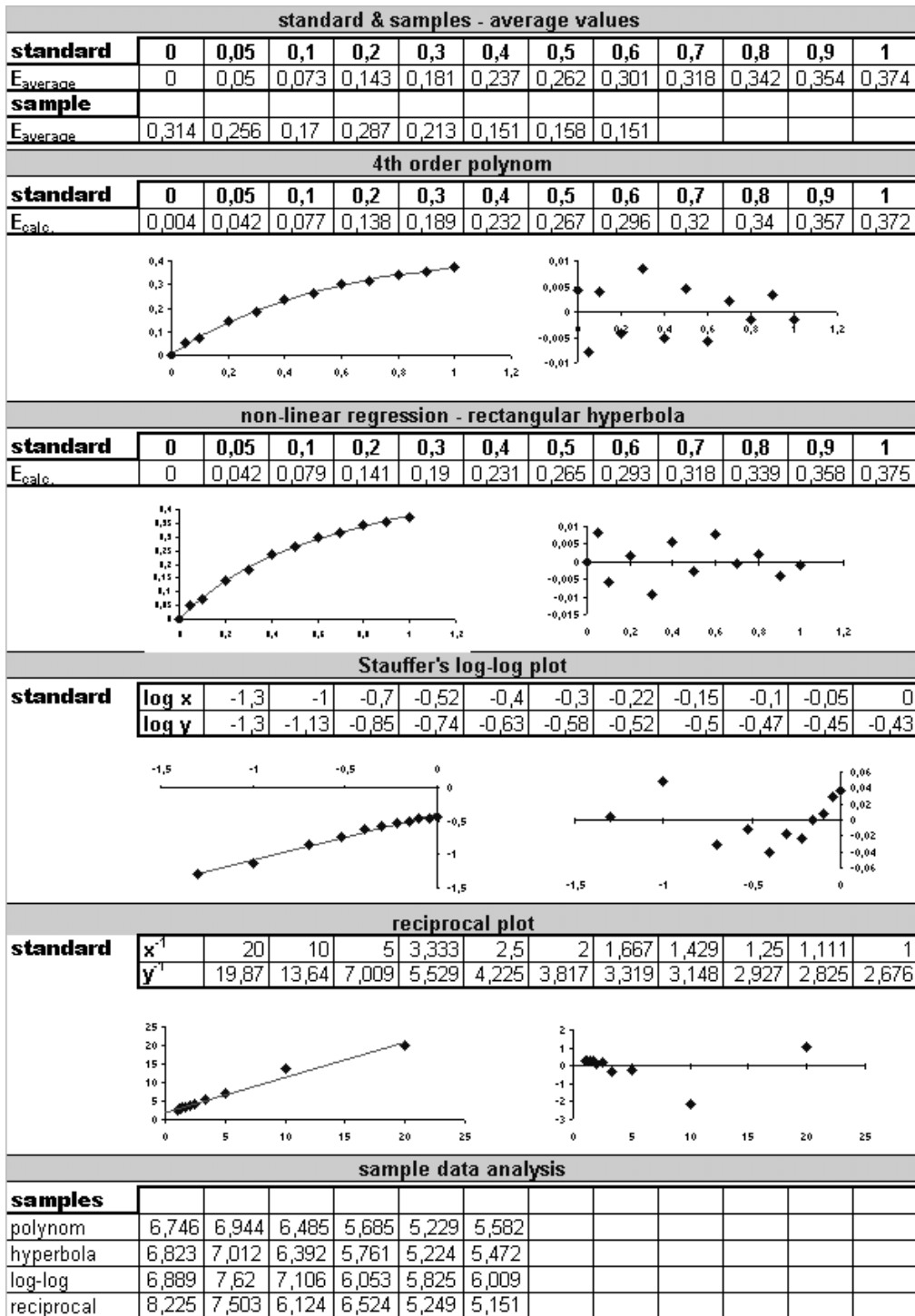


Abb. 11: Verkleinerter Ausdruck der Ausgabeseite von Lowry for Excel 97.

Erklärung siehe Text.

Die mathematischen Grundlagen der Regressionanalyse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt (siehe auch PETERSON 1979):



**Tab. 6: Mathematische Grundlagen zur Auswertung der modifizierten LOWRY-Proteinbestimmung für die Analysekonzepte aus der Literatur.**

**Log-Log-Plot nach STAUFFER (1975)**

Ordinate	log Extinktion
Abszisse	log Proteinkonzentration
Berechnung der Eichgerade <sup>1</sup>	$\log[\text{Extinktion}] = a \cdot \log[\text{Proteinkonzentration}] + b$
Berechnung der unbekanntenen Proteinkonzentration	$[\text{Proteinkonzentration}] = 10^{\frac{\log[\text{Extinktion}] - b}{a}}$

**Doppelt-reziproker Plot nach CAMPBELL (1983)**

Ordinate	1/[Extinktion]
Abszisse	1/[Proteinkonzentration]
Berechnung der Eichgerade <sup>2</sup>	$\frac{1}{[\text{Extinktion}]} = a \cdot \frac{1}{[\text{Proteinkonzentration}]} + b$
Berechnung der unbekanntenen Proteinkonzentration	$[\text{Proteinkonzentration}] = a \cdot \left( [\text{Extinktion}] - \frac{1}{b} \right)$

**Polynom 4. Grades (in Anlehnung an HARRINGTON 1990)**

Ordinate	[Extinktion]
Abszisse	[Proteinkonzentration]
Berechnung der Eichkurve <sup>3</sup>	$y = a \cdot x^4 + b \cdot x^3 + c \cdot x^2 + d \cdot x + e$ $y = [\text{Extinktion}]$ $x = [\text{Proteinkonzentration}]$
Berechnung der unbekanntenen Proteinkonzentration	Die Berechnung von $x$ erfolgte über das iterative Tangentenverfahren mit der NEWTONSchen Formel (aus KEMNITZ und ENGELHARD 1980); ist $x_1$ eine Näherungslösung mit $f'(x_1) \neq 0$ , so erhält man die bessere Näherungslösung $x_t$ durch: $x_t = x_1 - \frac{f(x_1)}{f'(x_1)}$ Nach 10 durchgeführten Iterationen war der absolute Betrag der Differenz von $x_t - x_1$ bei allen durchgeführten Experimenten $< 10^{-15}$ .

**Anpassung einer rechtwinkligen Hyperbel nach GRANT (1990)**

Ordinate	[Extinktion]
Abszisse	[Proteinkonzentration]
Berechnung der Eichkurve <sup>4</sup>	$y = \frac{a \cdot x}{b + x}$ $y = [\text{Extinktion}]$ $x = [\text{Proteinkonzentration}]$
Berechnung der unbekanntenen Proteinkonzentration	(1) $y = \frac{a \cdot x}{b + x}$ $ \cdot(b + x)$ (2) $a \cdot x = y \cdot b + y \cdot x$ $ \cdot(-y \cdot x)$ (3) $a \cdot x - y \cdot x = y \cdot b$ (4) $x \cdot (a - y) = y \cdot b$ $ \cdot 1/(a - y)$ (5) $x = \frac{b \cdot y}{a - y}$

<sup>1,2</sup> Berechnung durch Lineare Regression    <sup>3</sup> Berechnung nach ROMER 1984    <sup>4</sup> Berechnung nach DUGGLEBY 1981

Ein kommentiertes Listing des Programms befindet sich im Anhang (Kap. 7.1).

### **2.5.5 Proteinbestimmung mit Fluorescamin**

Aus einer BSA-Stammlösung von 2 mg BSA / ml A. bidest. wurde am Versuchstag eine Eichreihe mit den Konzentrationen 5, 10, 20, 30, 40 und 50 µg BSA / ml erstellt. 50 µl der Eichreihenkonzentrationen und der geeignet vorverdünnten Lipoproteinpräparationen wurden auf eine 96-well-Fluorimeterplatte pipettiert. Dazu wurden anschließend 75 µl Boratpuffer und 25 µl Fluorescaminreagenz gegeben. Die Messung und Auswertung erfolgte Software-gesteuert (Tecan). Die Beziehung zwischen Proteinkonzentration und gemessener Fluoreszenz steht in einem linearen Zusammenhang und kann über lineare Regression ausgewertet werden (vgl. CLARK 1984).

### **2.6 DEAE-Chromatographie von solubilisierten cLM und bNNR-Membranen**

SCHNEIDER *et al.* (1980) gelang es, den bindungskompetenten LDL-Rezeptor aus Nebennierenrinden-Membranen des Rindes durch Detergenzbehandlung und DEAE-Chromatographie zu isolieren, anzureichern und zumindest teilweise aufzureinigen. Aufgrund dieser experimentellen Befunde, sollte die von SCHNEIDER *et al.* (1980) verwendete Methodik etabliert und auf das Versuchstier Karpfen übertragen werden.

Die eingefrorenen, isolierten Membranen wurden langsam aufgetaut und in einem Volumen von einem Drittel des Zahlenwerts des Membranproteingehalts in SOUTAR-Puffer mit 1 % Triton X-100 resuspendiert. Nach 10 min gutem Schütteln bei 4 °C im Rotationsmischer wurde die Suspension 40 min bei 40.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephacel verwendet.

DEAE wurde entsprechend den Herstellerangaben und der Vorschrift von HOLTZHAUER (1988; p. 87) mit Soutarpuffer äquilibriert und unmittelbar vor Gebrauch mit Soutar-Puffer + 1 % Triton X-100 dreimal gewaschen. Der Überstand wurde im *Batch*-Verfahren mit 1 g DEAE / 10 ml Überstand im Rotationsmischer mindestens 30 min durchmischt, die Suspension in Chromatographiesäulen (Alltech) überführt und 1 min bei 680 Upm und 4 °C zentrifugiert (Heraeus Omnifuge). Die adsorbierten Proteine wurden mit 0,8 ml 500 mM NaCl / g DEAE eluiert und die Chromatographiesäule erneut bei 680 Upm und 4 °C für 10

min zentrifugiert. Das Eluat wurde nach der Bestimmung des Proteingehalts zur SDS-PAGE eingesetzt.

## 2.7 SDS-PAGE und Blotting von solubilisierten cLM- und bNNR-Präparationen

### 2.7.1 Vorbereitungen zur SDS-PAGE

Zur Elektrophorese wurde ein Trenngel mit aufgesetztem Sammelgel verwendet (LAEMMLI 1970). Dazu wurden zwei gesäuberte und entfettete Glasplatten (178 x 140 mm) mit 1 mm Spacern versehen, an den Seiten und unten abgeklebt und mit Klammern seitlich zusammengehalten. Die so vorbereiteten Kammern wurden zur Abdichtung an der unteren Seite in 1 % Agarose in A. bidest. (durch Erwärmen auf 50 °C) eingegossen.

Die zur Gelpolymerisation benötigten Lösungen (Tab. 7) wurden in eine 100 ml Saugflasche pipettiert und anschließend für mindestens 15 min an einer Wasserstrahlpumpe entgast. Nach Zugabe von SDS und APS wurden die Lösungen gut durchmischt und umgehend in die dafür vorbereiteten Gelkammern gegossen; es wurden verschiedene Taschenformer verwendet.

**Tab. 7: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgele mit homogener Acrylamidkonzentration.**

Lösungen	Sammelgel (T = 4 %) (0,125 M Tris, pH 6,8)	Trenngel (T = 7 %) (0,375 Tris, pH 9,2)
Acrylamid-Stammlsg. (T = 40 %, C = 2,6 %)	1,750 ml	1,000 ml
Trenngelpuffer	1,250 ml	-----
Sammelgelpuffer	-----	1,250 ml
60 % (w/v) Saccharose	-----	3,300 ml
A. bidest.	6,800 ml	4,250 ml
TEMED	0,008 ml	0,010 ml
15 min bei ca. 25 °C entgasen		
10 % (w/v) SDS	0,100 ml	0,100 ml
10 % (w/v) APS	0,100 ml	0,100 ml
Gel gießen		
Gesamtvolumen	10,008 ml	10,010 ml

T: Totale Acrylamid(AA)-Konzentration (w/v); C: Anteil des Bis-AA (Cross-Linker) von (AA + Bis-AA) in Prozent

### 2.7.2 Probenvorbereitung und Probenauftrag

Native Membranen oder durch Solubilisierung mit Triton X-100 und DEAE-Chromatographie isolierte Proteine wurden 1 : 1 mit Solubilisationspuffer verdünnt und 15 min. bei 4 °C im Rotationsmischer gemischt. Daraufhin wurden die solubilisierten Proben mit 0,3 % (v/v) mit Bromphenolblau gefärbter Saccharoselösung (0,05% in A. bidest.) versetzt. Die Proben wurden so verdünnt, daß bei einer Laufstrecke von 10 - 15 cm ungefähr 20 - 30 µg Protein pro mm<sup>2</sup> Geltaschengrundfläche vorlagen. Zur Molekulargewichtskalibrierung wurden auf jedem Gel Eichproteine als Molekulargewichtsmarker aufgetragen, die eine Größenordnung der Proteinbanden ermöglichten (Tab. 8).

**Tab. 8: Das Molekulargewicht der verwendeten Eichproteine.**

Name der verwendeten Proteine	Molekulargewicht (kD)
α-Macroglobulin	170
β-Galactosidase	116
Phosphorylase b	97,4
BSA	68
Catalase	58,1
Aldolase	40
Alkohol-Dehydrogenase	39,8
Carboanhydrase	29
Trypsininhibitor	20,1
Lysozym	14,3
Aprotinin	6,5

Nachdem die Elektrophoresapparatur mit den Gelen bestückt und mit Elektrodenpuffer aufgefüllt worden war, wurden die Proben vorsichtig aufgetragen. Die Elektrophorese wurde leistungskonstant bei 10 Watt (~ 150 V, 90 mA) und 4 °C durchgeführt.

### 2.7.3 Blotting-Prozedur

Nach Beendigung der Elektrophorese, Öffnen der Gelkassette und Entfernen der vorderen Glasplatte, wurde das Sammelgel. Vier auf die Größe des Trenngels zurecht geschnittene Blottingpapiere wurden mit dem Gel ca. 15 min in Transferpuffer gelegt. Darauf wurde das Trenngel auf zwei Lagen Blottingpapier gelegt, mit 10 ml Transferpuffer befeuchtet und die zurechtgeschnittene, befeuchtete Nitrocellulosefolie luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Den

Abschluß bildeten wiederum zwei Lagen Blottingpapier. Dieses *Sandwich* wurde zwischen zwei Netzwerkplatten geklemmt in die Blottingapparatur eingeführt. Der Elektrotransfer erfolgte bei 4 °C über Nacht mit einer Versorgungsspannung von 60 Volt im 5-Stufen-Feldgradienten und einer Gesamtleistung von 30 Watt.

Nach Beendigung des Elektrotransfers wurde das Gel in TCA fixiert und mit Coomassie angefärbt, um eventuell nicht transferierte Proteinbanden zu detektieren. Die Nitrocellulosefolie wurde in ca. 6 mm breite Streifen geschnitten, bei -20 °C eingefroren und zum Immuno- bzw. Ligandenblot eingesetzt (*siehe* Kap. 2.10 und Kap. 2.11).

#### **2.7.4 Anfärbung der Blotstreifen**

Einige Blotstreifen wurden zur Molekulargewichtskalibrierung (und zur Überprüfung der Transfereffektivität) mit Indian Ink angefärbt. Dazu wurden die Streifen dreimal 20 min in je 100 ml PBS-Tween 20 unter Schaukeln inkubiert, kurz mit A. bidest. gespült und anschließend 2 h mit Tusche-haltiger PBS-Tween 20 (Pelikan Indian Ink) inkubiert. Die Blotstreifen wurden darauf kurz mit A. bidest gespült und zwischen Blotpapier getrocknet.

Alternativ wurden die Blotstreifen bis zu 5 min. mit Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert und anschließend in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mit Amidoschwarz-Entfärbelösung differenziert. Die Blotstreifen wurden zwischen Blotpapier getrocknet.

#### **2.7.5 Molekulargewichtskalibrierung von SDS-PAGE Gelen**

Die Kalibrierung des Molekulargewichts erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von WEBER und OSBORN (1969). WEBER und OSBORN zeigten, daß ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der relativen Laufstrecke von Proteinen in der SDS-PAGE besteht. Dieses Modell findet sich in vielen modernen Lehrbüchern wieder (z.B. STRYER 1988, WESTERMEIER 1990). Der beobachtete Zusammenhang ist richtig, die Darstellung hingegen ist falsch (vgl. SCOPES 1987, LOBEMEIER 2000). Die Laufstrecke als abhängige Variable muß zur Regressionanalyse mit  $y = f(x)$  auf der Ordinate aufgetragen werden und nicht wie bei WEBER und OSBORN (1969) und anderen Autoren (s.o.) auf der Abszisse. Diese Art der Auftragung kann unter

Umständen zu Ergebnissen führen, die bis zu 10 % vom 'wahren' Wert abweichen (vgl. LEATHERBARROW 1990).

Alle Gele wurden also unter der Bedingung

$$[rf - \text{Wert}] = a \cdot \log[\text{Molekulargewicht}] + b \quad ; \quad a, b: \text{Konstanten}$$

ausgewertet.

## 2.8 SDS-PAGE von solubilisierten cLDL und hLDL

Für die elektrophoretische Auftrennung der Plasmalipoprotein-Proteine wurden Minigele (Glasplatten: 101 mm x 82 mm) verwendet. Abweichend von den Angaben aus Tabelle 7 wurde ein Trenngel mit einem kontinuierlichem Gradienten von 8 - 20 % angefertigt. Der methodische Ablauf entspricht weitgehend den Angaben aus Kapitel 2.7. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie angefärbt.

## 2.9 Radioaktive Markierung von Plasmalipoproteinen mit <sup>125</sup>Jod

Die wohl am häufigsten angeführte Referenz zur radioaktiven Markierung von Plasmalipoproteinen bezieht sich auf die Veröffentlichung von BILHEIMER *et al.* (1972), die allerdings keine genaue Anleitung zur Methode beinhaltet. Neben der Erwägung anderer Methoden (HUNTER und GREENWOOD 1962, MARCHALONIS 1969, BOLTON und HUNTER 1973, URIZZI *et al.* 1997), wurde deshalb auf die detaillierte Untersuchung von SHEPHARD *et al.* (1976) zurückgegriffen, die wie die Arbeit von BILHEIMER *et al.* (1972) auch auf der von MCFARLANE (1958) etablierten Methode zur radioaktiven Markierung von Proteinen basiert.

Erste Vorversuche mit einem Versuchsaufbau nach CONTRERAS *et al.* (1983) konnten die Ergebnisse jedoch nicht bestätigen. Zur erfolgreichen Durchführung der Methode müssen folgende Faktoren berücksichtigt werden:

- Der Wert des Molekulargewichts von Apolipoprotein B wird von SHEPHARD *et al.* (1976) in einer Fußnote (S. 101) mit 64 kD angegeben. Nach heutigem Wissensstand beträgt das Molekulargewicht von Apo B ~ 500 kD (SCHNEIDER

1989). Es muß jedoch mit dem veralteten Wert gerechnet werden, da das molare Verhältnis von Apo B zu  $^{125}\text{I}$  die Jodierungsausbeute bestimmt - eine Umrechnung der Verhältnisse findet sich in Tabelle 9.

- Die Proteinbestimmung wurde von SHEPHARD *et al.* nicht mit der LOWRY-Methode, sondern durch Bestimmung der Extinktion bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  durchgeführt (M. CASLAKE: pers. Mitteilung). Daraus ergibt sich ein Unterschied im berechneten Proteingehalt von 1,4 : 1 ( $\lambda = 280\text{nm} : \text{LOWRY}$ ; vgl. Kap. 3.1.2).
- Der zunächst adaptierte Versuchsaufbau von CONTRERAS *et al.* (1983) mußte aufgrund sehr niedriger Markierungseffizienz verworfen werden. Statt dessen wurde die *hanging drop* Methode (HULME 1992) verwendet.

**Tab. 9: Modifizierte Tabelle aus SHEPHARD *et al.* (1976) 'Table VI: Iodine Monochloride Labelling of Human LDL'.**

Isotop	I / Protein Verhältnis	korr. I / Protein Verhältnis <sup>†</sup>	Ausbeute
$^{125}\text{I}$	1:1	7,8:1	9%
$^{125}\text{I}$	5:1	39,1:1	37%
$^{125}\text{I}$	10:1	78,1:1	50%
$^{125}\text{I}$	20:1	156,3:1	60%
$^{131}\text{I}$	2,5:1	19,5:1	40%

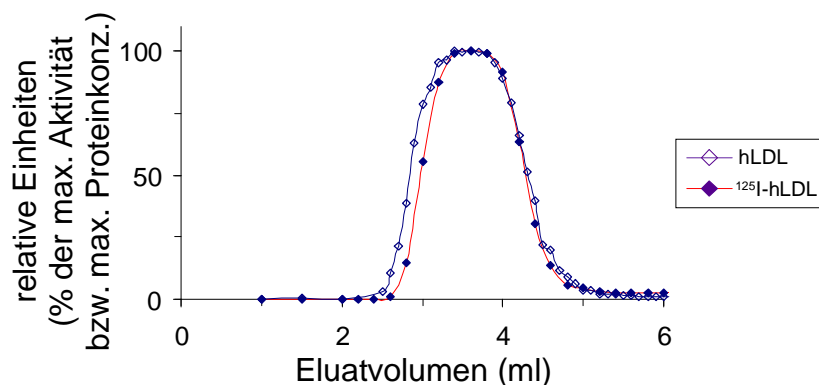
<sup>†</sup> Das korrigierte (I / Protein)-Verhältnis berechnet sich aus dem Quotienten von  $Q = 500 \text{ kD} / 64 \text{ kD} \approx 7,8$ . Weitere Erklärungen *siehe Text*.

Zur Jodierung geht man nach den Angaben für  $^{125}\text{I}$  aus Tabelle 9 vor: In ein 15 ml Schnappdeckelglas wurden 270  $\mu\text{l}$  1 M Glycin-Puffer und 700  $\mu\text{l}$  LDL in Dialysepuffer mit 1,74 mg Protein / ml gegeben. Dazu wurde unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen 1 mCi trägerfreies  $\text{Na}^{125}\text{I}$  gegeben und die Pipettenspitze gut gespült. Die Reaktion wurde mit 4,9  $\mu\text{l}$  ICl-Lösung gestartet (entspricht unter der Verwendung gerundeter Werte einem I / Protein-Verhältnis von 40:1). Die Zusammensetzung des Bindungsassays ergibt sich demnach wie folgt (Tab. 10):

**Tab. 10: Zusammensetzung des Ansatzes zur radioaktiven Markierung der Plasmalipoproteine mit  $^{125}\text{I}$  Jod.**

	Konzentration	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
<b>Glycinpuffer</b>		270
<b>LDL</b>	1,74 mg / ml	700
<b>Na<math>^{125}\text{I}</math></b>	0,1 Ci / ml	10
<b>ICI-Lösung</b>		4,9

Nach einer Inkubationszeit von ungefähr einer Minute wurden 900  $\mu\text{l}$  des Ansatzes entnommen und zur Trennung der markierten Lipoproteine von nicht-gebundenem  $^{125}\text{I}$  Jod durch Gelpermeationschromatographie auf eine mit Dialysepuffer äquilibrierte PD10-Säule aufgetragen, die speziell zur Entsalzung von Protein-Lösungen eingesetzt wird. Um das Volumen zu bestimmen, in dem die LDLs eluiert werden, wurde zuvor ein Elutionsprofil mit nativen und  $^{125}\text{I}$ -markierten LDL erstellt (Abb. 12).



**Abb. 12: Elutionsprofil nativer und  $^{125}\text{I}$ -markierter hLDL auf der PD10-Säule.**

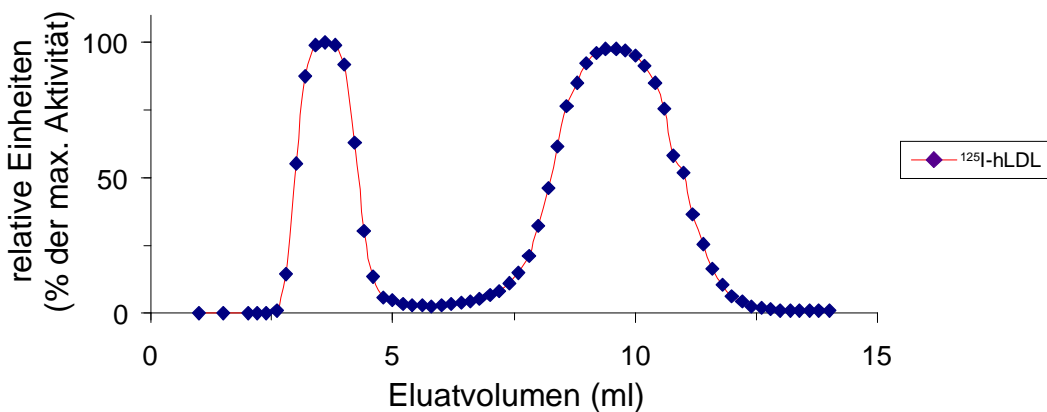
Offene Symbole: Native hLDL wurden im Volumenverhältnis des Jodierungsansatzes verdünnt; Na $^{125}\text{I}$  wurde durch Dialysepuffer ersetzt. 900  $\mu\text{l}$  wurden auf eine mit Dialysepuffer äquilibrierte PD-10 Säule aufgetragen und mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  Dialysepuffer eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden geeignet vorverdünnt und die Extinktion des mit der modifizierten LOWRY-Methode angefärbten hLDL-Proteins gemessen. 100 Prozent entsprechen einer Extinktion von  $E_{690} = 0,87$ . Geschlossene Symbole: 1,22 mg hLDL wurden nach Anleitung jodiert. 900  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes wurden auf eine mit Dialysepuffer äquilibrierte PD-10 Säule aufgetragen und mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  Dialysepuffer eluiert. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde im  $\gamma$ -Zähler bestimmt.  $17,7 \cdot 10^6$  cpm entsprechen 100 %. Die spezifische Aktivität lag bei 238,5 cpm / ng LDL-Protein.

Abbildung 12 zeigt, daß sowohl native als auch  $^{125}\text{I}$ -markierte LDL übereinstimmend in einem Volumen von 2,6 - 4,8 ml eluiert wurden. Dieser Befund konnte mit mehreren PD-10



Säulen und weiteren  $^{125}\text{I}$ -Präparationen bestätigt werden, so daß eine ständige Kontrolle unterblieb und die  $^{125}\text{I}$ -markierten LDL standardmäßig unfraktioniert aufgefangen wurden.

Die Abtrennung des nicht-gebundenen  $^{125}\text{I}$  von den  $^{125}\text{I}$ -LDL ist durch das Elutionsprofil in Abbildung 13 dokumentiert. In einer sich daran anschließenden wiederholten PD10-Entsalzung der  $^{125}\text{I}$ -markierten LDL, konnte keine Kontamination mit nicht-gebundenem  $^{125}\text{I}$  gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Durch graphische Analyse der Peakflächen wurde errechnet, daß sich mehr als 95 % des aufgetragenen LDL-Proteins im Eluat von 2,6 - 4,8 ml befindet.



**Abb. 13:** Vollständiges Elutionsprofil  $^{125}\text{I}$ -markierter hLDL auf der PD-10 Säule nach Auftrag von 900  $\mu\text{l}$  Jodierungsansatz.

hLDL wurden nach Vorschrift mit 1 mCi  $^{125}\text{I}$  Jod und Chlorjodlösung inkubiert. 900  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes wurden auf eine mit Dialysepuffer äquilibrierte PD-10 Säule aufgetragen. Nach vollständigem Einlaufen in die Säule wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  Dialysepuffer aufgetragen, das Eluat einzeln aufgefangen und die Radioaktivität gemessen.  $17,7 \cdot 10^6$  cpm entsprechen 100 %. Die spezifische Aktivität lag bei 238,5 cpm / ng LDL-Protein. 2,6-4,8 ml:  $^{125}\text{I}$ -hLDL; 7,5-12,5 ml: freies  $^{125}\text{I}$ .

Anschließende Filtration durch einen Sterilfilter (FP30/0.45 CA-S, Schleicher & Schüll) und Zugabe von 44 mg BSA (i.e. 20 mg Protein / ml) ergaben eine gebrauchsfertige, radioaktiv markierte Lipoproteinlösung mit einem Proteingehalt von  $\sim 0,5$  mg / ml, die bei  $4^\circ\text{C}$  dunkel aufbewahrt und innerhalb von 10 Tagen verwendet wurde.

## 2.10 Detektion des Apo-B/E-Rezeptors mit dem monoklonalen Antikörper $\alpha$ -bLDLR C7 nach SDS-PAGE und Blotting

Die Methode, ein aus SDS-PAGE-Gelen auf Nitrocellulose transferiertes Protein mit einem spezifischen Antikörper gegen das gesuchte Protein zu detektieren wird auch *Immunoblotting* genannt. Dazu wurde den Angaben von BEISIEGEL *et al.* (1982) entsprechend vorgegangen, die in Tabelle 11 zusammengefaßt sind:

**Tab. 11: Anleitung zum Immunoblot.**

<b>Zeit (min)</b>	<b>Arbeitsschritt</b>
<b>30</b>	<b>Blockieren unspezifischer Bindungsstellen</b> <i>Blotstreifen bei 37 °C mit Puffer D-37°C schaukelnd inkubieren</i>
<b>120</b>	<b>Inkubation des primären Antikörpers</b> <i>0,8 µg IgG C7 / ml Puffer D-20°C bei RT inkubieren</i>
<b>50</b>	<b>Waschen</b> <i>Puffer E-20 °C unter mehrfachem Wechsel schaukelnd bei RT</i>
<b>45</b>	<b>Inkubation des sekundären Antikörpers</b> <i>biotinierter <math>\alpha</math>-Maus-IgG-AK (1:2.000) schaukelnd bei RT</i>
<b>50</b>	<b>Waschen</b> <i>Puffer D/E (+ 5 mg BSA / ml) unter mehrfachem Wechsel schaukelnd bei RT</i>
<b>60</b>	<b>Inkubation des Streptavidin-<math>\beta</math>-Gal-Komplexes</b> <i>Puffer D/E (30 mg BSA / ml) SA-<math>\beta</math>-Gal-Stammlsg. (1:1.500) schaukelnd bei RT</i>
<b>50</b>	<b>Waschen</b> <i>Puffer D/E (5 mg BSA / ml) unter mehrfachem Wechsel schaukelnd bei RT</i>
<b>60</b>	<b>Inkubation des Substratmix</b> <i>Substratmix schaukelnd bei RT; nach Beendigung der Farbentwicklung mit A. bidest. spülen und trocknen</i>

Als Negativkontrolle wurden ein oder mehrere Streifen ohne den primären Antikörper inkubiert. Durch Vergleich der Streifenmuster der Positiv- und der Negativkontrolle konnten Banden identifiziert werden, die vom C7-Antikörper spezifisch erkannt wurden. Das apparente Molekulargewicht der angefärbten Proteine wurde nach der in Kapitel 2.7.5 beschriebenen Methode bestimmt.

## 2.11 Detektion der Apo-B/E-Rezeptoraktivität mit nativen und <sup>125</sup>I-markierten LDL nach SDS-PAGE und Blotting

Der funktionelle Nachweis des LDL-Rezeptors nach Blotting ist durch Bindung mit nativen oder radioaktiv-markierten LDL möglich (DANIEL *et al.* 1983, vgl. SOUTAR *et al.* 1986, STEYRER *et al.* 1990). Eine Kurzanleitung für die Inkubation mit nativen LDL befindet sich in Tabelle 12:

Tab. 12: Anleitung zum Ligandenblot mit nativen LDL.

Zeit (min)	Arbeitsschritt
30	<b>Blockieren unspezifischer Bindungsstellen</b> <i>Blotstreifen bei 37 °C mit Puffer D-37°C schaukelnd inkubieren</i>
60	<b>LDL-Inkubation</b> <i>40 µg LDL / ml Puffer A (50 mg BSA / ml), schaukelnd bei RT</i>
50	<b>Waschen</b> <i>Puffer A (5 mg BSA / ml) unter mehrfachem Wechsel, schaukelnd bei RT</i>
45	<b>α-Apo B Inkubation</b> <i>α-Apo B (1:5.000) in Puffer B (50 mg BSA / ml)</i>
50	<b>Waschen</b> <i>Puffer B (5 mg BSA / ml) unter mehrfachem Wechsel schaukelnd bei RT</i>
60	<b>Inkubation des Biotin-α-Maus-IgG-Komplexes</b> <i>biotin-α-Maus-IgG (1:2.000) in Puffer B (50 mg BSA / ml) schaukelnd bei RT</i>
50	<b>Waschen</b> <i>Puffer B (5 mg BSA / ml) unter mehrfachem Wechsel schaukelnd bei RT</i>
60	<b>SA-β-Gal Inkubation</b> <i>SA-β-Gal (1:1.500) in Puffer B (30 mg BSA / ml) schaukelnd bei RT</i>
45	<b>Waschen</b> <i>Puffer D,E (5 mg BSA / ml) unter mehrfachem Wechsel, schaukelnd bei RT</i>
60	<b>Inkubation mit Substratmix</b> <i>Substratmix lichtgeschützt bei RT; nach Beendigung der Farbentwicklung mit A. bidest. spülen und trocknen</i>

Als Negativkontrolle wurden ein oder mehrere Streifen ohne LDL inkubiert. Durch Vergleich der Streifenmuster der Positiv- und der Negativkontrolle konnten Banden identifiziert werden, die LDL-Bindungsaktivität aufwiesen.

Die Inkubation der Blotstreifen mit  $^{125}\text{I}$ -LDL verkürzt die Arbeitszeit erheblich. Obwohl man aufgrund der Expositionszeiten der Autoradiographie länger auf ein Ergebnis warten muß, birgt diese Methode den Vorteil, daß nur Banden LDL-spezifischer Bindung detektiert werden. Eine Zusammenfassung der Arbeitsschritte befindet sich in Tabelle 13:

**Tab. 13: Anleitung zum Ligandenblot mit  $^{125}\text{I}$ -LDL.**

<b>Zeit</b>	<b>Arbeitsschritt</b>
<b>30 min</b>	<b>Blockieren unspezifischer Bindungsstellen</b> <i>Blotstreifen bei 37 °C mit Puffer D-37°C schaukelnd inkubieren</i>
<b>60 min</b>	<b><math>^{125}\text{I}</math>-LDL-Inkubation</b> <i>40 µg LDL (~300 cpm / ng) / ml Puffer A (50 mg BSA / ml), schaukelnd bei RT</i>
<b>50 min</b>	<b>Waschen</b> <i>Puffer A (5 mg BSA / ml) unter mehrfachem Wechsel, schaukelnd bei RT</i>
<b>24 h</b>	<b>Exposition der Blotstreifen</b> <i>Fuji RX mit Dr. Goos Verstärkerfolie (feinzeichnend) im Dunkeln bei -80 °C</i>
<b>5 min</b>	<b>Entwicklung und Fixierung des Films</b> <i>1' Entwickler, 2' Spülen, 5' Fixierer, Spülen und Trocknen</i>

Die Verwendung einer Verstärkerfolie bei der Exposition radioaktiver Proben beschleunigt nicht nur den Belichtungsvorgang, sondern ermöglicht auch die Detektion geringer radioaktiver Signale (LASKEY und MILLS 1975, SWANSTROM und SHANK 1978).

Das apparente Molekulargewicht der Proteine wurde nach der in Kapitel 2.7.5 beschriebenen Methode bestimmt.

## 2.12 Bindungsassay zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften des LDL-Rezeptors

Der Bindungsassay zur Charakterisierung der Rezeptor-Liganden-Interaktion orientiert sich an den Arbeiten von KOVANEN *et al.* (1979b), SCHNEIDER *et al.* (1979) und FAINARU *et al.* (1988). An diese Untersuchungen angelehnt wurde die nicht-spezifische Ligandenbindung an nicht-rezeptorspezifischen Strukturen im Assay in Gegenwart von 1 mg nicht markierter LDL / ml Bindungsassay gemessen. Die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten ist in Tabelle 14 zusammengefaßt:

**Tab. 14: Zusammensetzung der Komponenten im Bindungsassay.**

	<b>Gesamtbindung</b> Volumen (µl)	<b>nicht-spezifische Bindung</b> Volumen (µl)	<b>modifizierte Bindung</b> Volumen (µl)
Membranen <sup>1</sup>	20	20	20
<sup>125</sup> I-LDL <sup>2</sup>	40	40	40
Puffer C-199	40	30	30
LDL <sup>3</sup>	----	10	----
EDTA / Suramin <sup>4</sup>	----	----	10
<b>Gesamtvolumen (µl)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

<sup>1</sup> Proteinkonzentration: 4 mg / ml; <sup>2</sup> Proteinkonzentrationen (µg / ml): 10 / 25,2 / 50 / 100 / 150 / 200

<sup>3</sup> Proteinkonzentration: 10 mg / ml; <sup>4</sup> Konzentration: 200 mM

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis: Die Lösungen wurden in Doppelansätzen in 0,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Vor Zugabe der <sup>125</sup>I-LDL wurden die Membranen 30 min mit nicht-markierten LDL oder EDTA bzw. Suramin bei 4 °C im Kühlschrank und darauf für 90 bis 120 min auf Eis inkubiert. An diese Inkubationszeit schloß sich die Abtrennung des nicht-gebundenen vom membrangebundenen Liganden durch Filtration oder Zentrifugation an.

### 2.12.1 Filtrationsassay

Der Filtrationsassay entspricht dem von SCHNEIDER *et al.* (1979) vorgestellten Verfahren und soll nur kurz dargestellt werden:

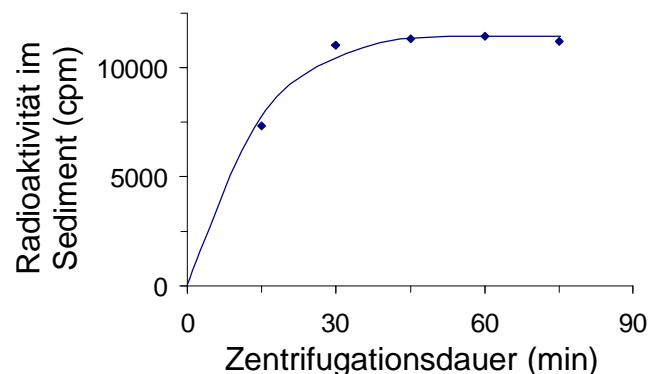
Ein Filtrationsapparat (Atlanta Chemie- und Handelsges. mbH) wurde mit zehn in Puffer D-199 äquilibrierten Filtern (OE67; Schleicher & Schuell) bestückt und die Filter dreimal mit

jeweils 3 ml eisgekühltem Puffer D-199 bei einem Unterdruck von 400 mbar gespült (Vacuubrand RS 4). Je 30 µl des Bindungsansatzes wurden zu 3 ml Puffer D-199 im Filtrationsapparat gegeben und darauf unter angelegtem Unterdruck viermal mit 3 ml Puffer D-199 gewaschen. Die Filter wurden vorsichtig mit Pinzetten abgenommen, geknickt und die Radioaktivität in Röhren im  $\gamma$ -Zähler (Berthold) gemessen.

### 2.12.2 Zentrifugationsassay

Eine Alternative zum Filtrationsassay nach SCHNEIDER *et al.* (1979) stellt die Zentrifugation des Bindungsassays dar, die mehrfach zur Trennung des gebundenem von nicht-gebundenem Liganden verwendet wurde (zusammengefaßt in HULME 1992). Da keine Möglichkeit bestand die bei KOVANEN *et al.* (1979b) benutzte Airfuge (Beckman) im Kühlraum zu installieren und Zentrifugationsversuche bei Raumtemperatur keine reproduzierbaren Ergebnisse erbrachten (nicht gezeigt), wurde auf eine Kühlzentrifuge mit niedrigerer Drehzahl zurückgegriffen (Eppendorf). Die hier verwendete Zentrifugalkraft von ~ 16.000 g übertrifft die Eigenschaften der von HULME (1992) zusammengestellten und für die Durchführung von Bindungsassays empfohlenen Zentrifugen bei weitem.

Jeweils 40 µl des Bindungsansatzes wurden in 0,4 ml Reaktionsgefäßen auf 160 µl gekühltes FCS aufgelegt und bei 14.000 Upm, 4 °C, 45 min lang zentrifugiert; eine Verlängerung der Zentrifugationsdauer führte zu keiner erhöhten Radioaktivität im Sediment (vgl. Abb. 14).



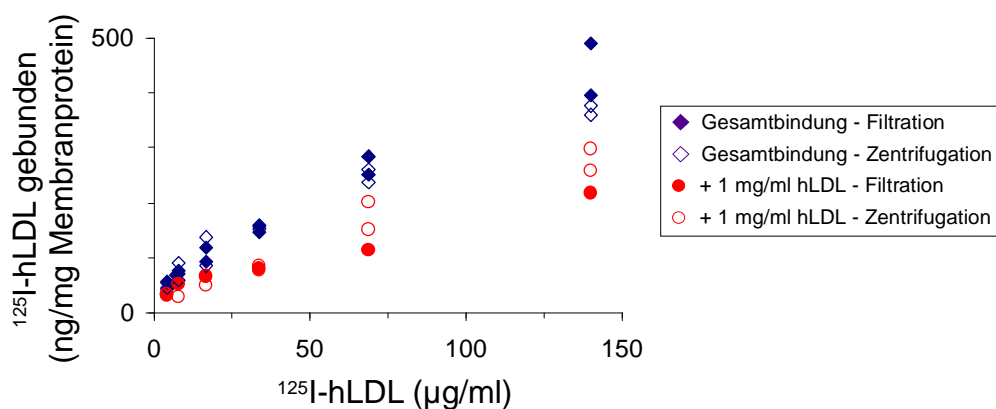
**Abb. 14:** Radioaktivität des Sediments in Abhängigkeit von der Zentrifugationszeit.

Bindung von  $^{125}\text{I}$ -hLDL (140 µg/ml) an bNNR-Membranen (700 - 100.000 g) nach 90 min Inkubation bei VT 4 °C. Die Zentrifugation erfolgte wie beschrieben bei 16.000 g, 4 °C und den angegebenen Zeiten.

Der Überstand wurde mit einer 10 ml Spritze mit 18G-Kanüle vorsichtig abgenommen, das Sediment zweimal mit eisgekühltem Puffer C-199 gewaschen und die Radioaktivität im  $\gamma$ -Zähler bestimmt.

### 2.12.3 Vergleich von Filtrations- und Zentrifugationsassay

Zum Vergleich der Eigenschaften von Filtrations- und Zentrifugationsassay wurde ein Bindungsversuch von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an bNNR-Membranen mit beiden Methoden durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt:



**Abb. 15:** Graphische Darstellung der Daten eines Bindungsexperiments von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an bNNR-Membranen.

Membranpräparation von 700 - 100.000 g; VT: 4 °C. Geschlossene Symbole: Abtrennung des membrangebundenen Liganden vom nicht gebundenen Liganden durch Filtration. Offene Symbole: Abtrennung des membrangebundenen Liganden vom nicht gebundenen Liganden durch Zentrifugation ( 16.000 g, 40 min, 4 °C).

Während die Daten der Gesamtbindung von der Trennungsmethode anscheinend unbeeinflusst bleiben, ist ein deutlicher Unterschied in der Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung zu erkennen ('+ 1mg / ml hLDL'). Die nicht-spezifische Bindung im Filtrationsassay erscheint gerade bei niedrigen  $^{125}\text{I}$ -hLDL-Konzentrationen gegenüber den Daten des Zentrifugationsassays erhöht.

Neben der einfacheren Handhabung wurde auch wegen den über den gesamten  $^{125}\text{I}$ -hLDL-Konzentrationsbereich homogen erscheinenden nicht-spezifischen Bindungsdaten, der Zentrifugationsassay der Filtrationsmethode vorgezogen und standardmäßig eingesetzt.

#### 2.12.4 Auswertung der Bindungsexperimente

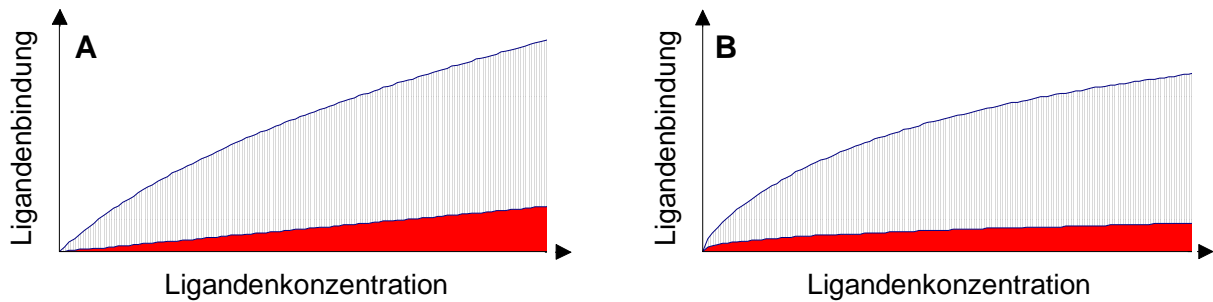
Die Auswertung von Bindungsstudien durch Linearisierungskonzepte (z.B. LINEWEAVER und BURK 1934, SCATCHARD 1941, DERANLEAU 1969) wurde größtenteils durch Verfahren der nicht-linearen Regression ersetzt. Die Vorteile, die diese erst mit Hilfe von Computertechnologie praktisch anwendbare Methode gegenüber der linearen Regression besitzt, sind mehrfach diskutiert worden (LEATHERBARROW 1990, MOTULSKY und RANSNAS 1987, RUSLING und KUMOSINSKI 1996, DUGGLEBY 1981, SUELTER 1990). Dennoch wird die Anfertigung von Linearisierungsplots immer noch für eine bessere Visualisierung der Experimente verlangt und in diesem Zusammenhang auch hier durchgeführt.

Um beide Methoden anwenden zu können, wurde das Programm *Hyperbola for Excel 97* entwickelt (LOBEMEIER 1999), das die Auswertung durch lineare und durch nicht-lineare Regression gleichermaßen erlaubt (vgl. Kap. 2.12.4 und ANHANG). Die Diskussion der Bindungskonstanten erfolgte jedoch nur auf der Grundlage der durch nicht-lineare Regression errechneten Parameter. Ein Vergleich der beiden Auswertungskonzepte erfolgt in Kapitel 4.2.5. Im Folgenden soll die nähere Vorgehensweise beschrieben werden.

Die Auswertung der spezifischen Rezeptor-Liganden-Interaktionen beruht zunächst zu einem großen Teil auf der Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung des Liganden an Strukturen, die nicht Teil der Ligandenbindungsstelle des Rezeptors sind. Dazu gehören Oberflächenstrukturen sowohl des biologischen Materials, als auch der verwendeten Verbrauchsmaterialien (Reaktionsgefäße, Filter, etc.; vgl. KERMODE 1989).

Die spezifische Bindung ergibt sich aus der Differenz zwischen der Gesamtbindung und der nicht-spezifischen Bindung. Abbildung 16 illustriert deutlich, daß die Art der nicht-spezifischen Bindung die Gestalt der Gesamtbindung bestimmt. Da aber die Form der nicht-spezifischen Bindung oftmals auf unbekanntem, von der verwendeten Methode abhängigen, zusammengesetzten Funktionen basiert, kann meist nur eine einfache Näherungsformel verwendet werden (vgl. RUSLING und KOMUSINSKI 1996). Diese Näherung sollte die Eigenschaften der spezifischen Bindung (schraffierte Fläche) nicht beeinflussen.





**Abb. 16:** Graphiken zur Illustration der Gesamtbindung, der nicht-spezifischen und der spezifischen Bindung.

Die Gesamtbindung setzt sich zusammen aus der nicht-spezifischen (gefüllte Fläche) und der spezifischen Bindung (schraffierte Fläche). Die spezifische Bindung beschreibt einen hyperbolischen Verlauf und ist in A und B identisch. **A.** Die nicht-spezifische Bindung folgt der linearen Beziehung  $y = a \cdot x$ . **B.** Obwohl nicht auf den ersten Blick ersichtlich, folgt die nicht-spezifische Bindung der Beziehung  $y = a \cdot x^b$ .

Eine direkte Bildung der Differenz der einzelnen Datenpunkte von Gesamtbindung und nicht-spezifischer ist meiner Meinung nach nicht vorteilhaft, da der experimentelle Fehler der nicht-spezifischen Bindung die Werte der spezifischen Bindung unter Umständen stark beeinflusst und so zur Berechnung falscher Bindungsparameter führt. Durch die Kurvenanpassung wird vielmehr die Gesamteigenschaft der nicht-spezifischen Bindung in Rechnung gestellt und nicht etwa aus dem Gesamtzusammenhang entnommene Einzelwerte betrachtet. Die Anpassung einer Kurve an die Daten der nicht-spezifischen Bindung erfolgte in allen hier durchgeführten Experimenten durch Regressionsanalyse mit der Exponentialfunktion  $y = a \cdot x^b$  (mit Microsoft EXCEL).

Die Auswertung der spezifischen Bindung durch Linearisierung nach SCATCHARD bedarf einer besonders kritischen Betrachtung. Der SCATCHARD-Plot projiziert die abhängige Variable sowohl auf die Ordinate als auch auf die Abszisse ( $[\text{gebundener Ligand}]/[\text{freier Ligand}]$  gegen  $[\text{gebundener Ligand}]$ ), so daß eine Grundlage für die Berechnung der Bindungskonstanten durch lineare Regression nicht gegeben ist (vgl. GRIMM und RECKNAGEL 1985, KERMODE 1989, LEATHERBARROW 1990). Weiterhin ist bei jodierten Liganden oftmals eine Aufwärtskrümmung der Datenpunkte zu beobachten, die auf unterschiedliche Bindungseigenschaften des modifizierten im Vergleich zum nativen Liganden zurückzuführen sind (KERMODE 1989). Im SCATCHARD-Plot jedoch wird dieses Verhalten als Bindung des Liganden an mehrere Rezeptorpopulationen gedeutet

(ROSENTHAL 1967, FELDMAN 1972); die Analyse ist oftmals subjektiv (KLOTZ 1982, vgl. FELDMAN 1983).

Der SCATCHARD-Plot besitzt heute nur noch anschaulichen Charakter und wird allenfalls zur zusätzlichen graphischen Präsentation eingesetzt. Besser ist es die nicht-transformierten Daten direkt durch nicht-lineare Regression auszuwerten (vgl. DUGGLEBY 1981, JOHNSTON 1985, PAGE 1987). Dabei muß jedoch durch geeignete Methoden geprüft werden, ob das mathematische Modell, das für die Kurvenanpassung gewählt wurde auch dasjenige Modell ist, das das Experiment am besten beschreibt (MOTULSKY und RANSNAS 1987, RUSLING und KUMOSINSKI 1996). Das Programm PRISM (GraphPad) bietet beispielsweise die Möglichkeit die Anpassung verschiedener Modelle miteinander zu vergleichen (z.B. '1 Ligand - 1 Rezeptor' gegen '1 Ligand - 2 Rezeptoren'). Da jedoch nicht uneingeschränkter Zugang zu diesem Programm bestand wurden nur einige Versuche exemplarisch in diesem Kontext untersucht.

Zur Berechnung der Bindungskonstanten mußte deshalb ein Programm für nicht-lineare Regression entwickelt werden, das gestattet die Bindungsexperimente angemessen auszuwerten. Dazu wurde in der Microsoft EXCEL 97 Umgebung das Programm von DUGGLEBY (1981) in VBA übersetzt, umgeschrieben und erweitert. Der Vorteil dieser Vorgehensweise bestand darin, daß die bereits in EXCEL implementierten Routinen zur graphischen Gestaltung mitbenutzt werden konnten.

Die mathematischen Grundlagen des Programms *Hyperbola for Excel 97* sollen hier nur kurz erwähnt werden:

Das grundlegende Konzept des Programms ist ausführlich bei DUGGLEBY (1981) diskutiert worden. Verwendet wird das GAUSS-NEWTONSche Verfahren zur nicht-linearen Regression (vgl. WILKINSON 1961), das zur Berechnung der Konstanten die Eingabe initialer Parameter benötigt. Diese Werte können in *Hyperbola for Excel 97* manuell eingegeben oder automatisch bestimmt werden. Aus der Vielfalt der Verfahren zur Berechnung einer ersten Näherung zur Eingabe dieser initialen Parameter (z.B. durch den doppelt-reziproken Plot), kamen hier die Gleichungen von CORNISH-BOWDEN (1979) zur Anwendung (zitiert nach SUELTER 1990).

Für das Bindungsmodell '1 Ligand - 1 Rezeptor'

$$y = \frac{b_0 \cdot x}{b_1 + x} \quad \text{mit } b_0 = B_{\max} \text{ und } b_1 = K_D$$

gilt für die Anfangsschätzwerte  $b_0$  und  $b_1$ :

$$b_0 = \frac{\sum [y_i]^4 / [x_i]^2 \sum [y_i]^4 - (\sum [y_i]^4 / [x_i])^2}{\sum [y_i]^4 / [x_i]^2 \sum [y_i]^3 - (\sum [y_i]^4 / [x_i]) (\sum [y_i]^3 / [x_i])}$$

$$b_1 = \frac{\sum [y_i]^4 \sum [y_i]^3 / [x_i] - \sum [y_i]^4 / [x_i] \sum [y_i]^3}{\sum [y_i]^4 / [x_i]^2 \sum [y_i]^3 - (\sum [y_i]^4 / [x_i]) (\sum [y_i]^3 / [x_i])}$$

Liegen diese ersten Näherungswerte vor, können über die folgenden Formeln nächst bessere Werte iterativ bestimmt werden:

$$b_0 = \frac{(\sum [y_i]^2 / (b_1 + [x_i])^2) (\sum [x_i]^2 [y_i]^2 / (b_1 + [x_i])^2) - (\sum [x_i][y_i]^2 / (b_1 + [x_i])^2)^2}{(\sum [y_i]^2 / (b_1 + [x_i])^2) (\sum [x_i]^2 [y_i] / (b_1 + [x_i])^2) - (\sum [x_i][y_i]^2 / (b_1 + [x_i])^2) (\sum [x_i][y_i] / (b_1 + [x_i])^2)}$$

$$b_1 = \frac{(\sum [x_i]^2 [y_i]^2 / (b_1 + [x_i])^2) (\sum [x_i][y_i] / (b_1 + [x_i])^2) - (\sum [x_i][y_i]^2 / (b_1 + [x_i])^2) (\sum [x_i]^2 [y_i] / (b_1 + [x_i])^2)}{(\sum [y_i]^2 / (b_1 + [x_i])^2) (\sum [x_i]^2 [y_i] / (b_1 + [x_i])^2) - (\sum [x_i][y_i]^2 / (b_1 + [x_i])^2) (\sum [x_i][y_i] / (b_1 + [x_i])^2)}$$

Die nächst besseren Näherungswerte  $b_0$  und  $b_1$  wurden als Startwerte für den Algorithmus der nicht-linearen Regression verwendet. Das Konvergenzkriterium, das die Summe der absoluten Werte der relativen Veränderungen der einzelnen Regressionsparameter  $< 10^{-5}$  ist (vgl. Anhang 7.2), beendet die Berechnung und startet die Ausgabe der Werte. Sollte das Kriterium nicht innerhalb von zehn Iterationen erreicht werden, wird eine Warnung angezeigt, die Berechnung abgebrochen und die Werte ausgegeben.

Die Berechnung der Standardabweichung beruht auf dem Konzept der linearen Regression und kann strenggenommen nicht für Parameter aus nicht-linearer Regression angewendet werden (MOTULSKY und RANSNAS 1987). Da der Fehler für diese Parameter von der verwendeten Regressionsgleichung abhängt und meistens nicht symmetrisch verteilt ist,

kann die Standardabweichung nicht als 'exakter' Wert verwendet werden (vgl. RUSLING und KOMUSINSKI 1996). Es hat sich deshalb eingebürgert, 95%-Konfidenzintervalle für die Parameter anzugeben.

Die obere und untere Grenze der 95%-Konfidenzintervalle der Bindungsparameter (FÖRSTER und RENZ 1979) ist definiert durch:

$$b_k \pm t_{n-m-1;\alpha} \cdot s_{b_k}; \quad k = 0,1,\dots,m$$

$b_k$ : Regressionsparameter (i.e.  $b_0$ :  $B_{\max}$ ,  $b_1$ :  $K_D$ )

$t$ :  $t$ -Wert der  $t$ -Verteilung

$n$ : Anzahl der Datenpunkte

$s_{b_k}$ : Standardabweichung des Regressionsparameters  $b_k$

Der Vertrauensbereich für den Regressionsparameter  $b_k$  ist bei einer gegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  gleich:

$$b_k - t_{n-m-1;\alpha} \cdot s_{b_k} \leq b_k \leq b_k + t_{n-m-1;\alpha} \cdot s_{b_k}$$

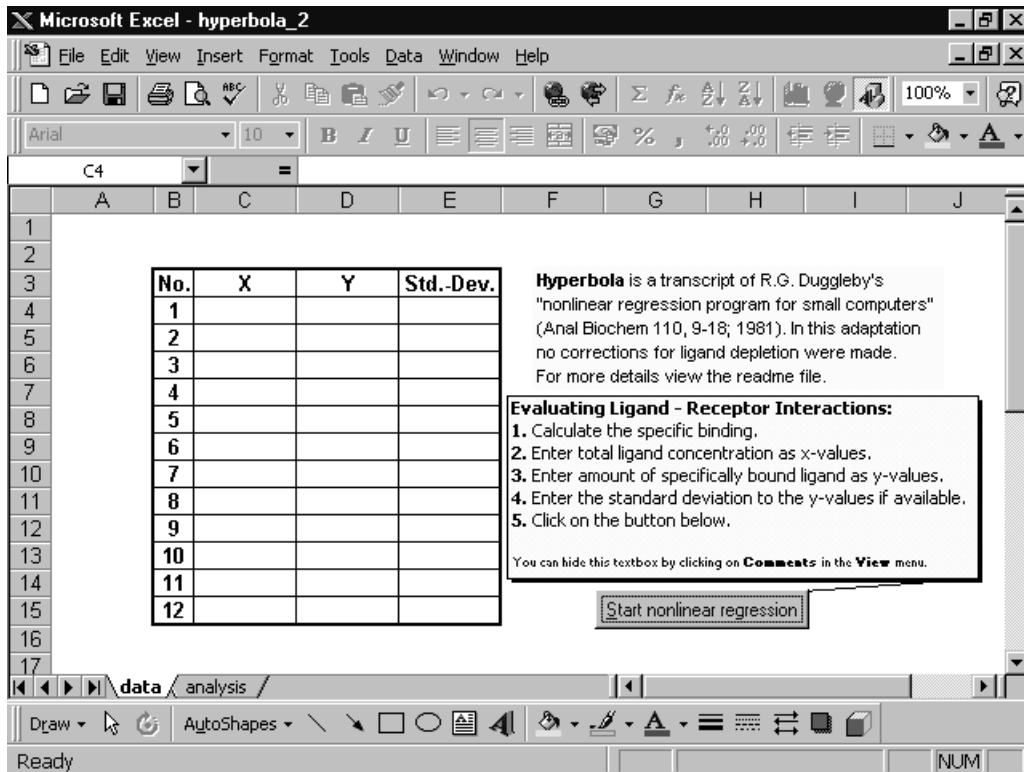
Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit  $\alpha = 0,05$  festgelegt (vgl. SPSS, Hyper, Prism).

Die Berechnung der Bindungskonstanten aus der SCATCHARD-Linearisierung erfolgte durch:

$$y = a \cdot x + b; \quad B_{\max} = -a \cdot x$$
$$K_D = -\frac{B_{\max}}{a}$$

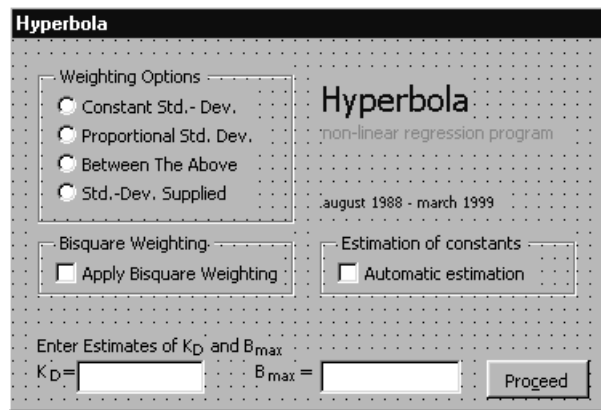
Im folgenden soll der Aufbau des Programms erläutert und in Hinblick auf die Verwendung zur Analyse der Daten aus den Bindungsassays beleuchtet werden. Das Programm untergliedert sich in drei Teile:

- Der Eröffnungsbildschirm enthält neben einer ausblendbaren Kurzanweisung eine vorgefertigte Tabelle, in die die Daten einzugeben sind (vgl. Abb. 17).



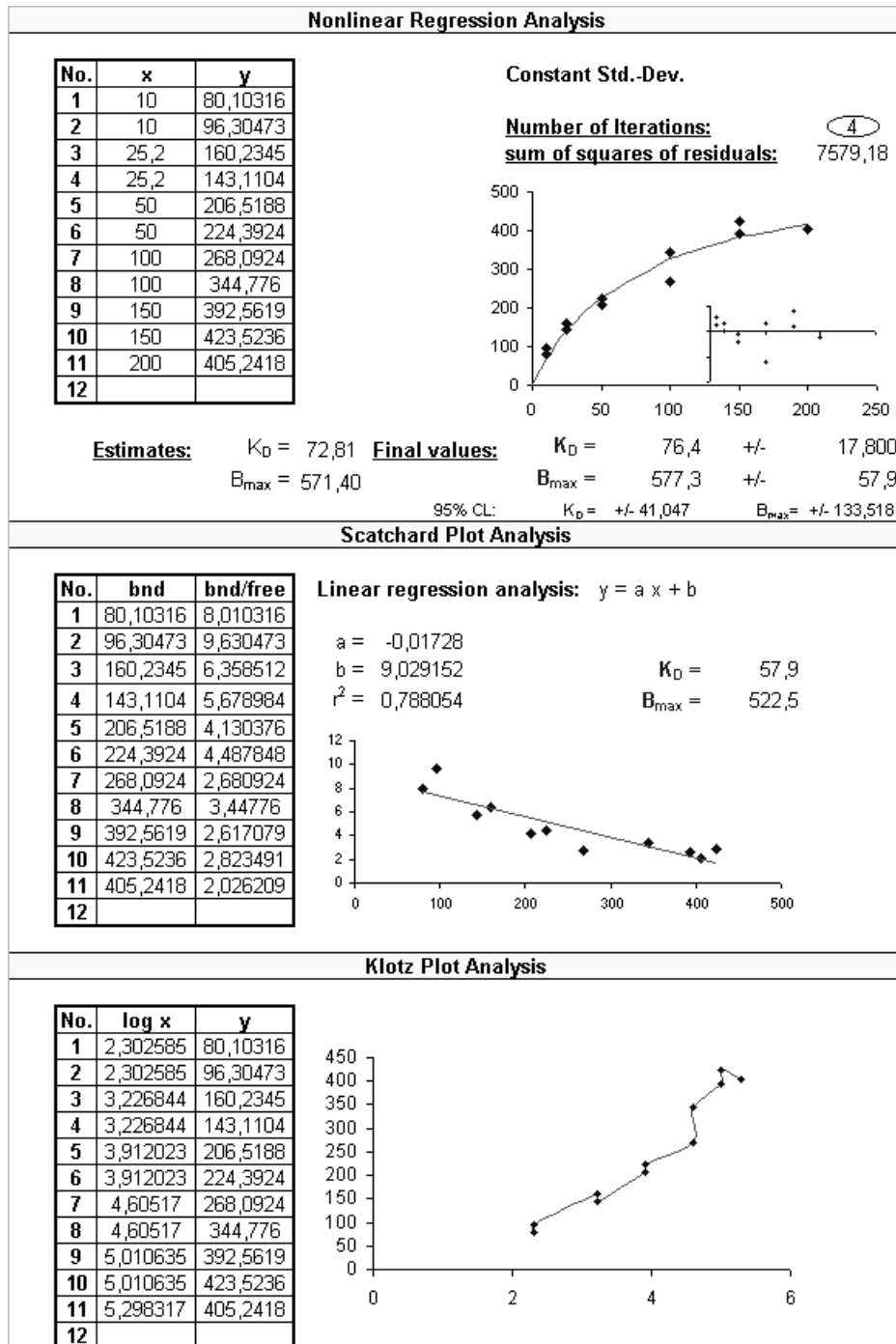
**Abb. 17:** Bildschirmdarstellung der Eingabeseite von *Hyperbola for Excel 97*.  
Erklärung siehe Text.

- Eine Dialogbox (Abb. 18), die sich der Dateneingabe nach Klicken des Start-Knopfes anschließt. Hier werden die Parameter zur nicht-linearen Regression eingestellt:
  - Obwohl verschiedene Wichtungsoptionen zur Verfügung stehen (vgl. DUGGLEBY 1981), wurde bei der Berechnung der Parameter auf eine Wichtung der Daten verzichtet und die Grundeinstellung 'Const. Std. Dev.' nicht verändert.
  - Die Eingabe der ersten Näherungswerte wurde nie manuell, sondern immer automatisch durchgeführt, um für alle Experimente die gleiche Ausgangsbasis zu schaffen.



**Abb. 18:** Dialogbox zur Einstellung der Regressionsparameter.  
Erklärung *siehe Text*.

- Der Ausgabebildschirm (Abb. 19) enthält alle wichtigen Elemente zur Regressionanalyse:
  - Anzahl der Iterationen und Summe der Quadrate.
  - Die ersten Näherungswerte und die berechneten Parameter mit Standardabweichung und 95% Konfidenzintervallen.
  - Grafik zur Darstellung der Bindungskurve im direkten Plot.
  - Grafik zur Darstellung des SCATCHARD-Plots und Berechnung der Bindungsparameter aus der SCATCHARD-Linearisierung.
  - Darstellung des KLOTZ-Plots (*siehe KLOTZ 1982*).



**Abb. 19:**    **Verkleinerter Ausdruck der Ausgabeseite von *Hyperbola for Excel 97*.**  
 Erklärung siehe Text.

Bei der Eingabe der Werte ist darauf zu achten, daß weder sehr kleine noch sehr große Zahlen eingegeben werden, da diese die Rechengenauigkeit beeinflussen (vgl. DUGGLEBY 1981). Es ist deshalb notwendig niedrige bzw. hohe Zahlen durch SI-Vorsilben in einen sinnvollen Wertebereich zu bringen (z.B. 1 ng/mg statt 0,000.001 mg/mg).

Ein Vergleich der Parameterberechnung durch Hyperbola for Excel 97 und anderen kommerziellen Programmen findet sich in Tabelle 15.

**Tab. 15: Vergleich der Parameterberechnung durch kommerzielle Programme mit Hyperbola for Excel 97.**

Programm	Parameter <sup>†</sup> aus 1. Näherung		Parameter <sup>†</sup> aus nicht-linearer Regression			R <sup>2</sup>
	automatisch	manuell	Parameter	SD <sup>‡</sup>	95% KI <sup>§</sup>	
Hyperbola	$K_D = 89,69$ $B_{max} = 3241,29$	möglich	$K_D = 89,78$ $B_{max} = 3242,43$	2,96 46,5	81,56 - 98 3113,33 - 3371,54	0,9996
Hyper	$K_D = 86,52^*$ $B_{max} = 3300^*$	nicht möglich	$K_D = 89,78$ $B_{max} = 3242$	2,96 46,5	81,56 - 98 3112,6 - 3371,4	keine Angabe
Prism	$K_D = 31,5$ $B_{max} = 2248$	möglich	$K_D = 89,78$ $B_{max} = 3242$	2,96 46,5	81,57 - 97,99 3113 - 3372	0,9996
SPSS	nicht möglich	$K_D = 90$ $B_{max} = 3000$	$K_D = 89,78$ $B_{max} = 3242,44$	2,96 46,5	81,57 - 97,99 3113,25 - 3371,64	0,9996

<sup>†</sup> $K_D$  in ( $\mu\text{g/ml}$ ),  $B_{max}$  in ( $\text{ng/mg}$ ) <sup>‡</sup>SD: Standardabweichung <sup>\*</sup>Näherungswerte berechnet aus HANES-Plot. <sup>§</sup>Konfidenzintervall.

Es ist deutlich zu erkennen, daß die ersten Näherungswerte vermutlich aufgrund unterschiedlicher Näherungsmethoden z.T. stark voneinander abweichen (z.B. berechnet Hyper die Näherungswerte nach HANES 1932), die durch nicht-lineare Regression erhaltenen Werte jedoch identisch sind. Die Abweichung der Konfidenzintervalle ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Genauigkeit in der Variablendeklaration und der Berechnung des  $t$ -Wertes zurückzuführen.

### 2.13 Statistische Behandlung der Daten

Zur Berechnung der Parameter aus Bindungsversuchen wurde, da kein uneingeschränkter Zugang zu leistungsfähigen Computerprogrammen bestand und eine Programmierung zu aufwendig gewesen wäre, nur exemplarisch für jede Kombination von Liganden und Membrantyp überprüft, ob die vorliegenden Daten besser an das mathematische Modell '1 Ligand - 1 Rezeptor' oder an '1 Ligand - 2 Rezeptoren' angepaßt werden konnten. Dazu wurde Prism (GraphPad) benutzt, das diese Funktion, basierend auf dem F-Test, bereits implementiert hat. Es stellte sich heraus, daß in allen überprüften Versuchen das '1 Ligand - 1 Rezeptor'-Modell bevorzugt wurde, so daß alle Versuche mit Hyperbola for Excel 97 ausgewertet werden konnten.



Die Angabe der Parameter aus diesen Bindungsversuchen mit den dazugehörigen Standardabweichungen (SD) bezieht sich dabei in der Regel nicht auf die 'biologische' Variabilität mehrerer Versuche, sondern auf die Anpassungsgüte der Regressionskurve an die Daten eines Experimentes. Die der Berechnung zugrundeliegenden Freiheitsgrade entsprechen dabei der Differenz der Anzahl der Datenpunkte von der Anzahl der berechneten Parameter. Derselbe Sachverhalt gilt für die Angabe der 95%-Konfidenzintervalle (vgl. Kap. 2.12.4). Hingegen sind Zahlenwerte, die den Mittelwert mehrerer Experimente darstellen, als solche mit Standardabweichung unter Angabe der Versuche gekennzeichnet.

Der Vergleich der Bindungsparameter verschiedener Experimente basiert auf dem von MOTULSKY (1998) aufgestellten Verfahren. Danach ('*Approach 3*') können die Parameter aus nicht-linearer Regression auch bei nur einmaliger Durchführung der Experimente auf signifikante Unterschiede getestet werden. Die nominellen Signifikanzniveaus ( $p$ ) sind, basierend auf der Durchführung des zweiseitigen t-Tests bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  angegeben. Dieses Vorgehen entspricht dem zugrundeliegenden Verfahren des Programms Prism (GrapPad), das speziell für Ligandenbindungsexperimente konzipiert wurde.

## 2.14 Übersicht über die Darstellung der Ergebnisse aus Bindungsversuchen

Die Ergebnisse aus Bindungsexperimenten sind für jeden Versuch in je einer Graphik und einer Tabelle zusammengefaßt. Damit die Fülle an Informationen leichter zu überschauen ist, erscheint es sinnvoll, zum leichteren Verständnis und zum schnelleren Auffinden von Einzelwerten eine kurze Übersicht über die einzelnen Elemente zu geben.

Für die graphische Darstellung der Bindungsversuche sind prinzipiell zwei verschiedene Darstellungsformen gewählt:

- Der direkte Plot vereinigt die Bindungskurven für die Gesamtbindung, die nicht-spezifische Bindung und Ligandenbindung unter dem Einfluß unterschiedlicher Substanzen (z.B. EDTA, Suramin). Die Kurven sind durch quadratische und nicht-lineare Regression berechnet worden.

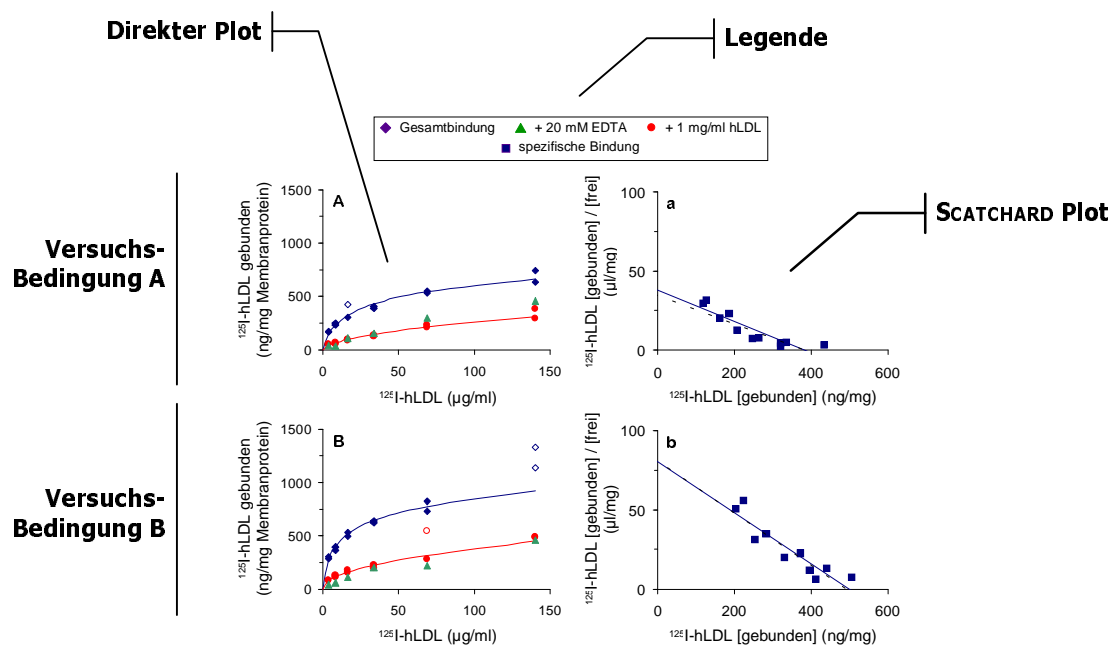


Abb. 27: Bindung von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an bNMR-Membranpräparationen von 700-100.000 g (A) und 8.000-100.000 g (B).

(A) und (B): Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden. (a), (b): Scatchard Plot von (A) bzw. (B). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Abb. 20: Übersicht über die einzelnen Elemente der graphischen Präsentation von Bindungsversuchen.

- Im SCATCHARD-Plot ist nur die spezifische Bindung aufgetragen. Die durchgezogene Linie entspricht der Regressionsgeraden der transformierten Daten im SCATCHARD-Plot. Zum Vergleich ist die durch nicht-lineare Regression berechnete Funktion gestrichelt dargestellt.

In einer sich der Graphik anschließenden Tabelle sind die wichtigsten Daten aus beiden Plots zusammengefaßt.

Ligand - Membrantyp	Versuchs-Bedingung A		Versuchs-Bedingung B			
	700-100.000 g		8.000-100.000 g			
<b>Tab.18: Bindungsparameter von <sup>125</sup>I-hLDL an bNNR (vgl. Abb. 27).</b>						
<sup>125</sup> I-hLDL - bNNR	700-100.000 g		8.000-100.000 g			
initiale Schätzwerte	K <sub>D</sub>	11,2	K <sub>D</sub>	6,1	<b>Regressionsparameter aus nicht-linearer Regression</b>	
	B <sub>max</sub>	389,0	B <sub>max</sub>	496,5		
Bindungsparameter	K <sub>D</sub>	11,1 ± 2,8	K <sub>D</sub>	6,1 ± 1,2		
	B <sub>max</sub>	382,4 ± 25,4	B <sub>max</sub>	492,8 ± 24,5		
95% Konfidenzintervalle	4,7 ≤ K <sub>D</sub> ≤ 17,5		3,4 ≤ K <sub>D</sub> ≤ 8,8			
	323,8 ≤ B <sub>max</sub> ≤ 441,0		434,9 ≤ B <sub>max</sub> ≤ 550,7			
nicht-spez. Bindung	y = 21,234 x <sup>0,5432</sup> R <sup>2</sup> = 0,97		y = 41,68 x <sup>0,4818</sup> R <sup>2</sup> = 0,98			
Iterationen	4		3			
<b>SCATCHARD-PLOT</b>						
Bindungsparameter	K <sub>D</sub>	10,1	K <sub>D</sub>	6,2		<b>Bindungskonstanten aus linearer Regression</b>
	B <sub>max</sub>	382,5	B <sub>max</sub>	499,8		
Einheiten: K <sub>D</sub> in [µg LDL-Protein/ml], B <sub>max</sub> in [ng LDL-Protein/mg Membranprotein]						

**Abb. 21: Übersicht über die einzelnen Elemente der tabellarischen Präsentation von Bindungsversuchen.**

Aus der Berechnung der Bindungsparameter durch nicht-lineare Regression (*direkter Plot*) gehen folgende Werte hervor:

**Initiale Schätzwerte:** Zur Berechnung von K<sub>D</sub> und B<sub>max</sub> durch nicht-lineare Regression werden erste Näherungen der Bindungsparameter benötigt. Diese als initiale Schätzwerte bezeichneten Werte wurden ausschließlich durch die von CORNISH-BOWDEN (1979) nach WILKINSON (1961) aufgestellten Formeln bestimmt (vgl. Kap. 2.12.4).

**Bindungsparameter:** Die aus der nicht-linearen Regression hervorgegangenen Werte für  $K_D$  und  $B_{max}$  werden mit der Standardabweichung angegeben.

**95% Konfidenzintervalle:** In dieser Zeile finden sich die 95%-Konfidenzintervalle der Bindungsparameter.

**nicht-spez. Bindung:** Die Werte, die für die nicht-spezifische Bindung ermittelt worden waren, wurden an eine quadratische Gleichung angepaßt. Es ist jeweils die angepaßte Formel und die Güte der Anpassung gezeigt.

**Iterationen:** Die Anzahl der Iterationen spiegelt in etwa die Qualität des Experiments wieder. Eine hohe Zahl an Iterationen deutet auf eine schlechtere Datenqualität (z.B. hohe Streuung der Werte) hin als wenige Iterationen - vorausgesetzt daß das der Regression zugrundeliegende Bindungsmodell anwendbar ist. Es waren maximal zehn Iterationen möglich (vgl. Kap. 4.2.5).

Die Berechnung der Bindungsparameter aus dem transformierten Plot nach SCATCHARD liefert folgende Werte:

**Bindungsparameter:** Hier finden sich die aus linearer Regression der transformierten Daten hervorgegangenen Werte der Bindungskonstanten. Aufgrund der Verzerrung des experimentellen Fehlers durch den SCATCHARD-Plot, werden die Werte für  $K_D$  und  $B_{max}$  ohne Standardfehler angegeben.

### **3 Ergebnisse und Diskussion**

Um eine bessere Übersicht über die Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die Interpretation von Befunden aus Einzelexperimenten gemeinsam mit der Darstellung der Ergebnisse vorgenommen. Eine zusammenfassende und die Ergebnisse aus den Einzelexperimenten vergleichende Diskussion erfolgt in Kapitel 4: Zusammenfassende Diskussion.

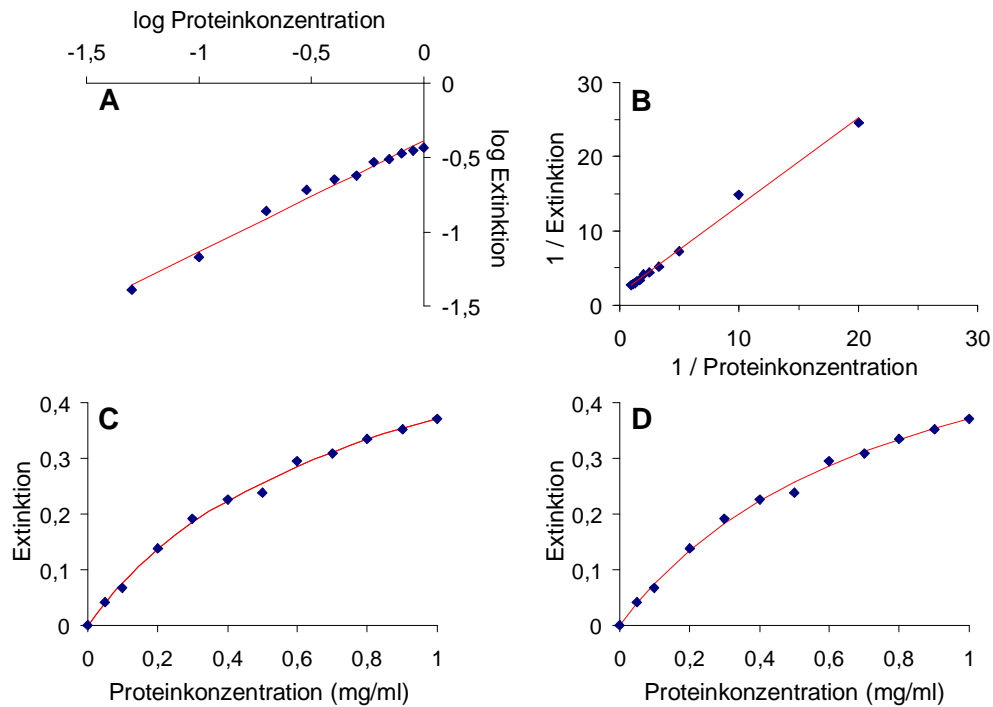
#### **3.1 Die Proteinbestimmung als Grundlage der experimentellen Datenerfassung und Auswertung**

##### **3.1.1 Zur Auswertung der modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY**

Abbildung 22 zeigt die Anpassungskurven der in Kapitel 2.5.4 vorgestellten Regressionmodelle für ein typisches Experiment (durchgeführt nach den Angaben in Kap. 2.5.3). Während die Methoden nach STAUFFER (1975) und CAMPBELL (1983) eine Transformation der Daten verlangten, damit die so linearisierten Daten über die lineare Regression evaluiert werden konnten (Abb. 22 A/B), wurde in der Analyse nach HARRINGTON (1990) und GRANT (1990) den untransformierten Daten eine Regressionskurve im direkten Plot angepaßt.

Vorausgesetzt das gewählte mathematische Modell beschreibt das Experiment adäquat, liegt der Vorteil der zuletzt genannten Verfahren gegenüber den Linearisierungsverfahren in der Verwendung von unveränderten Originaldaten, deren Fehlerverteilung nicht wie bei den Transformationsmethoden durch mathematische Operationen verzerrt wird (vgl. LEATHERBARROW 1990, LOBEMEIER 2000). Die Anpassung von Regressionkurven im direkten Plot lieferte also genauere Ergebnisse als dies durch Linearisierungsplots möglich ist. (Die einzige Ausnahme liegt vor, wenn die Daten frei von Fehlern sind und der Linearisierungsplot vom Regressionsmodell des direkten Plots mathematisch abgeleitet ist.)

Die Entscheidung darüber, welche der Anpassungsgeraden bzw. -kurven für die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben verwendet werden sollte, erfolgte durch Analyse der Residualplots der einzelnen Anpassungen.

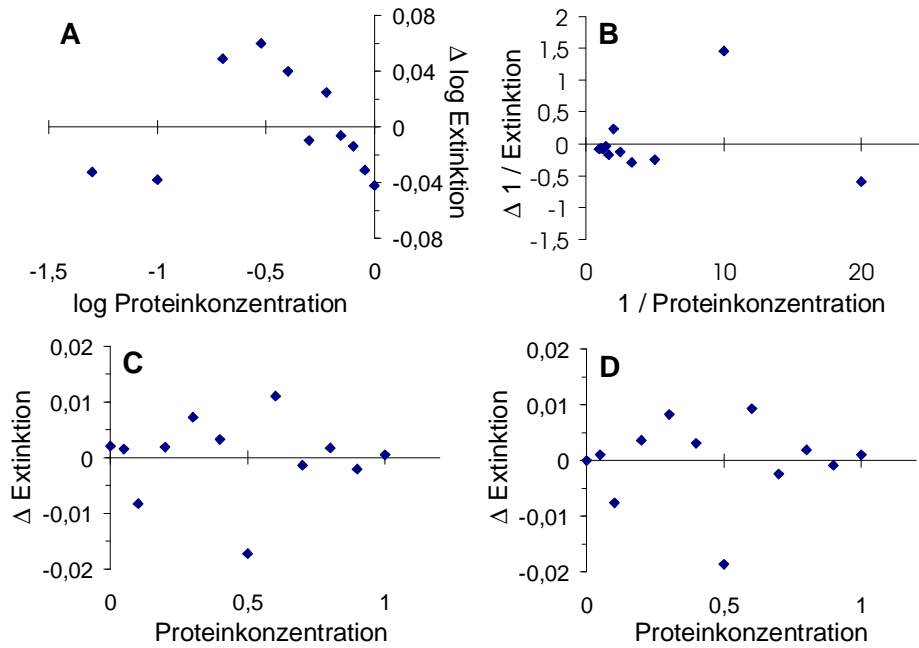


**Abb. 22:** Graphische Darstellung der Extinktionen der BSA-Standard-Eichreihe in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

(A) log-log-Plot nach STAUFFER. (B) Doppelt-reziproker Plot nach CAMPBELL. (C) Direkter Plot. Anpassung eines Polynom 4. Grades nach HARRINGTON. (D) Direkter Plot. Anpassung einer rechtwinkligen Hyperbel nach GRANT.

Die Anpassungsgüte einer Regressionslinie beschreibt die Nähe der berechneten Ausgleichskurve zu den einzelnen Datenpunkten (vgl. FÖRSTER und RÖNZ 1979). Trägt man den Abstand der experimentell gemessenen Daten zur Regressionslinie in Abhängigkeit von der unabhängigen Variable im Residualplot auf, so erkennt man eine hohe Anpassungsgüte an kleinen Residualwerten und einer Normalverteilung der Residuen entlang der Abszisse (vgl. RUSLING und KUMOSINSKI 1996). Auf eine Berechnung durch den *runs*-Test (MUNSON und RODBARD 1980, MOTULSKY und RANSNAS 1987) wurde aufgrund der Eindeutigkeit der Ergebnisse verzichtet.

Die Residualplots der Linearisierungen nach STAUFFER und CAMPBELL zeigen deutlich eine nicht-zufällige Verteilung der Residuen (mit je 5 *runs*). Vielmehr war eine Gruppierung (in Form von *clustern*; Abb. 23B), bzw. ein gebogener Verlauf der Residuen entlang der Abszisse (Abb. 23A) zu erkennen: der doppelt-logarithmische und der doppelt-reziproke Plot beschreiben die Eichkurve der Lowry-Proteinbestimmung somit nur schlecht.



**Abb. 23:** Graphische Darstellung der Residuen aus den Kurvenanpassungen der Abbildung 22.

Residualplots der Anpassung (A) des log-log Plots, (B) des doppelt-reziproken Plots, (C) eines Polynom 4. Grades und (D) einer rechtwinkligen Hyperbel.

Die Abbildungen 23 C und D hingegen zeigen eine Normalverteilung der Residuen (mit 9 runs). Beide Modelle beschreiben den Kurvenverlauf der Eichkurve zufriedenstellend und liefern damit ein empirisches mathematisches Modell für den Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Extinktion. Es ist jedoch anzumerken, daß eine Anpassung eines Polynoms nur dazu dienen kann, eine ‘optisch gute’ Verbindung zwischen einzelnen Datenpunkten herzustellen. Polynome, besonders höherer Grade, neigen dazu sich den Datenpunkten anzuschmiegen und so an „Ausreißern“ lokale Maxima und Minima zu erzeugen. Sie sind damit ungeeignet experimentelle Fehler auszugleichen und bilden keine Grundlage zur Kalibrierung einer Standard-Eichreihe (im Gegensatz zu den Angaben von FUNG und LEE 1991; vgl. LOBEMEIER 2000). Die Anpassung einer rechtwinkligen Hyperbel nach GRANT (1990) ist damit die einzig objektive Analysemethode der hier vorgestellten modifizierten LOWRY-Proteinbestimmung und wurde deshalb ausschließlich für deren Analyse verwendet.

### 3.1.2 Qualitativer Vergleich der Methoden der Proteinbestimmung

Ein Vergleich der Methoden zur Proteinbestimmung war notwendig geworden, da bekannt ist, daß diese Methoden bei unterschiedlicher Chromogenizität der Reaktanden zu unterschiedlichen Werten führen (CLARK 1984).

Der Vergleich der modifizierten LOWRY-Methode im Vergleich zur Originalarbeit war notwendig, um eine Vergleichbarkeit zu den Daten aus der Literatur zu gewährleisten. Die Werte der Proteinbestimmung bei  $\lambda = 280$  nm wurden für die radioaktive Markierung der Plasmalipoproteine benötigt und auf eine gemeinsame Basis mit der modifizierten LOWRY-Methode hin verglichen. Letztendlich wurde während der Arbeiten zu dieser Untersuchung die Proteinbestimmung der Plasmalipoproteine mit Fluorescamin eingeführt, die gegenüber der modifizierten Lowry-Methode ein zügiges Arbeiten erlaubt. Ein Vergleich der beiden zuletzt genannten Methoden sollte eine Vergleichbarkeit der Daten innerhalb der Versuchsserie gewährleisten.

#### 3.1.2.1 Vergleich der Original LOWRY-Methode mit der modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY

Schwer lösliche Proteine werden oftmals durch die Proteinbestimmung nach LOWRY *et al.* (1951) nicht erfaßt. Sie können aber meistens durch Zugabe von NaOH und Detergenz (z.B. Triton X-100 oder SDS) gelöst und mitbestimmt werden. Inwiefern die Werte der modifizierten LOWRY-Methode von Werten der Originalarbeit abweichen, sollte in Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den Bindungsassays mit bereits veröffentlichten Daten untersucht werden; Tabelle 16 faßt die Ergebnisse zusammen:

**Tab. 16: Vergleich der Werte der LOWRY-Methode mit der modifizierten LOWRY-Methode.**

Probenbezeichnung	Proteingehalt (mg/ml)		F <sup>†</sup>
	LOWRY-Methode	mod. LOWRY-Methode	
hLDL	7,6	7,1	1,07
bNNR	5,0	6,0	0,83

<sup>†</sup> Der Faktor F errechnet sich aus dem Quotienten des Proteingehalts von [LOWRY-Methode] / [mod. LOWRY-Methode]

Während die Abweichung der Werte der hLDL-Proteinkonzentration beider Methoden innerhalb 10 % liegt und somit annähernd gleiche Werte liefert, liegt der mit dem



Originalverfahren bestimmte Proteingehalt der isolierten Membranen deutlich unter dem mit der modifizierten Methode ermittelten Wert. Vermutlich werden schwer lösliche Proteine von der original LOWRY-Methode nicht erfaßt, was zu niedrigeren Werten führt. Als Folge daraus können Bindungsparameter (z.B.  $B_{\max}$ ) aus bereits veröffentlichten Arbeiten im Vergleich zu den hier vorgestellten Ergebnissen leicht erhöht erscheinen.

### 3.1.2.2 Vergleich der photometrischen Bestimmung bei $\lambda = 280$ nm mit der modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY

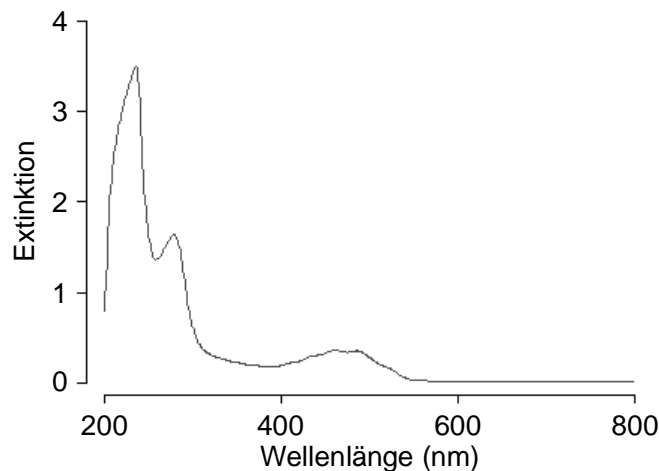
Die für die radioaktive Markierung der Plasmalipoproteine nach SHEPHERD *et al.* (1976; vgl. Kap. 2.9) angegebenen Relationen von  $^{125}$ Iod zum hLDL-Proteingehalt, wurden durch die photometrische Bestimmung des hLDL-Proteingehalts bei  $\lambda = 280$  nm definiert (M. CASLAKE persönliche Mitteilung vom 22.04.1997). Um jedoch die Proteinbestimmung aller biologischen Proben direkt miteinander vergleichen zu können, wurde die modifizierte LOWRY-Methode (Kap. 2.5.3) als Standardverfahren eingesetzt. Dieses Vorgehen machte einen Vergleich der modifizierten LOWRY-Methode mit dem von SHEPHERD *et al.* (1976) verwendeten Verfahren notwendig.

**Tab. 17: Vergleich der Werte der modifizierten LOWRY-Methode und der photometrischen Bestimmung bei  $\lambda = 280$  nm.**

Probenbezeichnung	Proteingehalt (mg/ml)		F <sup>†</sup>
	$\lambda = 280$ nm	mod. LOWRY-Methode	
hLDL <sub>dialysiert</sub>	23,8	16,7	1,43
hLDL <sub>nicht dialysiert</sub>	12,9	8,5	1,52

<sup>†</sup> Der Faktor F errechnet sich aus dem Quotienten des Proteingehalts von [ $\lambda = 280$  nm] / [mod. LOWRY-Methode]

Die in Tabelle 17 aufgeführten Daten zeigen deutlich, daß die photometrisch bestimmten Proteinkonzentrationen der hLDL höher liegen als die durch die modifizierte Lowry-Methode ermittelten Werte. Auf eine exakte Bestimmung der Relationen wurde verzichtet, da eine grobe Einteilung sich für die Durchführung der radioaktiven Markierung von hLDL als ausreichend erwies; für die weitere Berechnung wurde ein Faktor von  $F = 1,43$  angenommen ( $\sim 0,7$  mg Protein<sub>mod. LOWRY</sub> / ml entsprechen 1 mg Protein <sub>$\lambda = 280$  nm</sub>).



**Abb. 24:** Absorptionsspektrum von nativen LDL des Menschen.

Die Proteinkonzentration von hLDL wurde mit Hilfe der modifizierten LOWRY-Methode bestimmt, anschließend mit Dialysepuffer auf eine Konzentration von 1 mg LDL-Protein / ml eingestellt und das Absorptionsspektrum in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm photometrisch erfaßt. Das hier bestimmte Verhältnis beträgt  $F \sim 1,7$ . Erklärung *siehe Text*.

Eine Störung der Messung bei  $\lambda = 690$  nm durch die Eigenfärbung der menschlichen Lipoproteine konnte, wie Abbildung 24 zeigt, ausgeschlossen werden, da native LDL Licht dieser Wellenlänge nicht absorbieren.

### 3.1.2.3 Vergleich der Proteinbestimmung mit Fluorescamin mit der modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY

Die Proteinbestimmung mit Fluorescamin kann im Vergleich zur modifizierten LOWRY-Methode in der Hälfte der Zeit durchgeführt werden und ermöglicht dadurch ein zügiges Arbeiten, das besonders bei labilen Materialien erforderlich sein kann. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob beide Methoden bei Plasmalipoproteinen identische Zahlenwerte liefern. Eine Proteinbestimmung der isolierten Membranen mit Fluorescamin ist nicht möglich, da diese immer in Tris-haltigen Puffern suspendiert waren und Fluorescamin mit primären Aminen, also auch mit Tris reagiert (CLARK 1984). Dadurch ist das Verhältnis von technische Nutz- und Basissignal für Messungen extrem ungünstig.

**Tab. 18:** Vergleich der Werte der modifizierten LOWRY-Methode und der Bestimmung mit Fluorescamin.

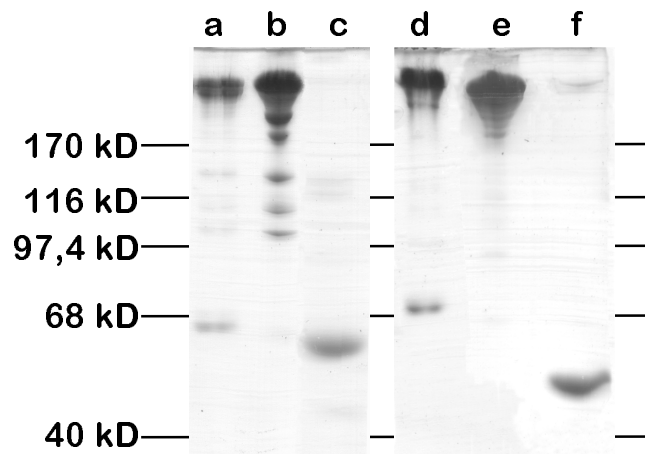
Probenbezeichnung	Proteingehalt (mg/ml)		$F^\dagger$
	Fluorescamin	mod. LOWRY-Methode	
cLDL	12,39	12,45	$\sim 1$

<sup>†</sup> Der Faktor F errechnet sich aus dem Quotienten des Proteingehalts von [Fluorescamin] / [mod. LOWRY-Methode]

Tabelle 18 zeigt den Vergleich beider Methoden anhand einer Proteinbestimmung von cLDL; die Abweichung der Werte voneinander ist  $< 0,5 \%$ . Die Proteinbestimmung mit Fluorescamin liefert also in diesem Zusammenhang mit der modifizierten LOWRY-Methode identische Werte. Ungefähr ein Viertel der Plasmalipoprotein-Präparationen wurde mit dieser Methode bestimmt.

### 3.2 Charakterisierung der Plasmalipoprotein-Präparationen aus Human- und Karpfen-Plasma

Die Präparationen von Plasmalipoproteinen aus Human- und Karpfenplasma sollten auf ihre Proteinzusammensetzung, den Reinheitsgrad und ihre Lagerungsfähigkeit unter  $N_{2;liq}$  überprüft werden. Dazu wurden solubilisierte Proteine aus Karpfen- und Human-Plasmalipoproteinen entsprechend den Angaben in Kapitel 2.8 durch SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Es konnte für beide Plasmalipoprotein-Präparationen gezeigt werden, daß eine Kontamination einer gereinigten Lipoproteinfraktion durch die an die jeweiligen Dichtebereiche angrenzenden Lipoproteinklassen nur sehr schwach ausgeprägt war (Abb. 25).



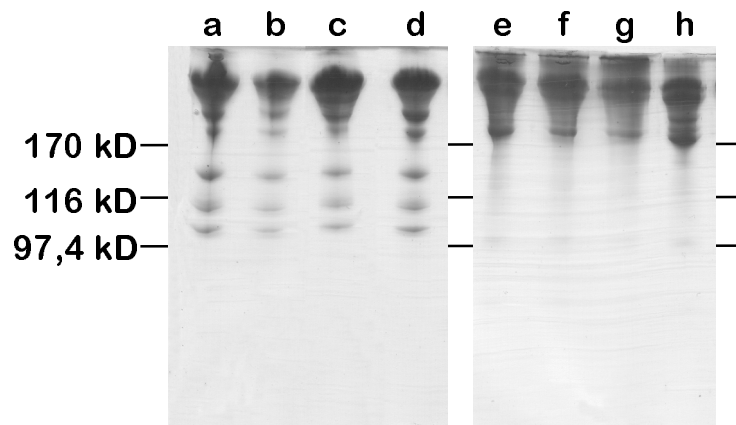
**Abb. 25:** Elektropherogramm von Karpfen- (a-c) und Human- (d-f) Plasmalipoproteinen.

Karpfen-Plasmalipoproteine: (a) VLDL, (b) LDL, (c) HDL.  
Human-Plasmalipoproteine: (d) VLDL, (e) LDL, (f) HDL.

Das von anderen Autoren (z.B. MENRAD 1989) geforderte Qualitätsmerkmal isolierter Lipoproteine geringer Dichte, daß nur Apolipoprotein B-100 in LDL-Präparationen nachweisbar sein und entsprechend nur eine einzige anfärbbare Proteinbande nach SDS-

PAGE auftreten darf, konnte hingegen nicht erreicht werden (Abb. 25 b, d). Es ist allerdings dabei zu beachten, daß MENRAD (1988) die Plasmalipoproteine nicht durch sequentielle Ultrazentrifugation, sondern durch einmalige Dichtegradientenzentrifugation mit kontinuierlichem Dichtegradienten isoliert hat. Nach seinen Angaben ist „[...] die möglichst schnelle und schonende Aufbereitung des Ausgangsmaterials entscheidend zur Gewinnung nativer LDL-Partikel [...]“.

Andererseits sind die hier auftretenden, vermutlich als Degradationsprodukte anzusprechenden anfärbbaren Proteine gegenüber Apolipoprotein B in nur geringen Mengen vorhanden und sollten so auch nur einen begrenzten Einfluß auf Ligandenbindungsexperimente besitzen. Dabei bleibt die Proteinzusammensetzung unter  $N_{2;gas}$  gelagerter LDL-Präparationen sowohl für Human- als auch für Karpfen-LDL über mehrere Wochen konstant und in ihren Bindungseigenschaften unbeeinflusst (Abb. 26; Daten nicht gezeigt).



**Abb. 26:** Elektropherogramm von cLDL (a-d) und hLDL (e-h).

Die Lipoproteine wurden in 1,5 ml SafeLock Eppendorf Reaktionsgefäßen bei 4 ° C unter  $N_{2;gas}$  im Dunkeln gelagert. Am Versuchstag betrug das Alter der Plasmalipoproteine (a) 33 Wochen, (b) 20 Wochen, (c) 13 Wochen, (d) 3 Wochen, (e) 74 Wochen, (f) 66 Wochen, (g) 61 Wochen und (h) 55 Wochen. Die Angaben beziehen sich auf den Tag der Blutentnahme.

Die hier verwendeten Präparationen übertreffen aber die von MENRAD (1988) untersuchten käuflichen LDL-Präparationen verschiedener Firmen insofern bei weitem an Qualität, daß (1) bei einigen käuflichen Präparaten gar kein Apolipoprotein B vorhanden war und (2) nur wenige zusätzliche Proteine detektiert werden können. Dabei ist die Proteinzusammensetzung zumindest für Karpfen-LDL (Abb. 25 b) noch nicht abschließend

geklärt. Die Experimente von FAINARU *et al.* (1988) zeigen zusätzlich zum Human-Apolipoprotein-B-Analogen Proteine (hier: 100 kD - 150 kD), die wie hier in einem ähnlichen Verteilungsbild und Molekulargewichtsbereich liegen, jedoch von Ihnen unkommentiert bleiben.

Es muß aber auch festgestellt werden, daß nach den Angaben von VIRGOLINI *et al.* (1991) die Bindungscharakteristiken von durch sequentielle Ultrazentrifugation oder Immuno-Affinitätschromatographie isolierten LDL-Präparationen nicht unterschiedlich sind. Das hier gewählte Isolationsverfahren sollte demnach die Bestimmung der Bindungsparameter des LDL-Rezeptors nicht beeinflussen.

Die Zusammensetzung der Karpfen- und Human-Lipoproteinklassen kann in Abbildung 25 deutlich voneinander abgegrenzt werden. Dabei weichen die Werte des apparenten Molekulargewichts z.T. erheblich von den Angaben aus der Literatur ab (vgl. DOLPHIN 1985, WODTKE und THUN 1990). Letztendlich sollte aber bei diesen Versuchen nur eine Abschätzung der Kontamination der Fraktionen mit Lipoproteinen angrenzender Dichtebereiche und den Vergleich der Proteinbandenmuster von Human- und Karpfen-Plasmalipoproteinen vorgenommen werden. Die Werte des apparenten Molekulargewichts der Proteinbanden sind deshalb nur für die Auffindung besprochener Proteine angegeben.

### **VLDL**

Karpfen- und Human-VLDL zeigen ein annähernd identisches Muster. Zusätzlich zum prominent gefärbten Apolipoprotein B besitzt Human-VLDL Apolipoprotein E, das bei ~ 70 kD detektiert werden konnte. Vermutlich entspricht das angefärbte Protein der Karpfen-VLDL-Präparation mit einem apparenten Molekulargewicht von ~ 65 kD dem Human-Apolipoprotein E. FAINARU *et al.* (1988) hingegen konnten keine Apolipoprotein-E-Analogen in Karpfen-Lipoproteinpräparationen nachweisen. Statt dessen besitzt deren cVLDL-Präparation die Apolipoproteine A-II und C, die hier nicht gefunden werden konnten.

### **LDL**

Sowohl Karpfen- als auch Human-LDL besitzen ein, vermutlich aufgrund des hohen Gehalts, stark gefärbtes Protein, das als Apolipoprotein B angesprochen werden kann.

Während es als gesichert gelten darf, daß Human-LDL tatsächlich nur ein Apolipoprotein besitzen (vgl. Kap. 1.1) und zusätzlich auftretende Proteinbanden Degradationsprodukte darstellen, kann anhand dieser Experimente nicht entschieden werden, ob die Proteine zwischen 100 kD und 150 kD konstitutive Karpfen-LDL-Proteine sind. Dafür würde sprechen, daß diese Proteine in der Karpfen-VLDL-Präparation nur wenig vertreten sind und deshalb wahrscheinlich eher Verunreinigungen der VLDL-Präparation mit LDL-Partikeln sind. Es wäre allerdings auch denkbar, daß das Apolipoprotein-B-Analogon in cVLDL Proteolyseprozessen weniger stark ausgesetzt ist.

### **HDL**

Karpfen- und Human-HDL besitzen neben schwächer angefärbten Proteinen, die vermutlich von Kontaminationen mit anderen Lipoproteinpartikeln herrühren, nur eine stark angefärbte Proteinbande, die obgleich ihres leicht unterschiedlichen apparenten Molekulargewichts als Apolipoprotein A-I angesprochen werden kann (vgl. FAINARU *et al.* 1988).

Somit konnten alle Apolipoproteine der Karpfen-Plasmalipoproteine Apolipoproteinen der Human-Plasmalipoproteine zugeordnet werden.

### 3.3 Bindung von Human-LDL an isolierte Membranen von Vertretern verschiedener Wirbeltierklassen

#### 3.3.1 Bindung von human LDL an Rinder-Nebennierenrinden-Membranen

Bevor Bindungsexperimente zur Charakterisierung des LDL-Rezeptors beim Karpfen durchgeführt werden konnten, mußten zunächst die methodischen Ansätze etabliert werden. Dazu eignete sich der LDL-Rezeptor des Hausrinds in besonderem Maße, da dieser bereits in mehreren Arbeiten intensiv untersucht worden ist (KOVANEN *et al.* 1979a, KOVANEN *et al.* 1979b, BEISIEGEL 1982, SCHNEIDER *et al.* 1979, SCHNEIDER *et al.* 1982) und aus verschiedenen Gründen für vergleichende Untersuchungen als Bezugspunkt gewählt werden kann.

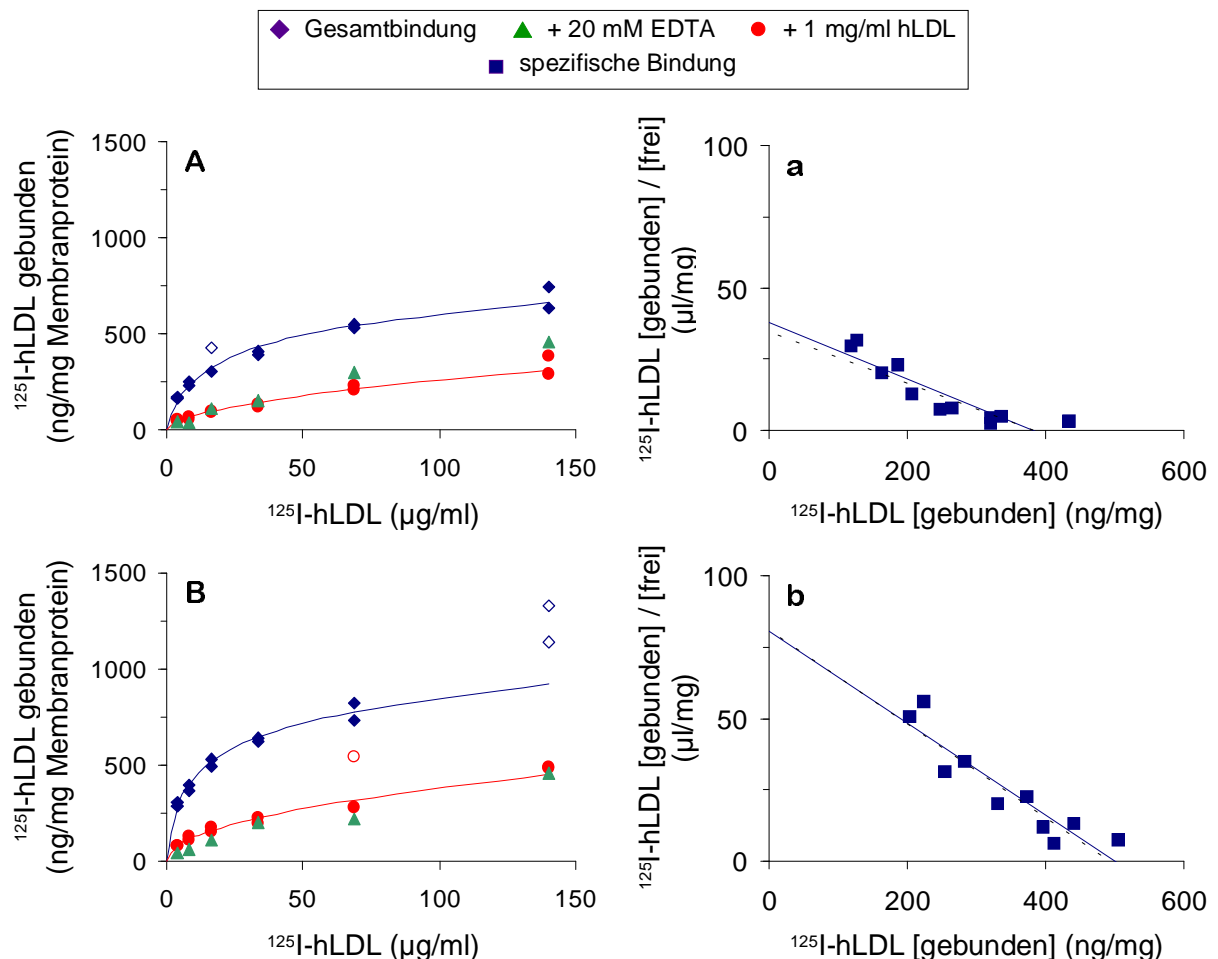


Abb. 27: Bindung von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an isolierte bNNR-Membranpräparationen von 700-100.000 g (A) und 8.000-100.000 g (B).

VT: 4 °C. (A) und (B): Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden. (a), (b): Scatchard Plot von (A) bzw. (B). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Zum einen bestätigen erfolgreich durchgeführte Experimente die Anwendbarkeit der gewählten Methoden (*Qualitätsmerkmal*), zum anderen lassen sich an anderen Spezies durchgeführte Bindungsstudien leichter in den Gesamtkontext der Interaktionen zwischen Plasmalipoproteinen und LDL-Rezeptor einordnen.

Die hier am bovinen LDL-Rezeptor durchgeführten Experimente bestätigen die bereits veröffentlichten Befunde (Abb. 27). Aus Humanplasma gewonnene Plasmalipoproteine geringer Dichte binden mit hoher Spezifität an isolierte Membranen der Rinder-Nebennierenrinde. Dabei besitzen Präparationen von 700 bis 100.000 g eine maximale Bindungskapazität von  $B_{\max} = 382,4 \pm 25,4 \text{ ng } ^{125}\text{I-hLDL} / \text{mg Membranprotein}$  mit einer halbmaximalen Bindung bei  $K_D = 11,1 \pm 2,8 \text{ } \mu\text{g } ^{125}\text{I-hLDL} / \text{ml}$  (vgl. Tab. 19). Membranpräparation von 8.000 bis 100.000 g hingegen weisen einen etwas niedrigeren  $K_D$ -Wert von  $6,1 \pm 1,2 \text{ } \mu\text{g } ^{125}\text{I-hLDL} / \text{ml}$  und einen deutlich höheren  $B_{\max}$ -Wert von  $492,8 \pm 24,5 \text{ ng } ^{125}\text{I-hLDL} / \text{mg Membranprotein}$  auf.

**Tab. 19: Bindungsparameter von  $^{125}\text{I-hLDL}$  an isolierte bNNR-Membranpräparationen von 700-100.000 g und 8.000-100.000 g (vgl. Abb. 27).**

$^{125}\text{I-hLDL}$ - bNNR	700-100.000 g		8.000-100.000 g	
initiale Schätzwerte	$K_D$	11,2	$K_D$	6,1
	$B_{\max}$	389,0	$B_{\max}$	496,5
Bindungsparameter	$K_D$	$11,1 \pm 2,8$	$K_D$	$6,1 \pm 1,2$
	$B_{\max}$	$382,4 \pm 25,4$	$B_{\max}$	$492,8 \pm 24,5$
95% Konfidenzintervalle	4,7	$\leq K_D \leq 17,5$	3,4	$\leq K_D \leq 8,8$
	323,8	$\leq B_{\max} \leq 441,0$	434,9	$\leq B_{\max} \leq 550,7$
nicht-spez. Bindung	$y = 21,234 x^{0,5432} \quad R^2 = 0,97$		$y = 41,68 x^{0,4818} \quad R^2 = 0,98$	
Iterationen	4		3	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>				
Bindungsparameter	$K_D$	10,1	$K_D$	6,2
	$B_{\max}$	382,5	$B_{\max}$	499,8

**Einheiten:**  $K_D$  in [ $\mu\text{g LDL-Protein/ml}$ ],  $B_{\max}$  in [ $\text{ng LDL-Protein/mg Membranprotein}$ ]

Nach Angaben von EVANS und GRAHAM (1991) kann man zeigen, daß der wesentliche Unterschied zwischen Membranpräparationen von 700 - 100.000 g und 8.000 - 100.000 g darin besteht, daß Mitochondrien bei 8.000 g sedimentiert werden und diese Präparationen demnach keine mitochondrialen Membranen enthalten (vgl. Kap. 2.3). Da der LDL-Rezeptor aber in der Plasmamembran bzw. endocytotischen Vesikeln und nicht in Mitochondrien lokalisiert ist, dürfte das mikrosomale Pellet bei 100.000 g nahezu die



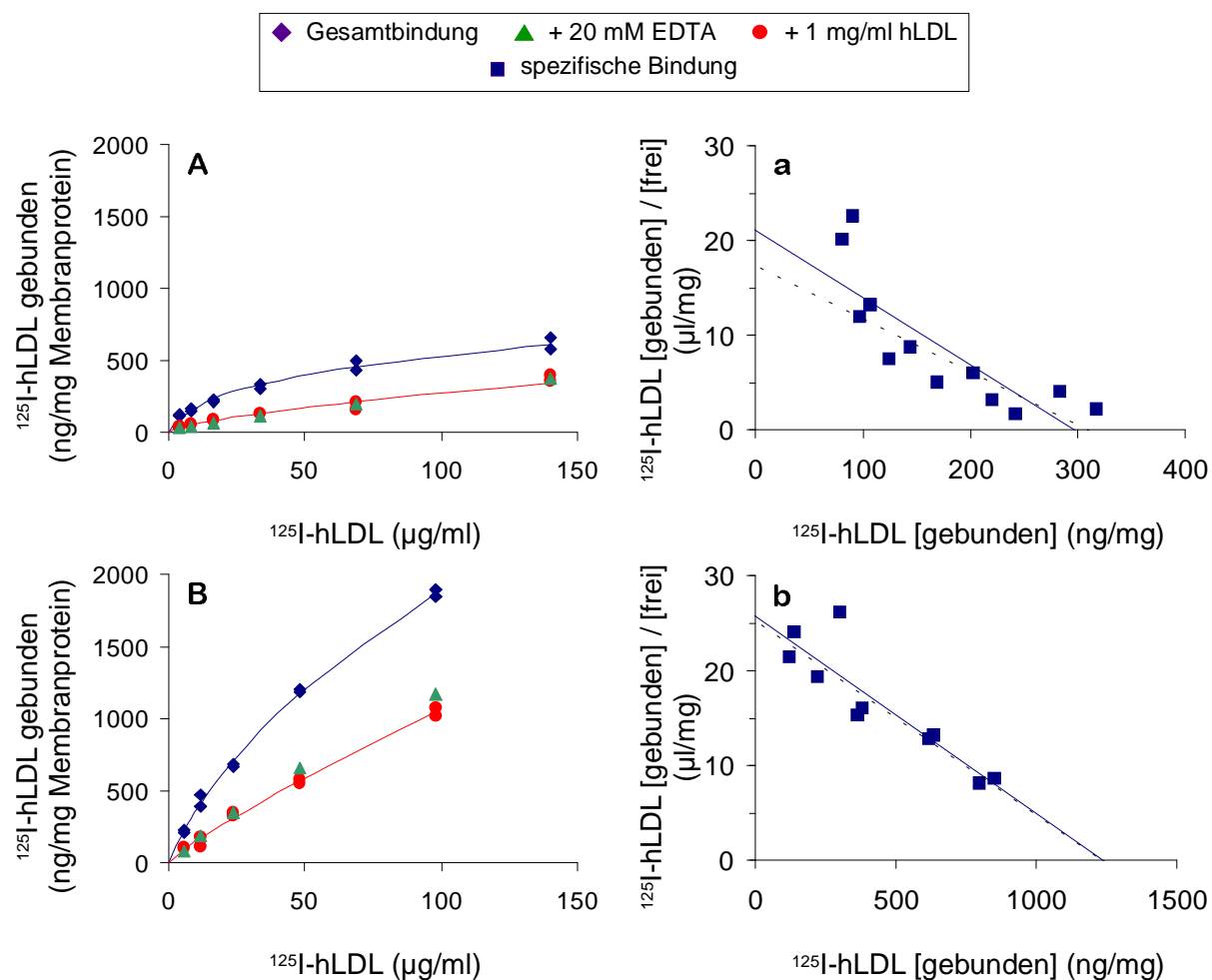
gesamte Rezeptoraktivität enthalten. In späteren Versuchen wurde aufgrund der höheren Trennung von unspezifischer und spezifischer Bindung, d.h. einem höheren  $B_{\max}$ , ausschließlich auf Membranpräparationen von 8.000 - 100.000 g zurückgegriffen, da sich der meßtechnische Fehler bei einem höheren Meßsignal geringer auswirkt als bei einem kleinen Meßsignal.

Desweiteren zeigt Abbildung 27 deutlich, daß die rezeptorvermittelte Bindung der  $^{125}\text{I}$ -hLDL an isolierte NNR-Membranen bei Zugabe von 20 mM EDTA vollständig unterbleibt. Bereits KOVANEN *et al.* (1979b) konnten zeigen, daß bivalente Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  nötig sind, um die Funktionalität des LDL-Rezeptors aufrechtzuerhalten. Neuere Untersuchungen zur Struktur des Rezeptorproteins konzentrieren sich auf einen Abschnitt in Repeat 5, der Calciumbindungseigenschaften aufweisen könnte (BROWN *et al.* 1997, FASS *et al.* 1997).

Angelehnt an die Untersuchungen von KOVANEN *et al.* (1979b) wurde auch die Abhängigkeit der Bindung von der Versuchstemperatur untersucht, die für die Interpretation der LDLR-Bindungsparameter von ektothermen Wirbeltieren bei verschiedenen Anpassungstemperaturen ausschlaggebend sein kann.

Abbildung 28 zeigt, daß bei einer Versuchstemperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  sowohl die Gesamtbindung, als auch die unspezifische Bindung im Vergleich zu einer Versuchstemperatur von  $4^{\circ}\text{C}$  stark erhöht ist.

Die spezifische Bindung erhöht sich dabei sogar um das Vierfache von einem  $B_{\max}$  von 308,6 ng / mg Membranprotein bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf  $B_{\max} = 1236,8$  ng / mg bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Entgegen KOVANENS Versuchen, die mit bovinen  $^{125}\text{I}$ -LDL durchgeführt wurden, unterscheiden sich die Konzentrationen für halbmaximale Bindung bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $37^{\circ}\text{C}$  stark voneinander. Der  $K_D$ -Wert bei  $37^{\circ}\text{C}$  liegt mit  $K_D = 48,9$   $\mu\text{g } ^{125}\text{I}$ -hLDL / ml in Bezug auf den  $K_D$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  von 17,8  $\mu\text{g } ^{125}\text{I}$ -hLDL / ml um den Faktor drei höher (vgl. Tab. 20).



**Abb. 28:** Bindung von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an isolierte bNNR-Membranen bei einer Versuchstemperatur von 4 °C (A) und 37 °C (B).

(A) und (B): bNNR Präparation von 700-100.000 g. Direkter Plot. (a), (b): Scatchard Plot von (A) bzw. (B). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Die hier präsentierten Ergebnisse zur Bindung von human  $^{125}\text{I}$ -LDL an isolierte Membranen der Rinder-Nebennierenrinde lassen sich in die Literaturwerte für den LDL-Rezeptor einordnen. Angaben über eine maximale Bindungskapazität von zunächst 1400 ng / mg Membranprotein (KOVANEN 1979b) konnten in nachfolgenden Experimenten von SCHNEIDER et al. (1980) nicht bestätigt werden. Sie geben einen  $B_{\text{max}}$  von 200 bis 320 ng / mg Membranprotein an (SCHNEIDER *et al.* 1980, SCHNEIDER *et al.* 1982). Nach denselben Angaben liegt der  $K_D$ -Wert bei 20  $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

**Tab. 20: Bindungsparameter von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an isolierte bNNR-Membranen bei einer Versuchstemperatur von 4 °C und 37 °C (vgl. Abb. 28).**

$^{125}\text{I}$ -hLDL - bNNR	4 °C		37 °C	
initiale Schätzwerte	$K_D$	16,6	$K_D$	47,2
	$B_{\max}$	308,9	$B_{\max}$	1220,9
Bindungsparameter	$K_D$	17,8 ± 4,6	$K_D$	48,9 ± 6,7
	$B_{\max}$	308,6 ± 25,3	$B_{\max}$	1236,8 ± 80,6
95% Konfidenzintervalle	7,3	≤ $K_D$ ≤ 28,3	33,1	≤ $K_D$ ≤ 64,7
	251,4	≤ $B_{\max}$ ≤ 365,8	1046,2	≤ $B_{\max}$ ≤ 1427,4
nicht-spez. Bindung	$y = 13,321 x^{0,6547} \quad R^2 = 0,98$		$y = 20,697 x^{0,8553} \quad R^2 = 0,97$	
Iterationen	5		3	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>				
Bindungsparameter	$K_D$	14,1	$K_D$	48,0
	$B_{\max}$	298,3	$B_{\max}$	1236,4

**Einheiten:**  $K_D$  in [ $\mu\text{g}$  LDL-Protein/ml],  $B_{\max}$  in [ $\text{ng}$  LDL-Protein/mg Membranprotein]

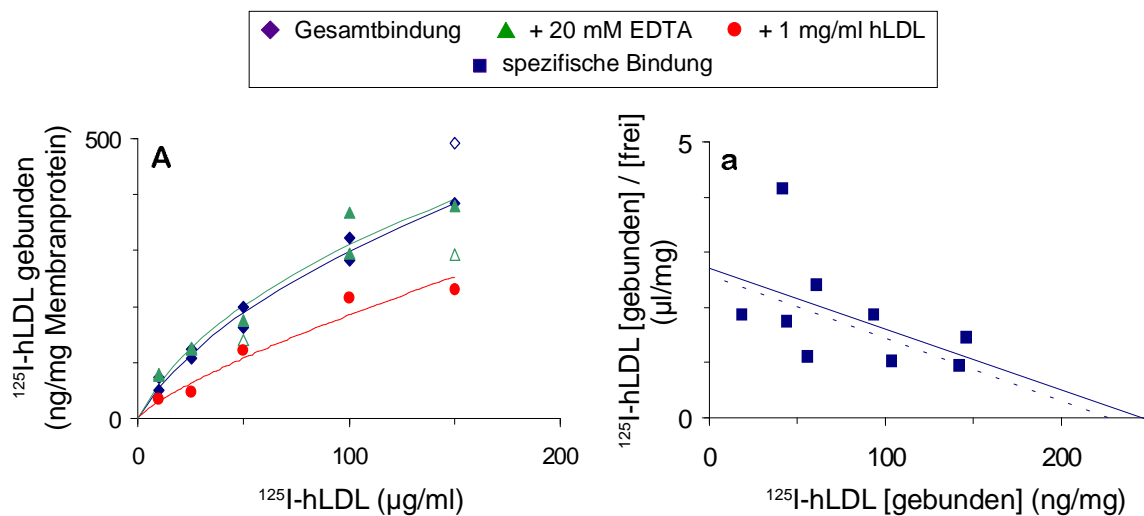
Es kann also gezeigt werden, daß die Methoden zur Bestimmung der Bindungsparameter im Bindungsassay adäquat angewendet wurden und zu in der Literatur vergleichbaren Ergebnissen führen.

### 3.3.2 Bindung von Human-LDL an isolierte Lebermembranen des Menschen

Zur weiteren Absicherung der Methoden und zum Vergleich der Ligandenbindungsfähigkeit in 'heterologen' zu 'homologen' Rezeptor-Liganden-Systemen, der auch für Human- bzw. Karpfen-LDL an Karpfen-Lebermembranen stattfinden sollte (vgl. Kap. 1.3), wurde die Bindung von hLDL an menschlichem Gewebe experimentell erfaßt. Zur Untersuchung der Human-LDL-Rezeptorbindung in der menschlichen Leber wurde metastasenfrees Gewebe eines Patienten mit Lebercarcinom verwendet. Derartiges Gewebe wurde bereits von SOUTAR *et al.* (1986) für *Ligandenblot*-Experimente eingesetzt. Sie konnten zeigen, daß der LDL-Rezeptor in diesen Proben ein dem LDL-Rezeptor aus Fibroblasten ähnliches apparentes Molekulargewicht von 132.000 kD besitzt und die Ligandenbindung in Anwesenheit von EDTA unterbleibt.

Nach Untersuchungen von HOEG *et al.* (1986) unterscheidet sich der LDL-Rezeptor der Leber jedoch sowohl in seinem apparenten Molekulargewicht von ~ 300.000 kD als auch in seiner EDTA-Sensitivität erheblich vom Fibroblasten-LDL-Rezeptor. Dabei konnte EDTA die Bindungskapazität des LDL-Rezeptors nur teilweise herabsetzen.

Abbildung 29 beschreibt die Bindungskurven für ein Bindungsexperiment von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an human Lebermembranpräparationen von 8.000 - 100.000 g.



**Abb. 29:** Bindung von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an isolierte Lebermembranen des Menschen.

(A) Membranpräparation von 8.000 bis 100.000 g. VT: 4 ° C. Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden. (a): Scatchard Plot von (A). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Bei der hier verwendeten Autopsieprobe kann eine LDL-Rezeptoraktivität mit einem  $K_D$  von  $87,9 \pm 45,3 \mu\text{g } ^{125}\text{I}\text{-hLDL} / \text{ml}$  und einem  $B_{\text{max}}$  von  $227,2 \pm 60,7 \text{ ng } ^{125}\text{I}\text{-hLDL} / \text{mg}$  Membranprotein nachgewiesen werden (siehe Tab. 21). Aus den Angaben der Untersuchung von SOUTAR *et al.* (1986) kann errechnet werden, daß die maximale Bindungskapazität von Human-LDL an Lebermembranen zehn unterschiedlicher Carcinom-Patienten ungefähr zwischen 63 und 175 ng LDL-Protein / mg Membranprotein, also durchaus in einem vergleichbaren Bereich liegt.

Besondere Aufmerksamkeit verdient aber die Tatsache, daß EDTA zumindest in dieser Probe keinen Einfluß auf die Rezeptoraktivität besitzt - die Kurven der Gesamtbindung und der Bindung in Anwesenheit von 20 mM EDTA sind nicht signifikant voneinander verschieden.

**Tab. 21: Bindungsparameter von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an isolierte Lebermembranen des Menschen (vgl. Abb. 29).**

$^{125}\text{I}$ -hLDL - hLM	Gesamtbindung		+ 20 mM EDTA	
initiale Schätzwerte	$K_D$	69,5	$K_D$	57,6
	$B_{\max}$	209,7	$B_{\max}$	218,0
Bindungsparameter	$K_D$	87,9 ± 45,3	$K_D$	61,6 ± 36,9
	$B_{\max}$	227,2 ± 60,7	$B_{\max}$	213,2 ± 53,5
95% Konfidenzintervalle	0 ≤ $K_D$ ≤ 198,8		0 ≤ $K_D$ ≤ 156,5	
	78,672 ≤ $B_{\max}$ ≤ 375,7		75,7 ≤ $B_{\max}$ ≤ 350,7	
nicht-spez. Bindung	$y = 5,6085x^{0,7512}$ $R^2 = 0,9592$		$y = 5,6085x^{0,7512}$ $R^2 = 0,9592$	
Iterationen	5		6	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>				
Bindungsparameter	$K_D$	90,6	$K_D$	49,3
	$B_{\max}$	245,8	$B_{\max}$	208,5

**Einheiten:**  $K_D$  in [ $\mu\text{g}$  LDL-Protein/ml],  $B_{\max}$  in [ $\text{ng}$  LDL-Protein/mg Membranprotein]

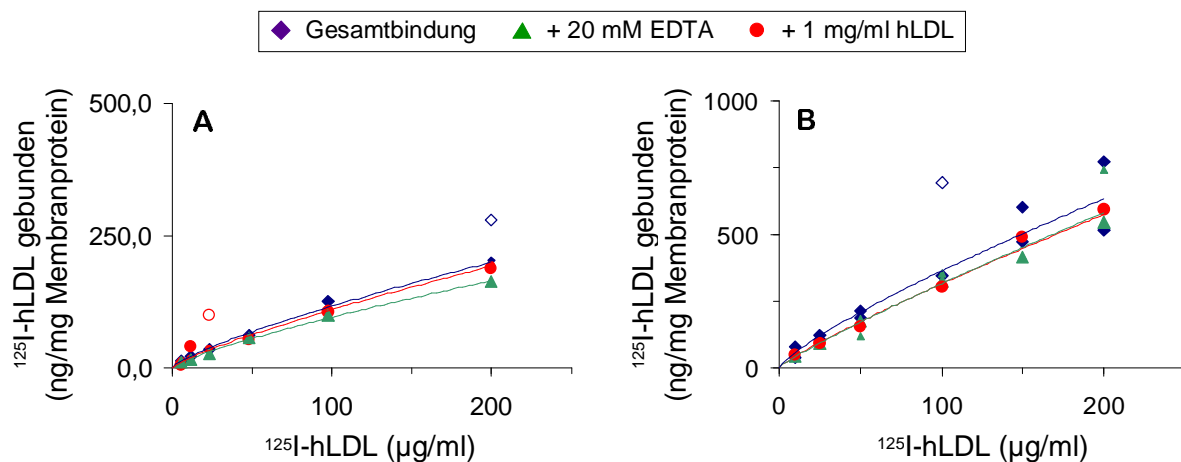
Aus diesem Ergebnis allein kann jedoch nicht allgemein abgeleitet werden, daß der menschliche LDL-Rezeptor human LDL auch ohne die Anwesenheit zweiwertiger Kationen zu binden vermag (vgl. BROWN *et al.* 1997). Daß die Bindungsfähigkeit des LDL-Rezeptors durch EDTA auf das Niveau der nicht-spezifischen Bindung fällt, ist nach den Angaben von HOEG *et al.* (1986) dabei nicht zwingend notwendig (vgl. auch FAINARU *et al.* 1988). Inwiefern die vorliegenden Ergebnisse im Zusammenhang mit dem pathologischen Befund zu interpretieren sind, kann nicht abgeschätzt werden, da weder die genetische Disposition des Patienten bekannt war (LDLR-Mutante?), noch Einfluß auf die Behandlung des Gewebes direkt nach der Entnahme genommen werden konnte (Proteasehemmstoffe, Lagerung, etc.).

### 3.3.3 Bindung von Human-LDL an aus Fischen isolierte Membranen

Nachdem die Methodik zur Messung von Rezeptorbindungscharakteristika etabliert worden war und zu Literaturangaben vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten, sollten zunächst die Befunde von FAINARU *et al.* (1989) verifiziert werden.

FAINARU *et al.* (1989) konnten eine hohe spezifische und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung von human LDL an isolierten Membranen aus Karpfenleber nachweisen. Der methodische Vorteil bei der Verwendung von Human- gegenüber Karpfen-Plasmalipoproteinen liegt in

der leichten Verfügbarkeit. Dieser Umstand sollte genutzt werden, sobald eine spezifische Bindung von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an Karpfen-Lebermembranen nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 30:** Bindung von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an isolierte Lebermembranen von Karpfen (A) und Forelle (B).

(A) Membranpräparation von 8.000 bis 100.000 g und (B) Membranpräparation von 8.000 bis 100.000 g. (A) und (B) VT: 4 °C. Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden.

Entgegen den Erwartungen konnte jedoch in mehreren Versuchen eine spezifische Bindung von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an isolierte Lebermembranen des Karpfen nicht nachgewiesen werden. Um diesen Befund zu überprüfen wurden zusätzlich Lebermembranen der Forelle präpariert und auf ihre Bindungsfähigkeit von  $^{125}\text{I}$ -hLDL getestet. Auch hier konnte eine spezifische Bindung nicht nachgewiesen werden: die Bindung der  $^{125}\text{I}$ -markierten Human-LDL erfolgte an Membranen von Karpfen und Forelle ausschließlich unspezifisch (Abb. 30).

Nach diesen vorläufigen Befunden mußte also die Vorstellung angezweifelt werden, daß das LDL-LDLR-System der Wirbeltiere funktionell soweit konserviert ist, daß LDL an artfremde LDL-Rezeptoren innerhalb der Wirbeltiere binden können (vgl. LOBEMEIER und WODTKE 1999). Zunächst sollte jedoch der LDL-Rezeptor des Karpfen mit cLDL charakterisiert und erst im Anschluß daran die Fähigkeit des LDL-Rezeptors artfremde LDL zu binden untersucht werden.

### 3.4 Bindung von Karpfen-LDL an isolierte Membranen von Vertretern verschiedener Wirbeltierklassen

#### 3.4.1 Bindung von Karpfen-LDL an isolierte Membranen des Karpfen

##### 3.4.1.1 Der Einfluß der Fütterung der Versuchstiere auf Bindungsparameter des LDL-Rezeptors

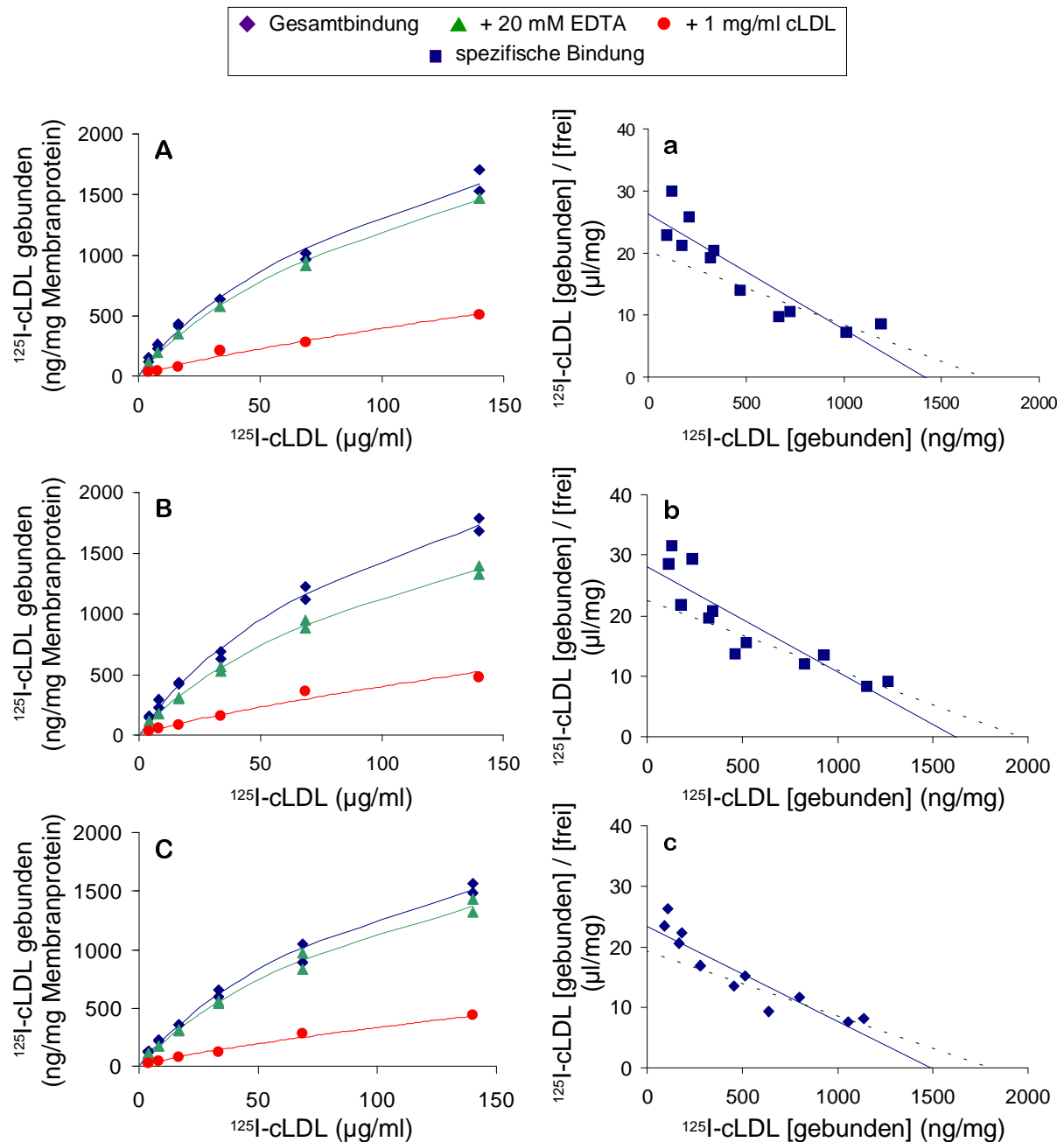
Nachdem eine spezifische Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an isolierte Membranen der Karpfenleber in Vorversuchen nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt), wurde zunächst der Einfluß der Fütterungsmenge auf die Rezeptordichte und Rezeptoraktivität untersucht.

Verschiedene Faktoren, die die LDLR-Dichte beeinflussen können sind untersucht worden. Neben dem bereits vorgestellten Rückkopplungsmechanismus durch Cholesterol (vgl. Kap. 1.2), konnte auch ein direkter Einfluß von Hormonen und von der Tageszeit nachgewiesen werden (DI CROCE *et al.* 1997, BALASUBRAMANIAM *et al.* 1994).

TEICHERT (1988) diskutiert den Einfluß des Cholesterolgehalts und der Fettsäurezusammensetzung der von ihm an Karpfen verfütterten Diäten auf die HMG-CoA-Reduktase und die ACAT der Karpfenleber. Dabei konnte im Gegensatz zu Untersuchungen an Säugetieren (zusammengefaßt in TEICHERT 1988) keine unterschiedliche Wirkung der Diäten auf die Aktivität der untersuchten Enzyme festgestellt werden.

Da die Regulation der HMG-CoA-Reduktase, der ACAT und des LDL-Rezeptors zumindest bei Säugern aber prinzipiell durch einen gemeinsamen Auslöser erfolgt (nämlich Cholesterol), liegt die Vermutung nahe, daß bei gleichbleibender Aktivität der ACAT und der HMG-CoA-Reduktase auch die absolute Menge an LDL-Rezeptoren (i.e.  $B_{\max}$ ) zumindest in der Leber von der Diät unbeeinflusst bleibt.

Zur näheren Untersuchung wurden Karpfen 14 Tage lang täglich zur selben Zeit ( $9^{00}$  Uhr  $\pm$  30 min) mit Futtermengen von jeweils 0,5 %, 1,0 % oder 2,0 % ihres Körpergewichts gefüttert. Die Präparation der isolierten Lebermembranen erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zwischen  $8^{00}$  und  $10^{00}$  Uhr. Durch die Einhaltung dieser Zeiten sollte ein eventueller Einfluß der Tageszeit auf die LDL-Rezeptordichte (s.o.) möglichst gering gehalten werden.



**Abb. 31: Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an isolierte Lebermembranen unterschiedlich gefütterter Karpfen.**

Es wurden jeweils drei Tiere (AT 22) zusammen präpariert, die vorher 14 Wochen lang täglich mit Futtermengen von (A) 0,5 % bzw. (B) 1,0 % und (C) 2,0 % ihres Körpergewichts gefüttert worden waren. Membranpräparation von 700 bis 100.000 g. VT: 4 °C. (a), (b) und (c): Scatchard Plot von (A),(B) bzw. (C). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Um einen direkten Vergleich der Gruppen zu gewährleisten, sollten die Bindungsversuche mit nur einer Ligandenpräparation durchgeführt werden. Aufgrund der begrenzten Ligandenausbeute wurden deshalb, um den Materialverbrauch einzuschränken, notwendigerweise jeweils drei Tiere gemeinsam präpariert (vgl. Kap. 2.1). Die



Bindungskurven der Gesamtbindung, der nicht-spezifischen Bindung und der Bindung in Anwesenheit von EDTA sind in Abbildung 31 dargestellt.

**Tab. 22: Bindungsparameter von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an isolierte Lebermembranen unterschiedlich gefütterter Karpfen (vgl. Abb. 31).**

Die Gruppeneinteilung entspricht den Angaben aus Abbildung 31.

Tägliche Fütterung bei Futtermengen von (A) 0,5 %, (B) 1,0 % und (C) 2,0 % des Körpergewichts (KG).

$^{125}\text{I}$ -cLDL - cLM		(A) 0,5 % KG		(B) 1,0 % KG	
initiale Schätzwerte	$K_D$	80,0		$K_D$	82,8
	$B_{\max}$	1687,2		$B_{\max}$	1921,4
Bindungsparameter	$K_D$	84,9 ± 20,8		$K_D$	87,3 ± 14,2
	$B_{\max}$	1717,9 ± 209		$B_{\max}$	1960,5 ± 164
95% Konfidenzintervalle		36,9 ≤ $K_D$ ≤ 132,9		55,2 ≤ $K_D$ ≤ 119,4	
		1236,0 ≤ $B_{\max}$ ≤ 2199,9		1589,5 ≤ $B_{\max}$ ≤ 2331,5	
nicht-spez. Bindung		$y = 9,7034 x^{0,8038}$	$R^2 = 0,972$	$y = 10,553 x^{0,7899}$	$R^2 = 0,986$
Iterationen		6		4	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>					
Bindungsparameter	$K_D$	53,8		$K_D$	57,7
	$B_{\max}$	1412,2		$B_{\max}$	1614,3

$^{125}\text{I}$ -cLDL - cLM		(C) 2,0 % KG	
initiale Schätzwerte	$K_D$	90,37	
	$B_{\max}$	1779,4	
Bindungsparameter	$K_D$	93,6 ± 16,5	
	$B_{\max}$	1799,8 ± 168	
95% Konfidenzintervalle		56,3 ≤ $K_D$ ≤ 130,9	
		1419,8 ≤ $B_{\max}$ ≤ 2179,8	
nicht-spez. Bindung		$y = 9,4859 x^{0,7724}$	$R^2 = 0,991$
Iterationen		4	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>			
Bindungsparameter	$K_D$	63,6	
	$B_{\max}$	1491,5	

**Einheiten:**  $K_D$  in [ $\mu\text{g}$  LDL-Protein/ml],  
 $B_{\max}$  in [ng LDL-Protein/mg Membranprotein]

Die Abbildungen 31 A, B und C zeigen eine deutliche rezeptorvermittelte Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an isolierte Membranen der Karpfenleber. Dabei ist besonders auffällig, daß die Gesamtbindung der Lipoproteine in Anwesenheit von 20 mM EDTA nahezu vollständig erhalten bleibt. Die Bindungsparameter der spezifischen Bindung unter Standardbedingungen und in Anwesenheit von EDTA zeigen für den Kurvenverlauf in Abbildung 31

A und C keine signifikanten Unterschiede. In Abbildung 31 B jedoch ist der Wert für  $B_{max}$  unter Standardbedingungen von der Ligandenbindung in Anwesenheit von EDTA signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ). Bei einer wiederholten Durchführung des Versuchs konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (nicht gezeigt).

Dieser Befund, zusammen mit dem Ergebnis aus Abbildung 36 lassen darauf schließen, daß die Bindung von cLDL an den cLDLR zu einem erheblichen Teil  $Ca^{2+}$ -unabhängig erfolgt.

Desweiteren sind auch die Bindungsparameter zwischen den einzelnen Fütterungsgruppen nicht signifikant voneinander verschieden, so daß darauf geschlossen werden kann, daß sowohl die Rezeptordichte als auch die Rezeptoraktivität des LDLR in der Karpfenleber nicht durch die Fütterungsmenge beeinflußt wird.

Vergleicht man in diesem Zusammenhang die anatomischen Parameter von Gewicht und Länge der Versuchstiere zwischen den Fütterungsgruppen, stellt man fest, daß zumindest die Fütterungsgruppe von 0,5 % KG signifikant verschieden von Fischen ist, die bei 1,0 % und 2,0 % KG gefüttert wurden (Tab. 23). Der Lebersomatische Index, als Maß für die physiologische Aktivität, der Leber der Versuchsgruppen jedoch ist nicht signifikant voneinander verschieden.

**Tab. 23: Der Lebersomatische Index in Abhängigkeit von der täglichen Futtergabe.**

Futter <sup>†</sup> (% KG)	AT (°C)	Gewicht (g)	Länge (cm)	Lebersomatischer Index <sup>‡</sup>	Gonadosomatischer Index <sup>§</sup>
0,5	22	956,7 ± 55,8 <sup>a</sup>	35,33 ± 1,53 <sup>b</sup>	1,51 ± 0,099	15,29 ± 3,26 (w) 7,55 (m)
1,0	22	1066,3 ± 81,9	40,00 ± 1,00	1,899 ± 0,235	12,05 ± 2,01 (w) 9,01 (m)
2,0	22	1171,8 ± 76,9	39,67 ± 1,16	2,059 ± 0,267	13,56 ± 1,04 (w) 9,36 (m)

<sup>†</sup>Die Angabe bezieht sich auf die tägliche Futtergabe in % des Körpergewichts (KG).

<sup>‡</sup>Der Lebersomatische Index (LSI) berechnet sich nach  $LSI (\%) = \text{Lebergewicht} \cdot 100 / \text{Körpergewicht}$ .

<sup>§</sup>Der Gonadosomatische Index (GSI) berechnet sich nach  $GSI (\%) = \text{Gonadengewicht} \cdot 100 / \text{Körpergewicht}$ .

<sup>a</sup> signifikant verschieden von 2 % KG gefütterten Tieren ( $p < 0,02$ ).

<sup>b</sup> signifikant verschieden von 1 % und 2 % KG gefütterten Tieren ( $p < 0,05$ ).

m: männlich, w: weiblich

Dieser Befund bekräftigt das Ergebnis aus den Bindungsversuchen, da auch auf der anatomischen Ebene keine Veränderungen durch unterschiedliche Futtergaben festgestellt

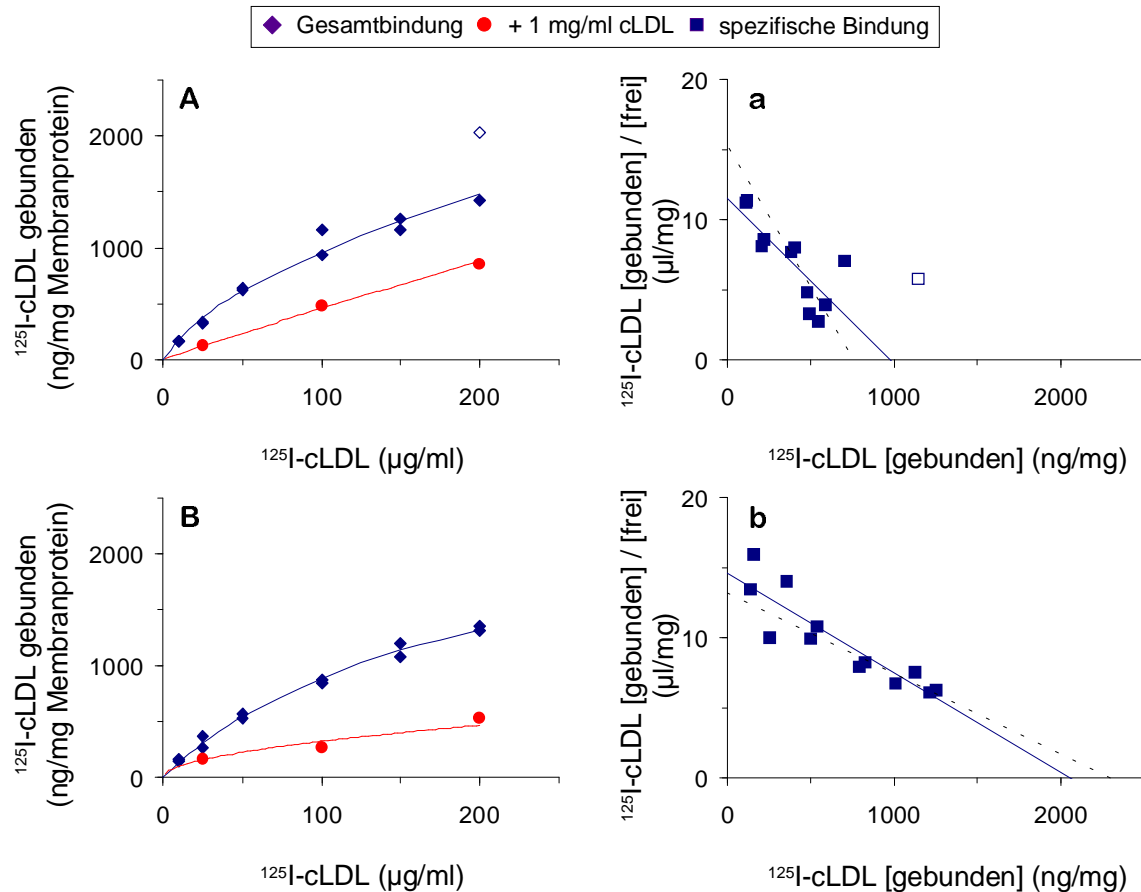
werden konnten, die auf eine veränderte physiologische Aktivität der Leber schließen lassen würden. Damit lassen sich die hier erhobenen Daten in die Ergebnisse TEICHERTS (1988) einordnen.

Ein Vergleich zu den von FAINARU *et al.* (1988) ermittelten Bindungsparametern von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an cLM kann nur abschätzend aus den Graphiken vorgenommen werden, da sich dort nur eine Angabe zum  $K_D$ -Wert findet. Dieser Wert ist allerdings als molare Konzentration ausgedrückt, ohne daß eine Angabe zur Berechnung beigefügt ist oder sich eine nachvollziehbare Grundlage für diesen Wert rechnerisch ermitteln lassen würde. Der aus der Graphik ermittelte Wert für  $K_D$  liegt bei ca.  $100 \mu\text{g} / \text{ml}$  mit einem  $B_{\text{max}}$  von ca.  $2500 \text{ ng} / \text{mg}$  Membranprotein, also durchaus in einem ähnlichen Bereich wie die hier für  $^{125}\text{I}$ -cLDL gefundenen Daten. Bemerkenswert ist auch hier wiederum, daß selbst eine Konzentration von  $30 \text{ mM}$  EDTA die LDL-Bindung nicht vollständig auf das Niveau einer nicht-spezifischen Bindung senken kann.

Aus Tabelle 41 kann abgeschätzt werden, daß die LDL-Konzentration im Plasma von ungefähr  $200 \mu\text{g}$  LDL-Protein / ml deutlich über dem Wert für die halbmaximale Bindung von  $80$  bis  $90 \mu\text{g} / \text{ml}$  liegt und vermutlich damit nahezu alle LDL-Rezeptoren unter *in vivo* - Bedingungen gesättigt sind. Für eine weitergehende Interpretation dieses Befundes, müssten in anderen Untersuchungen Versuche zur Internalisierung und zur turnover-Rate des Rezeptors in Zellkultur-Experimenten durchgeführt werden.

### 3.4.1.2 Der Einfluß der Membranpräparation auf Bindungsparameter des LDL-Rezeptors

Die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an Karpfenleber-Membranpräparationen von 700 -100.000 g bzw. 8.000 - 100.000 g ist in Abbildung 32 dargestellt.



**Abb. 32:** Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an cLM-Membranpräparationen von 700-100.000 g (A) und 8.000-100.000 g (B).

VT: 4 ° C. (A) und (B): Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden. (a), (b): Scatchard Plot von (A) bzw. (B). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Es zeigt sich, daß die Mitochondrien-freie Präparation (8.000 - 100.000 g) eine ungefähr dreifach höhere Bindungskapazität für  $^{125}\text{I}$ -cLDL besitzt. Wie bereits diskutiert wurde, ist der relative Rezeptorproteingehalt in Membranfraktionen von 700 - 100.000 g aufgrund der darin enthaltenen, rezeptorfreen Mitochondrienmembranen geringer (Tab. 24; vgl. Kap. 3.3.1).

Dieser Unterschied um den Faktor drei gilt auch für den  $K_D$ -Wert beider Präparationen. Vermutlich ist diese Differenz aber auf methodische Fehler zurückzuführen, die sich z.B. bei der 8.000 - 100.000 g Präparation in der etwas schlechteren Anpassung der Bindungskurve für die nicht-spezifische Bindung äußert (Tab. 24; vgl. Kap. 2.12.4).

**Tab. 24: Bindungsparameter von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an cLM-Membranpräparationen von 700-100.000 g und 8.000-100.000 g (vgl. Abb. 32).**

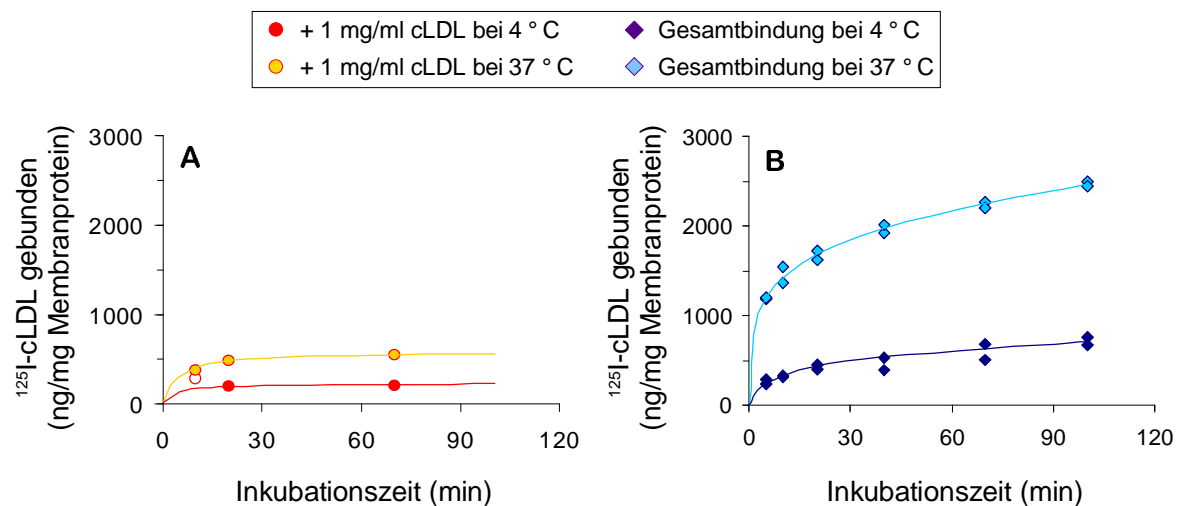
$^{125}\text{I}$ -cLDL - cLM	700 - 100.000 g		8.000 - 100.000 g	
initiale Schätzwerte	$K_D$	49,38	$K_D$	168,67
	$B_{\max}$	773,84	$B_{\max}$	2260,02
Bindungsparameter	$K_D$	49,7 ± 19,1	$K_D$	174,3 ± 26,2
	$B_{\max}$	754,6 ± 106	$B_{\max}$	2295,4 ± 195
95% Konfidenzintervalle	5,7 ≤ $K_D$ ≤ 93,8		115,0 ≤ $K_D$ ≤ 233,6	
	510,2 ≤ $B_{\max}$ ≤ 999,0		1854,3 ≤ $B_{\max}$ ≤ 2736,5	
nicht-spez. Bindung	$y = 5,576 x^{0,956}$ $R^2 = 0,9982$		$y = 1,0128 x^{0,8524}$ $R^2 = 0,9083$	
Iterationen	5		3	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>				
Bindungsparameter	$K_D$	84,9	$K_D$	140,9
	$B_{\max}$	974,0	$B_{\max}$	2050,2

**Einheiten:**  $K_D$  in [ $\mu\text{g}$  LDL-Protein/ml],  $B_{\max}$  in [ $\text{ng}$  LDL-Protein/mg Membranprotein]

Aufgrund dieser Befunde kann davon ausgegangen werden, daß die Verteilung des LDL-Rezeptormoleküls in Leberzellen des Karpfen prinzipiell der Verteilung des LDLR in Zellen von Säugern gleicht. Der deutlich höhere Quotient von  $B_{\max; 8.000-100.000 \text{ g}}$  zu  $B_{\max; 700-100.000 \text{ g}}$  von ungefähr drei bei Karpfen-Lebermembranen zu ungefähr 1,3 bei Zellen der Rinder-Nebennierenrinde hängt vermutlich mit der Art des Gewebes und der daraus resultierenden Proteinzusammensetzung zusammen.

### 3.4.1.3 Der Einfluß der Versuchstemperatur auf Bindungsparameter des LDL-Rezeptors

Angelehnt an die Versuche von KOVANEN *et al.* (1979b) wurde auch die Abhängigkeit der Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an cLM von der Versuchstemperatur untersucht.



**Abb. 33:** Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an Lebermembranen des Karpfen bei 4 °C und 37 °C in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

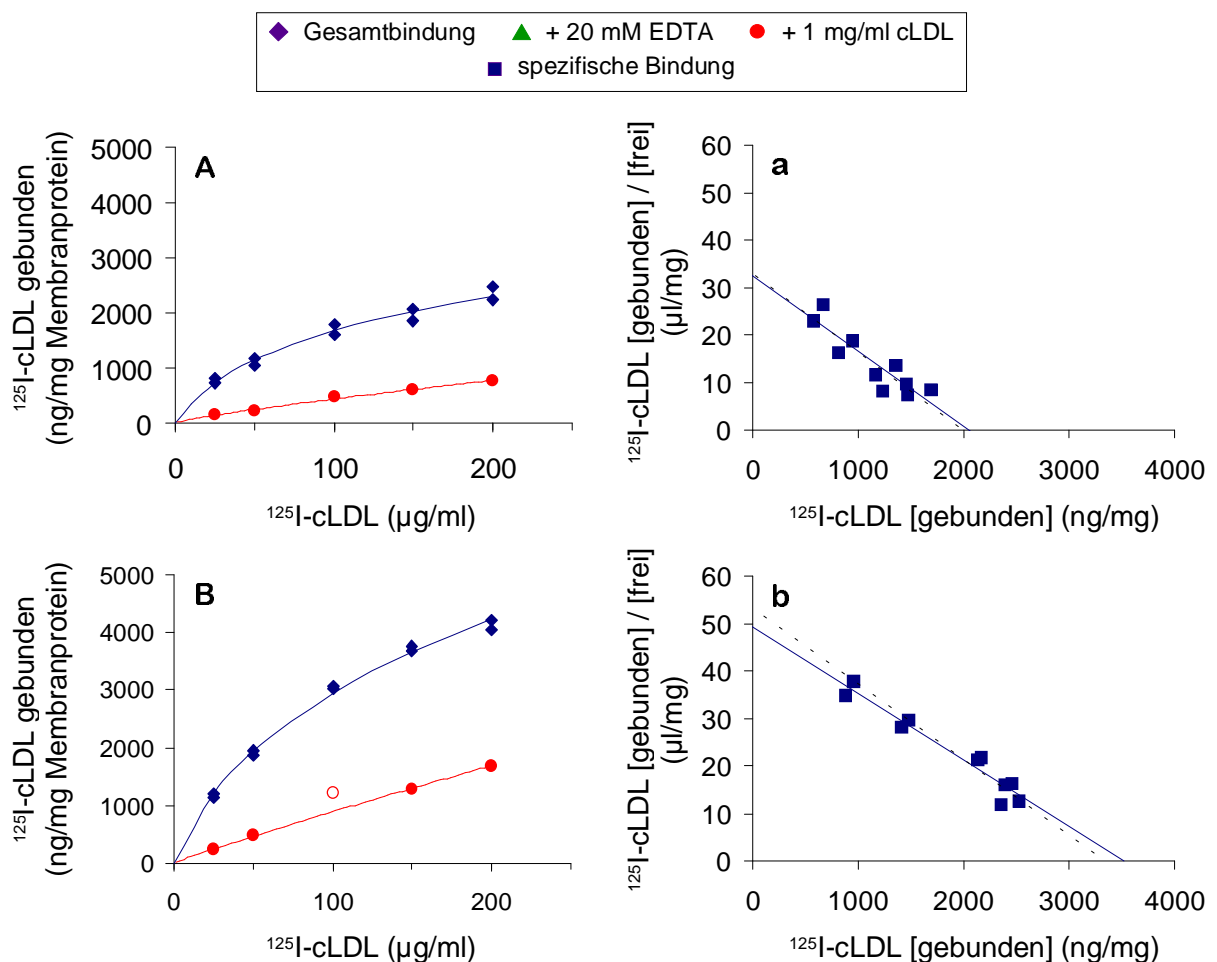
$^{125}\text{I}$ -cLDL: 70  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (A) Nicht-spezifische Bindung. Direkter Plot. (B) Gesamtbindung. Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden.

Diese Fragestellung gewinnt bei ektothermen Wirbeltieren an besonderer Bedeutung, wenn das LDL-Bindungsvermögen in Abhängigkeit von der Anpassungstemperatur untersucht werden soll (vgl. Abb. 38). Als Vergleichstemperaturen wurden dafür eine Versuchstemperatur von 4 °C und von 37 °C gewählt. Zunächst mußte dafür aber der Zeitbedarf für eine maximale Ligandenbindung für beide Temperaturen ermittelt werden.

Abbildung 33 zeigt, daß der Zeitbedarf der  $^{125}\text{I}$ -cLDL-Bindung für die nicht-spezifische Bindung geringer ist als für die spezifische Bindung: während sich die nicht-spezifische Bindung bereits bei 60 min einem Maximum nähert, ist eine Bindung der Liganden selbst nach 100 min noch nicht vollständig erreicht.

Da sich die zeitabhängige Bindungskurve beider Versuchstemperaturen aber bereits nahe dem Sättigungsbereich befindet, wurde es als hinreichend genau erachtet die Bestimmung der Bindungsparameter nach einer Inkubationszeit von 120 min vorzunehmen. Dabei beträgt

die Bindungssteigerung von 75 auf 100 min für beide Versuchstemperaturen ca. 10%, so daß der meßtechnische Fehler auch bei 120 min für beide Ansätze gleich groß sein sollte. Die Zeit, bei der eine halbmaximale Bindung erreicht wurde, konnte durch graphische Extrapolation für beide Versuchstemperaturen mit je ca. 12 min ermittelt werden. Dieser Wert ist damit etwas höher als der von KOVANEN *et al.* (1979) gefundene Wert von ~ 8 min für die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an bNNR bei einer Versuchstemperatur von 0 °C. Der mögliche zeitliche Einfluß einer 30-minütigen Vorinkubation mit nicht-markierten LDL auf die Bindung  $^{125}\text{I}$ -gekoppelter LDL kann, wie Abbildung 33 A zeigt, bereits nach 60 min Inkubationszeit mit markierten LDL als äußerst gering eingestuft werden (vgl. Kap. 2.12).



**Abb. 34:** Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an isolierte Lebermembranen des Karpfen bei einer Versuchstemperatur von 4 °C (A) und 37 °C (B).

(A) und (B): Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden. (a), (b): Scatchard Plot von (A) bzw. (B). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Die Bindungskurven für  $^{125}\text{I}$ -cLDL an cLM bei Versuchstemperaturen von  $4^\circ\text{C}$  und  $37^\circ\text{C}$  sind in Abbildung 34 dargestellt. Entsprechend den Beobachtungen von KOVANEN *et al.* (1979b) an  $^{125}\text{I}$ -hLDL und bNNR wird auch hier durch Erhöhung der Versuchstemperatur die maximale Ligandenbindungsfähigkeit erhöht. Der für das Karpfen-Karpfen-System gefundene Wert für eine Steigerung von  $f = 1,7$  liegt nahe bei der Angabe von  $f = 2$  für das Human-Rind-System. Zieht man die berechneten Konfidenzintervalle mit in Betracht, liegt die Bindungssteigerung zwischen 1,3 und 2,2. Der  $K_D$ -Wert bleibt von der Versuchstemperatur unbeeinflusst (Tab. 25).

**Tab. 25: Bindungsparameter von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an isolierte Lebermembranen des Karpfen bei einer Versuchstemperatur von  $4^\circ\text{C}$  und  $37^\circ\text{C}$  (vgl. Abb. 34).**

$^{125}\text{I}$ -cLDL - cLM		$4^\circ\text{C}$		$37^\circ\text{C}$	
initiale Schätzwerte	$K_D$	60,6		$K_D$	62,7
	$B_{\max}$	2006,1		$B_{\max}$	3344,5
Bindungsparameter	$K_D$	60,6 $\pm$ 11,5		$K_D$	62,7 $\pm$ 7,8
	$B_{\max}$	1992,6 $\pm$ 141		$B_{\max}$	3337,7 $\pm$ 152
95% Konfidenzintervalle		34,6	$\leq K_D \leq$ 86,6	44,4	$\leq K_D \leq$ 81,1
		1673,6	$\leq B_{\max} \leq$ 2311,6	2978,3	$\leq B_{\max} \leq$ 3697,1
nicht-spez. Bindung		$y = 8,8905 x^{0,8427}$ $R^2 = 0,993$		$y = 12,87 x^{0,9208}$ $R^2 = 0,999$	
Iterationen		2		1	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>					
Bindungsparameter	$K_D$	62,6		$K_D$	71,3
	$B_{\max}$	2036,0		$B_{\max}$	3513,4

**Einheiten:**  $K_D$  in [ $\mu\text{g}$  LDL-Protein/ml],  $B_{\max}$  in [ $\text{ng}$  LDL-Protein/mg Membranprotein]

Eine Erklärung für das Phänomen der höheren maximalen Bindungskapazität bei höheren Temperaturen findet sich, vermutlich aufgrund fehlender Kenntnis über die molekulare Struktur des membrangebundenen Rezeptors, nicht in der Literatur. Die Experimente bei VT  $4^\circ\text{C}$  und VT  $37^\circ\text{C}$  zeichnen sich dadurch aus, daß die zur maximalen Bindung benötigte Zeit und der  $K_D$ -Wert identisch sind. Die vermehrte Ligandenbindung kann also nicht durch eine temperaturbedingte erhöhte Molekularbewegung des Liganden (*identischer Zeitbedarf*) oder eine erhöhte Rezeptoraktivität (*identischer  $K_D$* ) erklärt werden. Vielmehr scheint es so, daß mehr Rezeptoren zur Bindung zur Verfügung stehen. Dabei könnte eine durch Temperaturerhöhung bedingte Fluiditätserhöhung der Membranen dazu führen, daß nicht-Clathrinassoziierte membrangebundene Rezeptoren vermehrt in *coated pits* aufgenommen werden und dort ihre Bindungskompetenz erwerben.

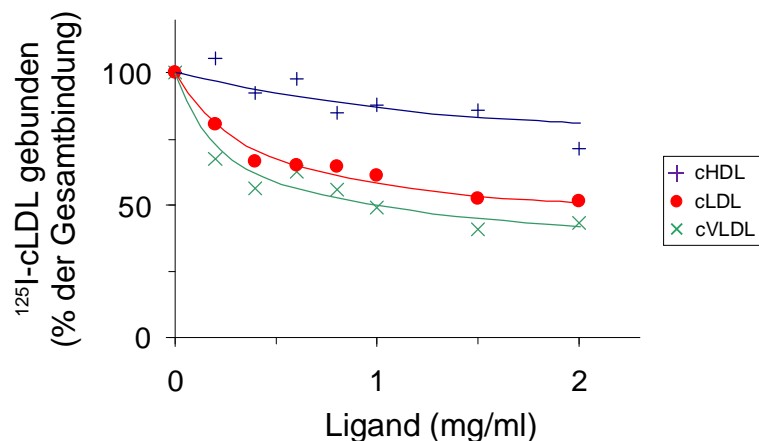


Nach den Angaben von GOLDSTEIN *et al.* (1979) befinden sich zwischen 50 und 80 % aller LDL-Rezeptormoleküle in coated pits. Damit besteht prinzipiell die Möglichkeit, daß - sollten höhere Temperatur zu einer vermehrten Bindung der LDL-Rezeptoren in den coated pits führen - die maximale Bindungsfähigkeit um den Faktor 1,25 bis 2 erhöht wird. Der hier gefundene Faktor zwischen 1,3 und 2,2 würde sich in diese Überlegung gut eingliedern lassen. Untersuchungen zum temperaturabhängigen Verhältnis von membrangebunden, nicht-Clathrinassoziierten LDLR zu LDLR in *coated pits* liegen meines Wissens nicht vor.

#### 3.4.1.4 Untersuchungen zur Rezeptorspezifität

In Anlehnung an die Versuche von FAINARU *et al.* (1988) wurde die Spezifität und Selektivität des Karpfen-LDL-Rezeptors in Bezug auf andere Plasmalipoproteine in einem kompetitiven Bindungsassay untersucht.

Abbildung 35 zeigt die Gesamtbindung  $^{125}\text{I}$ -markierter cLDL an isolierte Karpfen-Lebermembranen bei steigender Konzentration unmarkierter cVLDL, cLDL und cHDL.



**Abb. 35:** Verdrängung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL durch nicht-markierte cHDL, cLDL und cVLDL an isolierte Lebermembranen des Karpfen.

Membranpräparation: 700 - 100.000 g.  $^{125}\text{I}$ -cLDL: 70  $\mu\text{g/ml}$ . VT: 4 °C. Die Lipoproteine entstammen einer Präparation.

Es ist deutlich zu erkennen, daß cLDL und cVLDL mit ähnlich hoher Affinität um die Bindungsstelle am Karpfen-LDLR konkurrieren, hingegen cHDL nur zu einer leichten Reduktion der Gesamtbindung führen. Da der genaue Bindungsmechanismus der Liganden an die Vertreter der LDL-Rezeptorfamilie noch nicht geklärt ist, kann über die gegenüber den cLDL leicht höhere Affinität der cVLDL nur spekuliert werden.

Nach Angaben mehrerer Autoren (INNERARITY und MAHLEY 1978, MYANT 1990) besitzt Apolipoprotein E gegenüber Apolipoprotein B eine höhere Affinität zum LDL-Rezeptor und würde somit den stärker kompetitiven Kurvenverlauf der cVLDL erklären. FAINARU *et al.* (1988) weisen aber daraufhin, daß Karpfen-VLDL kein zum Apolipoprotein E des Menschen analoges Apolipoprotein besitzen und vermuten, daß ein von ihnen bei cVLDL nachgewiesenes Apolipoprotein A-I analoges Apolipoprotein eine zusätzliche Bindungsfunktion übernehmen könnte. Die hier in Kapitel 3.2 dargestellten Ergebnisse deuten jedoch daraufhin, daß Karpfen-VLDL möglicherweise doch ein Apolipoprotein E analoges Apolipoprotein besitzen und bei vermutlich höherer Affinität zum Rezeptorprotein stärker um die Rezeptorbindung konkurrieren.

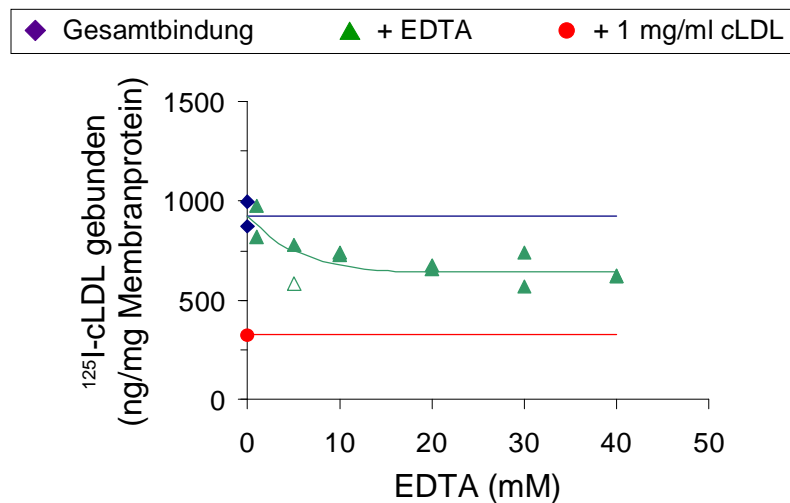
Der geringe Einfluß von HDL auf die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an den LDL-Rezeptor ist wahrscheinlich ausschließlich auf nicht-spezifische Wechselwirkungen mit dem Rezeptorprotein oder dem Liganden zurückzuführen. Wie auch in Abbildung 25 gezeigt werden konnte, besitzen HDL kein Apolipoprotein, das mit dem Apo-B/E-Rezeptor spezifisch interagieren könnte (vgl. FAINARU *et al.* 1988).

#### **3.4.1.5 Der Einfluß von EDTA und Suramin auf die Ligandenbindung**

Vorangegangene Versuche zum Einfluß der Fütterung auf Bindungsparameter des LDL-Rezeptors des Karpfen konnten bereits zeigen, daß EDTA die Ligandenbindung nicht signifikant bzw. nur unwesentlich beeinflusst (vgl. Abb. 31). Zur genaueren Überprüfung dieses Befundes wurden dem Inkubationsmedium bei konstanter  $^{125}\text{I}$ -cLDL-Konzentration aufsteigende EDTA-Konzentrationen beigemischt. Solch ein repräsentativer Versuch ist in Abbildung 36 dargestellt.

Mit dem Kurvenverlauf der Ligandenbindung unter EDTA-Einfluß kann gezeigt werden, daß EDTA-Konzentrationen von über 20 mM zu keiner weiteren Veränderung der Ligandenbindung führten. Die  $^{125}\text{I}$ -cLDL-Bindung wird bei dieser Konzentration bis auf ~ 70 % der  $^{125}\text{I}$ -cLDL-Gesamtbindung gesenkt. Bedenkt man dabei aber, daß dieses Niveau einem Anteil von ~ 50 % der spezifischen  $^{125}\text{I}$ -cLDL-Bindung entspricht, muß davon ausgegangen werden, daß zweiwertige Kationen zumindest teilweise für eine maximale LDL-Bindung am Karpfen-LDL-Rezeptor notwendig sind. Eine EDTA-vermittelte Reduktion der Gesamtbindung auf das Niveau der nicht-spezifischen Bindung wie es für die

Bindung von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an bNLR gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 27, Abb. 28) scheint jedoch ausgeschlossen.



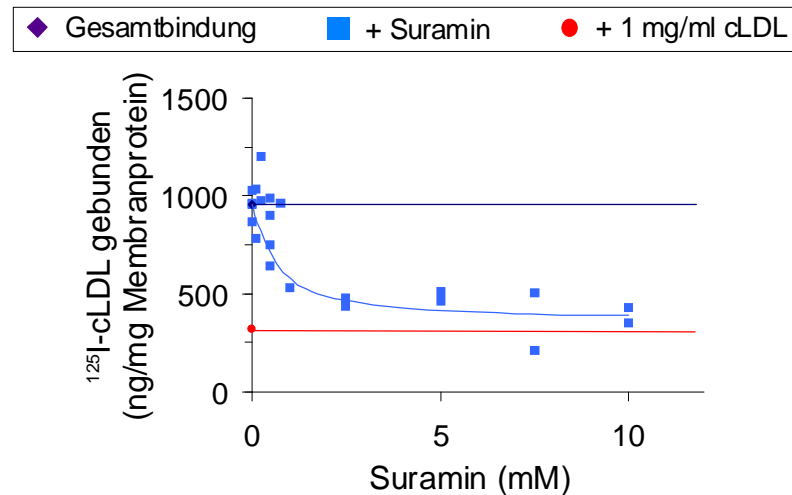
**Abb. 36:** Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an isolierte Lebermembranen des Karpfen in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration.

Membranpräparation von 8.000 -100.000 g.  $^{125}\text{I}$ -cLDL: 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . VT: 4  $^{\circ}\text{C}$ .

Die für den bovinen LDL-Rezeptor ausgewiesenen Calcium-Bindungsstellen weisen darauf hin, daß Calcium einen direkten Einfluß auf die Bindungsdomäne des Rezeptors besitzt, deren Konformation ohne Calcium anscheinend zu keiner Annäherung des Liganden in Form einer Bindung führen kann (vgl. Kap. 1.2). Wenn dieser Aufbau auch für den Karpfen-LDL-Rezeptor gültig ist, scheint eine Konformationsänderung der Bindungsdomäne - sofern sie eintritt - die Bindungseigenschaften des Rezeptors nicht zu beeinflussen.

Eine Reduktion der Gesamtbindung im Sinne einer nicht-spezifischen Bindung ist hingegen annähernd durch Zugabe von Suramin möglich. Suramin wird besonders in der Krebsforschung zur Blockierung der Bindung verschiedener Liganden an ihre Rezeptoren verwendet (MILLS *et al.* 1990, HOHENEGGER *et al.* 1996). Auch für den bovinen LDL-Rezeptor konnte eine Inhibition der Ligandenbindung gezeigt werden (SCHNEIDER *et al.* 1982, DANIEL *et al.* 1983, vgl. HUI *et al.* 1986). Der genaue Reaktionsmechanismus ist unbekannt.

Bei konstanter  $^{125}\text{I}$ -cLDL-Konzentration und aufsteigenden Suramin-Konzentrationen bis zu 10 mM Suramin im Inkubationsmedium wurden die in Abbildung 37 aufgetragenen Daten als Doppelbestimmungen erfaßt.



**Abb. 37: Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an isolierte Lebermembranen des Karpfen in Abhängigkeit von der Suramin-Konzentration.**

Membranpräparation von 8.000 -100.000 g.  $^{125}\text{I}$ -cLDL: 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . VT: 4 °C.

Die spezifische Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an Karpfen-Lebermembranen konnte bereits bei einer Konzentration von 2,5 mM Suramin auf ~ 20 % reduziert werden. Eine Konzentrationserhöhung um das Vierfache erbrachte lediglich eine Reduktion um weitere 10 %, so daß die spezifische Bindung bei einer Konzentration von 10 mM Suramin um ~ 90 % gesenkt werden konnte. Damit liegt die Empfindlichkeit des Karpfen-LDL-Rezeptors gegenüber Suramin in einem dem hLDL-bNNR-System vergleichbaren Bereich zwischen 3,5 und 7 mM. Diese Daten können nur als ungefähre Angabe dienen, da diese mit teilweise gereinigten Rezeptorpräparationen im Bindungsassay und elektrophoretisch aufgetrennten Präparationen im Ligandenblot erhoben worden sind (vgl. SCHNEIDER *et al.* 1982 und DANIEL *et al.* 1983).

### 3.4.1.6 Der Einfluß der Adaptationstemperatur auf Bindungsparameter des LDL-Rezeptors

Die Anpassungstemperatur ektothermer Wirbeltiere ist für die Lipidzusammensetzung von Membranen von entscheidender Bedeutung. Eine kälteinduzierte Reduktion des Membrancholesterolgehalts, die sich in einer Abnahme Cholesterol/Phospholipidgehalts der Membranen äußert, konnte bereits für Lebermembranen des Karpfen nachgewiesen werden.

Da Cholesterol kondensierend auf die Membranphospholipide wirkt, besitzt die Abnahme von Membrancholesterol dementsprechend dekondensierende und Membran-fluidisierende Wirkung und kann als thermoadaptiver Mechanismus aufgefaßt werden (zusammengefaßt nach TEICHERT 1988).

TEICHERT (1988) findet in seinen Untersuchungen zum hepatischen Cholesterolmetabolismus des Karpfen, daß kaltadaptierte Tiere eine deutlich höhere Cholesterolsyntheserate bei offenbar gleicher Cholesterolveresterungsrate aufweisen als warmadaptierte Tiere. Da es aber in der Kälte trotz dieses widersprüchlichen Befundes nicht zu einer Akkumulation von unverestertem Cholesterol in der Leber kommt, wird angenommen, daß in der Kälte eine veränderte Bilanz der hepatischen Auf- und Abgabe von Cholesterol vorliegt (TEICHERT 1988). Inwiefern der LDL-Rezeptor einen Beitrag zu diesen Adaptationsmechanismen leistet, sollte in einem ersten 'Vorversuch' zu diesem Themenkomplex erörtert werden.

Die für diesen Versuch verwendeten Membranen stammten aus Einzelpräparationen von je drei gemeinsam an die Adaptationstemperaturen von 10 und 22 °C langfristig angepaßten Tieren. Dieser Umstand ermöglichte die Durchführung von Bindungsexperimenten, verbunden mit sehr hohem Materialaufwand, für jedes Tier einzeln. Die Auswertung der Bindungsexperimente erfolgte zunächst für die Gruppen gemeinsam, darauf nach Einzeltieren getrennt. Dadurch konnte die Güte der Analyse der für die üblicherweise unter Standardbedingungen durchgeführten und ausgewerteten Experimente überprüft werden.

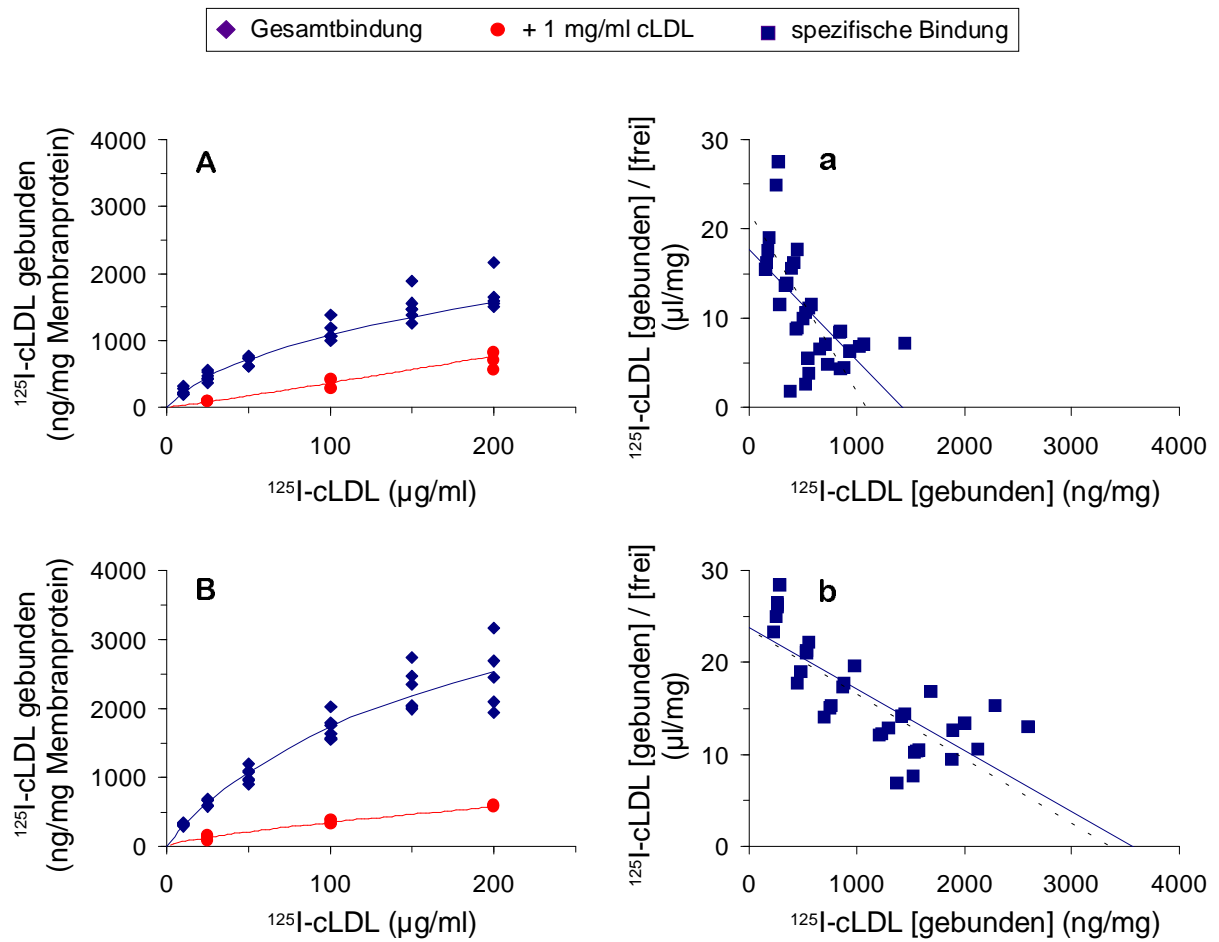
Zunächst wurden die Tiere aber aufgrund ihrer grob-anatomischen Merkmale charakterisiert. Dabei zeigte sich, daß die unterschiedliche Anpassungstemperatur zu keinen signifikanten Unterschieden der in Tabelle 26 aufgeführten anatomischen Daten führte. TEICHERT (1988) hingegen konnte zumindest für den Lebersomatischen Index bei 10 °C und 30 °C adaptierten Karpfen einen signifikanten Unterschied mit  $p < 0,001$  feststellen.

**Tab. 26: Der Lebersomatische Index der untersuchten Karpfen in Abhängigkeit von der Anpassungstemperatur.**

<b>ADAPTATIONSTEMPERATUR 10 °C</b>				
<b>Nr. (Geschlecht)</b>	<b>22 (m)</b>	<b>33 (m)</b>	<b>41 (m)</b>	<b>Mittelwert ± SD</b>
<b>Länge</b>	29	28	28	28,3 ± 0,58
<b>Gewicht</b>	683,2	594,1	515,7	597,67 ± 83,81
<b>Lebergewicht</b>	25,38	20,67	23,86	23,3 ± 2,4
<b>LSI</b>	3,72	3,48	4,63	3,94 ± 0,61
<b>ADAPTATIONSTEMPERATUR 22 °C</b>				
<b>Nr. (Geschlecht)</b>	<b>6 (m)</b>	<b>8 (m)</b>	<b>9 (m)</b>	<b>Mittelwert ± SD</b>
<b>Länge</b>	28	29	29	28,67 ± 0,58
<b>Gewicht</b>	523,12	574,8	543,4	547,12 ± 26,04
<b>Lebergewicht</b>	20,73	17,5	18,21	18,81 ± 1,7
<b>LSI</b>	3,96	3,05	3,35	3,45 ± 0,47

Da bei beiden Untersuchungen ausschließlich Tiere verwendet wurden, die mehr als 30 Tage an die Umgebungstemperatur angepaßt waren, liegt die von TEICHERT (1988) aufgezeigte Differenz möglicherweise in dem stärkeren Unterschied der gewählten Temperaturbereiche begründet. Inwiefern eine Veränderung der Gehalt von Enzymen des Lipidstoffwechsels und deren Enzymaktivitäten mit der Veränderung des LSI einhergeht, ist nicht geklärt. Man kann aber wohl davon ausgehen, daß anatomische Veränderungen in Extremsituationen erst dann auftreten, wenn die enzymatischen Regulationsmechanismen zur Einstellung des physiologischen Gleichgewichts erschöpft sind.

Die Auswertung der Bindungsexperimente erfolgte zunächst für die drei Tiere der jeweiligen Adaptationstemperatur gemeinsam. Die durch Regressionsanalyse ermittelten Bindungskurven sind in Abbildung 38 dargestellt.



**Abb. 38:** Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an isolierte Lebermembranen von Karpfen, die an  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (A) und  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  (B) angepaßt waren.

(A) und (B): Membranpräparation von 8.000 bis 100.000 g; VT:  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Direkter Plot. (a), (b): Scatchard Plot von (A) bzw. (B). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Es ist deutlich zu erkennen, daß an Lebermembran-Präparationen von AT22-adaptierten Karpfen mit einem  $B_{\text{max}}$  von  $3357,2 \pm 494,7\text{ ng }^{125}\text{I-cLDL} / \text{mg Membranprotein}$  gegenüber Präparationen von AT10-adaptierten Tieren mit einem  $B_{\text{max}}$  von  $1086,0 \pm 130,0\text{ ng }^{125}\text{I-cLDL} / \text{mg Membranprotein}$  bei gleicher Versuchstemperatur ungefähr die dreifache Menge an  $^{125}\text{I}$ -markierten cLDL gebunden werden kann (Tab. 27). Dieser Unterschied ist signifikant ( $p < 0,001$ ).

Die  $K_D$ -Werte beider Versuchsgruppen sind mit einem  $K_D$  von  $50,1 \pm 17,1\text{ } \mu\text{g }^{125}\text{I-cLDL} / \text{ml}$  für AT10 und einem  $K_D$  von  $142,0 \pm 39,7\text{ } \mu\text{g }^{125}\text{I-cLDL} / \text{ml}$  für AT22 zumindest nach dieser Auswertungsmethode ebenfalls signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ).

**Tab. 27: Bindungsparameter von <sup>125</sup>I-cLDL an isolierte Lebermembranen von an 10 °C und 22 °C angepaßten Karpfen (vgl. Abb. 38).**

Die Regressionsanalyse wurde aufgrund der erhöhten Datenmenge mit GraphPad Prism durchgeführt; die Angaben zur Iteration beziehen sich auf die Analyse mit Hyperbola for Excel 97 und geben nicht zwingend die für die Berechnung durch Graphpad Prism benötigten Iterationen wieder.

<sup>125</sup> I-cLDL - cLM		AT 10 °C		AT 22 °C	
initiale Schätzwerte	K <sub>D</sub>	31,5		K <sub>D</sub>	31,49
	B <sub>max</sub>	1449,1		B <sub>max</sub>	2598,5
Bindungsparameter	K <sub>D</sub>	50,1 ± 17,1		K <sub>D</sub>	142,0 ± 39,7
	B <sub>max</sub>	1086,0 ± 130,0		B <sub>max</sub>	3357,2 ± 494,7
95% Konfidenzintervalle		15,3 ≤ K <sub>D</sub> ≤ 84,8		61,0 ≤ K <sub>D</sub> ≤ 222,9	
		821,0 ≤ B <sub>max</sub> ≤ 1350,9		2349,1 ≤ B <sub>max</sub> ≤ 4365,2	
nicht-spez. Bindung		$y = 3,2656 x^{1,0153}$	R <sup>2</sup> = 0,9715	$y = 12,132 x^{0,726}$	R <sup>2</sup> = 0,9945
Iterationen		(4)		(3)	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>					
Bindungsparameter	K <sub>D</sub>	80,7		K <sub>D</sub>	149,3
	B <sub>max</sub>	1427,8		B <sub>max</sub>	3561,9

**Einheiten:** K<sub>D</sub> in [µg LDL-Protein/ml], B<sub>max</sub> in [ng LDL-Protein/mg Membranprotein]

Durch die Anfertigung getrennter Membranpräparationen für jeden Fisch einzeln war es in diesem Fall möglich, die Bindungskonstanten pro Tier zu bestimmen und so die statistische Analyse aus gemeinsamer Kurvenauswertung aller Tiere einer Versuchsgruppe mit der statistischen Analyse der Bindungsparameter aus den Einzelbestimmungen zu vergleichen.

**Tab. 28: Regressionsanalyse der Bindungskurven der Einzelerperimente aus Abbildung 38.**

ADAPTATIONSTEMPERATUR 10 °C							
Fisch-Nr. 22	K <sub>D</sub>	16,0 ± 11,8		AT10	$\bar{x}$	±	SD
	B <sub>max</sub>	713,7 ± 117,0			K <sub>D</sub>	79,9 ± 62,2	
Fisch-Nr. 33	K <sub>D</sub>	83,3 ± 22,9			B <sub>max</sub>	1361,5 ± 684,4	
	B <sub>max</sub>	1275,9 ± 149,0					
Fisch-Nr. 41	K <sub>D</sub>	140,3 ± 54,9					
	B <sub>max</sub>	2094,6 ± 440,0					
ADAPTATIONSTEMPERATUR 22 °C							
Fisch-Nr. 6	K <sub>D</sub>	94,8 ± 44,9		AT22	$\bar{x}$	±	SD
	B <sub>max</sub>	2843,8 ± 601,0			K <sub>D</sub>	118,5 ± 32,7	
Fisch-Nr. 8	K <sub>D</sub>	155,8 ± 29,2			B <sub>max</sub>	2916,2 ± 239,5	
	B <sub>max</sub>	3183,5 ± 369,0					
Fisch-Nr. 9	K <sub>D</sub>	104,9 ± 30,0					
	B <sub>max</sub>	2721,2 ± 361,0					

**Einheiten:** K<sub>D</sub> in [µg LDL-Protein/ml], B<sub>max</sub> in [ng LDL-Protein/mg Membranprotein]



Tabelle 28 enthält neben den Bindungsparametern  $K_D$  und  $B_{max}$  der Membranpräparationen der einzelnen Versuchstiere die Mittelwerte und die Standardabweichung für die beiden Versuchsgruppen (je  $n=3$ ). Dabei konnte ermittelt werden, daß die Mittelwerte der maximalen Bindungskapazität von  $1361,5 \pm 684,4$  ng  $^{125}\text{I-cLDL}$  / mg Membranprotein für AT22 und  $2916,2 \pm 239,5$  ng  $^{125}\text{I-cLDL}$  / mg Membranprotein für AT10 signifikant verschieden sind ( $p<0,05$ ). Die LDL-Rezeptordichte der Leber ist bei 22 °C angepaßten Karpfen gegenüber 10 °C adaptierten Karpfen nach dieser Analyse somit nur um den Faktor zwei höher. Der  $K_D$ -Wert hingegen ist für beide Versuchsgruppen als 'nicht signifikant verschieden' ermittelt worden (vgl. Tab. 28).

Es ist dabei zu bedenken, daß die *in vivo*-Werte für die maximale Bindungskapazität ausgehend von einer Versuchstemperatur von 4 °C für an 22 °C adaptierte Karpfen potentiell verhältnismäßig höher liegen als für an 10 °C adaptierte Karpfen. Durch die Angaben aus Kapitel 3.4.1.3 kann berechnet werden, daß Lebermembranen von an 22 °C angepaßten Tieren bei VT 22 °C vermutlich ein  $B_{max}$  von  $\sim 4000$  ng  $^{125}\text{I-cLDL}$  / mg Membranprotein und Lebermembranen von an 10 °C angepaßten Tieren vermutlich ein  $B_{max}$  von  $\sim 1500$  ng  $^{125}\text{I-cLDL}$  / mg Membranprotein besitzen. Damit liegt das Verhältnis zwischen den jeweiligen LDL-Bindungskapazitäten unter *in vivo*-Bedingungen bei ungefähr 2,7.

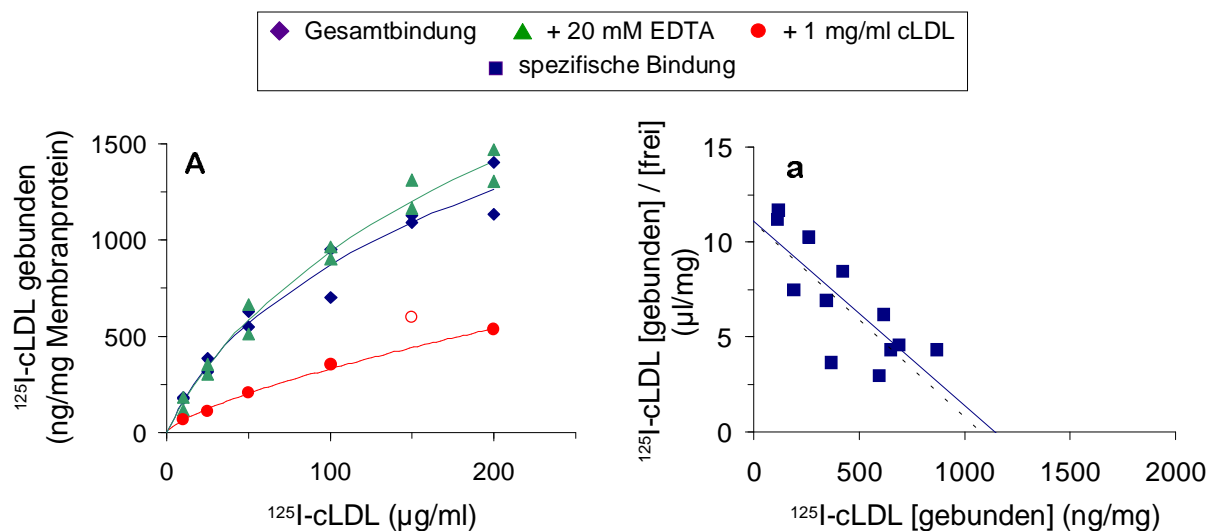
Inwiefern diese Werte in die Daten von TEICHERT (1988) einzuordnen sind kann nicht genau abgeschätzt werden. Da die Leber als zentrales Stoffwechselorgan auch zwischen peripheren Organen vermittelt, müßte für eine weitere Diskussion die LDL-Rezeptordichte in den peripheren Organen ermittelt werden, um auf eine Funktion der hohen Rezeptordichte in der Leber von warmadaptierten Karpfen schließen zu können. Ob die geringe Rezeptordichte der Leber bei kaltadaptierten Karpfen mit einer geringen Plasma-Cholesterolverfügbarkeit einhergeht, die zu einer erhöhten Aktivität der HMG-Co-Reduktase führt, kann nur spekuliert werden. Die Tatsache, daß die Rezeptordichte in kalt- und warmadaptierten Karpfen signifikant verschieden ist, soll in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Abschließend soll ein kritischer Vergleich zur Auswertung dieses Bindungsexperiments durch Regressionsanalyse aller Datenpunkte im Vergleich zur Regressionsanalyse der Einzelerperimente mit anschließender statistischen Auswertung vorgenommen werden.

Die gemeinsame Regressionsanalyse aller Datenpunkte ermöglicht durch die hohe Anzahl an Datenpunkten die Bestimmung der Regressionskurve mit höherer Genauigkeit als dies der Fall für geringe Datenmengen ist. Eine Aussage in Bezug auf die Varianz des biologischen Materials zu treffen, ist damit aber nicht möglich (vgl. Kap. 2.1). Im Gegensatz dazu kann durch die wiederholte Durchführung einzelner Bindungsexperimente sehr wohl eine in Bezug auf die biologische Vielfalt differenzierte, statistische Analyse durchgeführt werden. Dabei ist allerdings zu beachten, daß durch die limitierenden Ressourcen besonders der cLDL die Regressionsanalyse aufgrund der geringeren Datenmengen, speziell für die nicht-spezifische Bindung, nur ungenau durchgeführt werden kann. Wie bereits gezeigt ist die Ermittlung der nicht-spezifischen Bindung entscheidend für die Auswertung der spezifischen Bindung (Kap. 2.12.4). Beide Analysen ergeben hier dennoch ähnliche Werte, so daß man daraus schließen kann, daß auch Bindungsexperimente mit *gepooltem* Membranmaterial annähernd identische Bindungsparameter geliefert hätten.

### 3.4.2 Bindung von Karpfen-LDL an isolierte Membranen der Forelle

Der Befund, daß Human-LDL weder an Lebermembranen der Forelle noch des Karpfen spezifisch zu binden vermochten, führte zu der Frage, ob Karpfen-LDL an Lebermembranen der Forelle binden können. Im Bindungsversuch von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an isolierte Lebermembranpräparationen der Forelle erfolgte die Bindung rezeptorvermittelt mit einem  $K_D$  von  $97,5 \pm 41,1 \mu\text{g } ^{125}\text{I-cLDL} / \text{ml}$  und einem  $B_{\text{max}}$  von  $1072,7 \pm 204 \text{ ng } ^{125}\text{I-cLDL} / \text{mg}$  Membranprotein (Tab. 29).



**Abb. 39:** Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an isolierte Lebermembranen der Forelle.

Membranpräparation von 8.000 bis 100.000 g; VT: 4 ° C. (A): Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden. (a): Scatchard Plot von (A). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Die Ligandenbindung ist EDTA-insensitiv und nicht von der Gesamtbindung signifikant verschieden (vgl. Abb. 39). Dieser Umstand führt wiederum zu der Annahme, daß, sollte das Fehlen von Calcium an eventuellen Koordinationsstellen im Rezeptormolekül zu einer Konformationsänderung der Bindungsdomäne führen, die Ligandenbindung dennoch unbeeinflußt bleibt (vgl. Kap. 3.4.1.5).

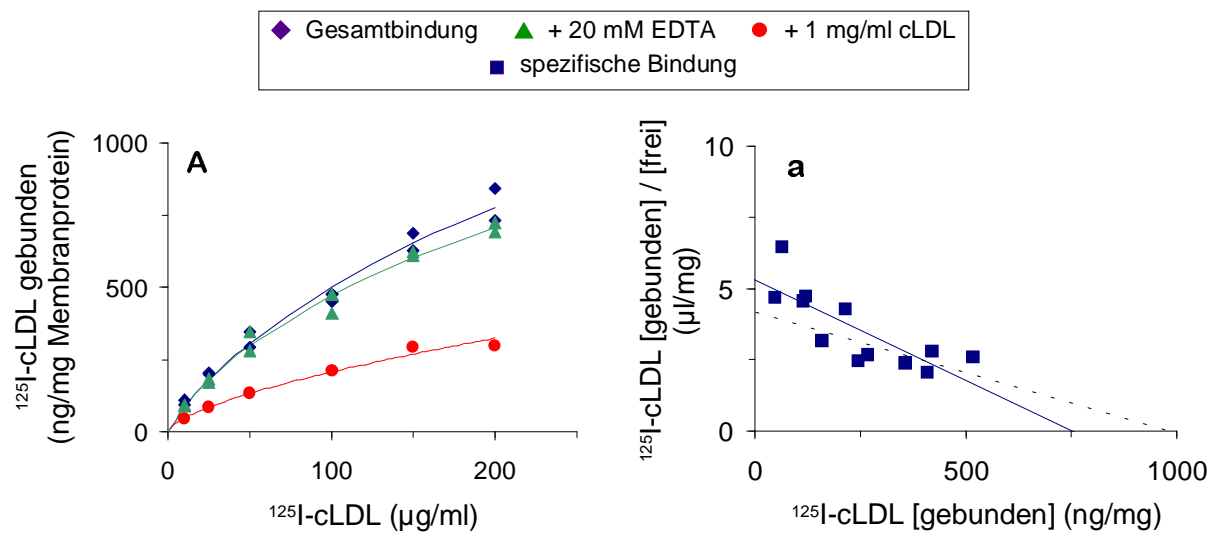
**Tab. 29: Bindungsparameter von <sup>125</sup>I-cLDL an isolierte Lebermembranen der Forelle (vgl. Abb. 39).**

<sup>125</sup> I-cLDL - tLM	Gesamtbindung		+ 20 mM EDTA	
initiale Schätzwerte	K <sub>D</sub>	96,9	K <sub>D</sub>	142,97
	B <sub>max</sub>	1100,4	B <sub>max</sub>	1500,4
Bindungsparameter	K <sub>D</sub>	97,5 ± 41,1	K <sub>D</sub>	150,6 ± 47,1
	B <sub>max</sub>	1072,7 ± 204	B <sub>max</sub>	1522,9 ± 254
95% Konfidenzintervalle	4,5 ≤ K <sub>D</sub> ≤	190,5	44,1 ≤ K <sub>D</sub> ≤	257,2
	611,22 ≤ B <sub>max</sub> ≤	1534,2	948,3 ≤ B <sub>max</sub> ≤	2097,5
nicht-spez. Bindung	y = 12,817x <sup>0,7063</sup> R <sup>2</sup> = 0,993		y = 12,817x <sup>0,7063</sup> R <sup>2</sup> = 0,993	
Iterationen	3		2	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>				
Bindungsparameter	K <sub>D</sub>	103,1	K <sub>D</sub>	217,9
	B <sub>max</sub>	1140,5	B <sub>max</sub>	1935,4

Einheiten: K<sub>D</sub> in [µg LDL-Protein/ml], B<sub>max</sub> in [ng LDL-Protein/mg Membranprotein]

### 3.4.3 Bindung von Karpfen-LDL an isolierte Membranen des Menschen

Obwohl wie in Abbildung 30 gezeigt <sup>125</sup>I-hLDL nur unspezifisch an isolierte Membranen des Karpfen zu binden vermochten, führte der umgekehrte Fall, also die Inkubation von <sup>125</sup>I-cLDL mit hLM-Membranpräparationen hingegen zu einer rezeptorvermittelten Bindung (Abb. 40).



**Abb. 40: Bindung von <sup>125</sup>I-cLDL an isolierte Lebermembranen des Menschen.**

Membranpräparation von 8.000 bis 100.000 g; VT: 4 ° C. (A): Direkter Plot. (a): Scatchard Plot von (A). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Die Bindungsparameter liegen mit einem  $K_D$  von  $234,6 \pm 99,3 \mu\text{g } ^{125}\text{I-cLDL} / \text{ml}$  um den Faktor 2,5 und mit einem  $B_{\text{max}}$  von  $984,2 \pm 260 \text{ ng } ^{125}\text{I-cLDL} / \text{mg Membranprotein}$  um den Faktor 4 höher als für die Bindung von  $^{125}\text{I-hLDL}$  ermittelten Werte (vgl. Tab. 21 und Tab. 30).

Die gegenüber der  $^{125}\text{I-hLDL}$ -Bindung niedrigere Affinität der  $^{125}\text{I}$ -gekoppelten cLDL an den LDL-Rezeptor des Menschen mag aufgrund der nur entfernten Verwandtschaft mit einer „besser“ angepaßten Liganden-Rezeptor-Interaktion im Sinne einer höheren Affinität des homologen Liganden-Rezeptor-Systems erklärt werden. Überraschend hingegen ist, daß die maximale Bindungskapazität der hier verwendeten Human-Lebermembranen bei Verwendung derselben Membranpräparation (siehe Kap. 7.3) für  $^{125}\text{I-cLDL}$  vierfach höher ist als für  $^{125}\text{I-hLDL}$  und auch nicht durch EDTA reduziert werden kann.

**Tab. 30: Bindungsparameter von  $^{125}\text{I-cLDL}$  an isolierte Lebermembranen des Menschen (vgl. Abb. 40).**

$^{125}\text{I-cLDL}$ - hLM	Gesamtbindung		+ 20 mM EDTA	
initiale Schätzwerte	$K_D$	212,9	$K_D$	145,7
	$B_{\text{max}}$	942,1	$B_{\text{max}}$	662,2
Bindungsparameter	$K_D$	$234,6 \pm 99,3$	$K_D$	$162,7 \pm 47,5$
	$B_{\text{max}}$	$984,2 \pm 260$	$B_{\text{max}}$	$695,0 \pm 112$
95% Konfidenzintervalle	$9,97 \leq K_D \leq 459,2$		$55,3 \leq K_D \leq 270,2$	
	$396,0 \leq B_{\text{max}} \leq 1572,4$		$441,6 \leq B_{\text{max}} \leq 948,4$	
nicht-spez. Bindung	$y = 10,62x^{0,6449}$	$R^2 = 0,994$	$y = 10,62x^{0,6449}$	$R^2 = 0,994$
Iterationen	6		4	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>				
Bindungsparameter	$K_D$	141,8	$K_D$	151,5
	$B_{\text{max}}$	750,4	$B_{\text{max}}$	679,1

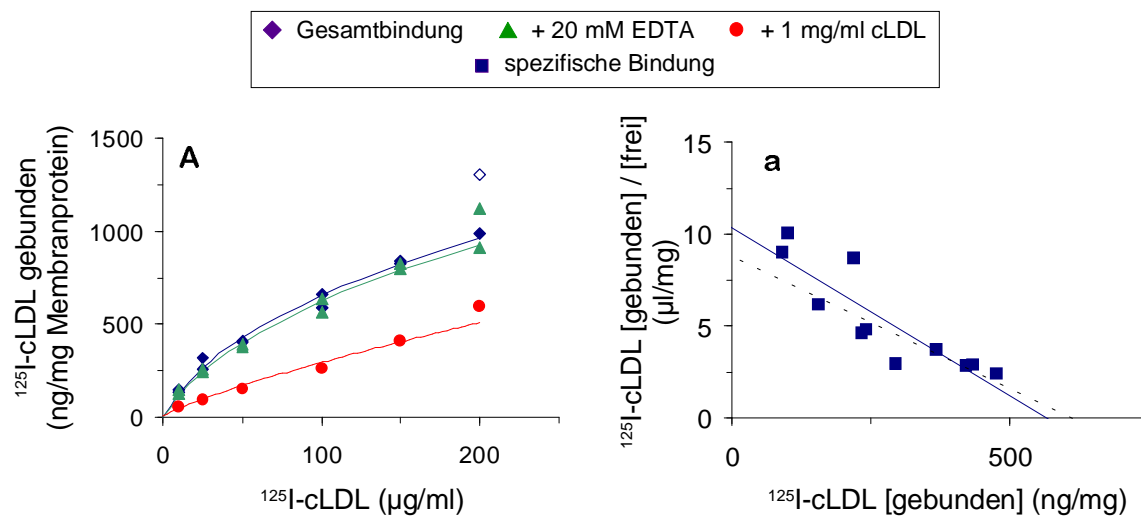
**Einheiten:**  $K_D$  in [ $\mu\text{g LDL-Protein/ml}$ ],  $B_{\text{max}}$  in [ $\text{ng LDL-Protein/mg Membranprotein}$ ]

Vorausgesetzt beide Liganden binden an dasselbe Rezeptorprotein, muß aufgrund dieser Befunde angenommen werden, daß sich der Bindungsmechanismus der Karpfen-LDL von dem der Human-LDL an den Human-LDL-Rezeptor teilweise unterscheidet. Dabei scheint es so, daß die Rezeptorbindungsstellen für Karpfen-LDL durch eine Konformationsänderung bei EDTA-Zugabe unbeeinflusst bleiben (vgl. Abb. 39).

### 3.4.4 Bindung von Karpfen LDL an isolierte Membranen des Rinds

Schließlich wurde auch die Bindung von Karpfen-LDL an das Referenzsystem der Membranen aus Rinder-Nebennierenrinden überprüft. Es zeigte sich, daß  $^{125}\text{I}$ -cLDL auch an bNNR-Membranpräparationen rezeptorvermittelt gebunden werden (Abb. 41).

Die  $^{125}\text{I}$ -cLDL-Bindung erfolgte dabei zwar einem der Bindung von  $^{125}\text{I}$ -markierten Human-LDL gegenüber ungefähr 10- bis 11-fach höherem  $K_D$ -Wert von  $69,7 \pm 16,6 \mu\text{g } ^{125}\text{I-cLDL} / \text{ml}$ , erreichte jedoch mit einem  $B_{\text{max}}$  von  $611,4 \pm 60,4 \text{ ng } ^{125}\text{I-cLDL} / \text{mg Membranprotein}$  vergleichbaren Wert für die maximale Rezeptordichte in bNNR-Membranpräparationen von 8.000 -100.000 g (vgl. Tab. 19). Die spezifische Ligandenbindung konnte, wie bereits für die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -markierten Karpfen-LDL an Karpfen-, Forellen- und Human-Lebermembranen gezeigt (vgl. Abb. 31, Abb. 39 und Abb. 40), nicht durch EDTA reduziert werden. Die Kurven der Gesamtbindung und der Bindung in Anwesenheit von EDTA sind nicht signifikant verschieden (vgl. Tab. 31).



**Abb. 41:** Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an isolierte bNNR-Membranen.

Membranpräparation von 8.000 bis 100.000 g; VT: 4 °C. (A) Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden. (a): Scatchard Plot von (A). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

**Tab. 31: Bindungsparameter von  $^{125}$ I-cLDL an bNNR-Membranen (vgl. Abb. 41).**

$^{125}$ I-cLDL - bNNR	Gesamtbindung			EDTA				
initiale Schätzwerte	$K_D$	63,1		$K_D$	72,8			
	$B_{max}$	594,3		$B_{max}$	571,4			
Bindungsparameter	$K_D$	69,7 ± 16,6		$K_D$	76,4 ± 17,8			
	$B_{max}$	611,4 ± 60,4		$B_{max}$	577,3 ± 57,9			
95% Konfidenzintervalle		31,42	$\leq K_D \leq$	107,98		35,39	$\leq K_D \leq$	117,45
			472,12	$\leq B_{max} \leq$	750,68		443,78	$\leq B_{max} \leq$
nicht-spez. Bindung	$y = 7,7854 x^{0,7888} \quad R^2 = 0,984$			$y = 7,7854 x^{0,7888} \quad R^2 = 0,984$				
Iterationen	6			4				
<b>SCATCHARD-PLOT</b>								
Bindungsparameter	$K_D$	54,9		$K_D$	57,9			
	$B_{max}$	565,8		$B_{max}$	522,5			

**Einheiten:**  $K_D$  in [ $\mu$ g LDL-Protein/ml],  $B_{max}$  in [ng LDL-Protein/mg Membranprotein]

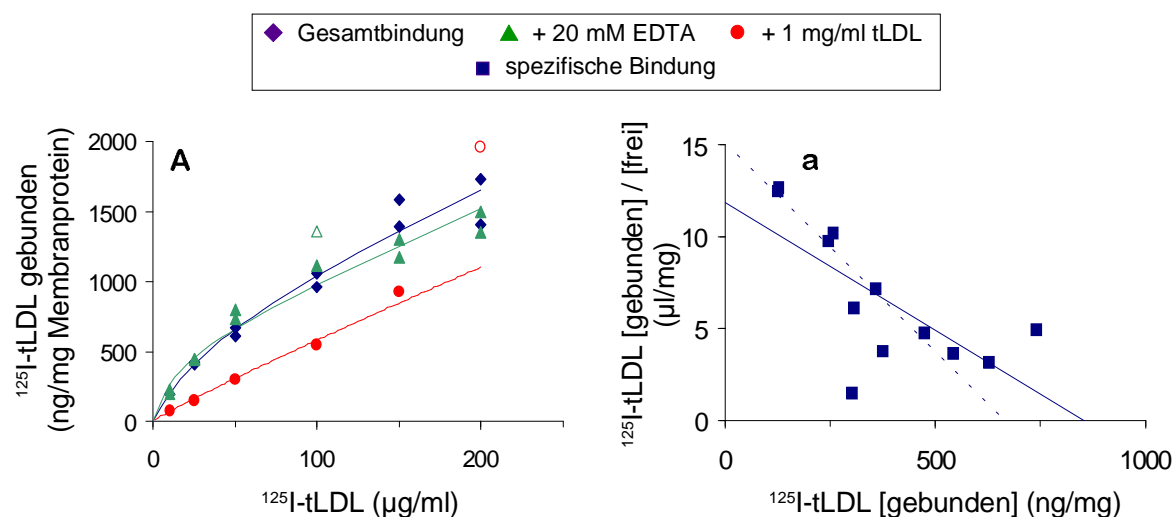
Der Befund, daß Karpfen-LDL an Membranen von Karpfen- und auch Forellengewebe rezeptorvermittelt gebunden werden ist zunächst nicht sehr überraschend. Die spezifische Bindung von Karpfen-LDL an Human- und auch Rindergewebe ist jedoch erstaunlich, wenn man bedenkt, daß es sich dabei um Gewebe von sehr unterschiedlichen Tierarten verschiedener Wirbeltierklassen handelt. Die vorläufige Annahme, daß kein universelles Bindungsvermögen von LDL innerhalb der Wirbeltiere vorliegt (vgl. Kap. 3.3.3), muß nach diesen Ergebnissen revidiert werden. Eine abschließende Beurteilung dieser Ergebnisse erfolgt in der zusammenfassenden Diskussion.

### 3.5 Bindung von Forellen-LDL an isolierte Membranen von Vertretern verschiedener Wirbeltierklassen

Für die Fragestellung inwiefern LDL-Präparationen einer Spezies an Rezeptormoleküle artfremder Individuen binden können, wurden im Folgenden Versuche zur Bindungsfähigkeit von Forellen-LDL an die bereits verwendeten Membranpräparationen von Forelle, Karpfen, Mensch und Rind durchgeführt.

#### 3.5.1 Bindung von Forellen-LDL an isolierte Membranen der Forelle

Die Bindung von Forellen-LDL an isolierte Forellen-Lebermembranen erfolgte rezeptorvermittelt mit einem  $K_D$  von  $44,0 \pm 25,0 \mu\text{g } ^{125}\text{I-tLDL}$  und einem  $B_{\text{max}}$  von  $664,5 \pm 124,0 \text{ ng } ^{125}\text{I-tLDL} / \text{mg Membranprotein}$  (vgl. Abb. 42 und Tab. 32).



**Abb. 42:** Bindung von  $^{125}\text{I-tLDL}$  an isolierte Lebermembranen der Forelle.

Membranpräparation von 8.000 bis 100.000 g; VT: 4 °C. **(A)** Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden. **(a)**: Scatchard Plot von **(A)**. Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Der Kurvenverlauf der Ligandengesamtbinding und der Bindung in Anwesenheit von EDTA ist nicht signifikant verschieden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß - wie bereits für die  $^{125}\text{I-cLDL}$ -Bindung an Karpfen-Lebermembranen und andere gezeigt (Abb. 31, Abb. 39) - das Bindungsverhalten des Liganden durch eventuelle Strukturveränderungen des Rezeptors in Anwesenheit von EDTA nicht beeinflußt wird.



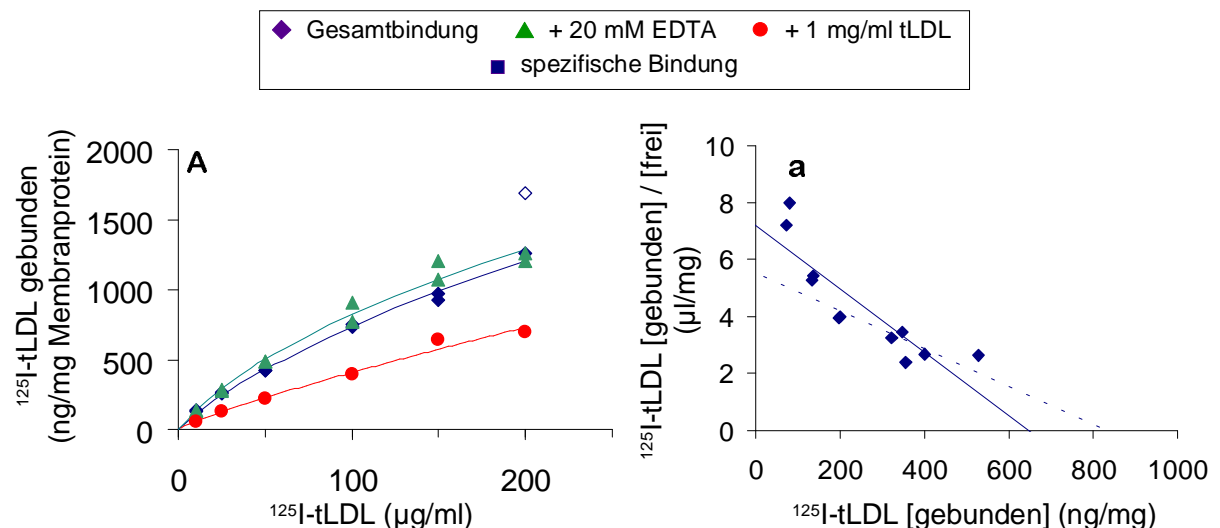
**Tab. 32: Bindungsparameter von  $^{125}\text{I}$ -tLDL an isolierte Lebermembranen der Forelle (vgl. Abb. 42).**

$^{125}\text{I}$ -tLDL - tLM	Gesamtbindung		+ 20 mM EDTA	
initiale Schätzwerte	$K_D$	57,3	$K_D$	13,1
	$B_{\max}$	770,0	$B_{\max}$	477,1
Bindungsparameter	$K_D$	$44,0 \pm 25,0$	$K_D$	$12,9 \pm 8,22$
	$B_{\max}$	$664,5 \pm 124,0$	$B_{\max}$	$446,2 \pm 60,1$
95% Konfidenzintervalle	$0 \leq K_D \leq 100,6$ $384,0 \leq B_{\max} \leq 945,0$		$0 \leq K_D \leq 31,9$ $307,6 \leq B_{\max} \leq 584,8$	
nicht-spez. Bindung	$y = 8,2504 x^{0,9239}$ $R^2 = 0,9921$		$y = 8,2504 x^{0,9239}$ $R^2 = 0,9921$	
Iterationen	3		8	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>				
Bindungsparameter	$K_D$	71,9	$K_D$	58,4
	$B_{\max}$	852,9	$B_{\max}$	774,6

Einheiten:  $K_D$  in [ $\mu\text{g}$  LDL-Protein/ml],  $B_{\max}$  in [ $\text{ng}$  LDL-Protein/mg Membranprotein]

### 3.5.2 Bindung von Forellen-LDL an isolierte Membranen des Karpfen

Die Bindung der  $^{125}\text{I}$ -gekoppelten Forellen-LDL an Karpfen-Lebermembranen erfolgte mit einem  $K_D$  von  $150,7 \pm 43,3 \mu\text{g}$   $^{125}\text{I}$ -tLDL / ml und ist damit nicht vom  $K_D$ -Wert der  $^{125}\text{I}$ -cLDL-Bindung an cLM signifikant verschieden (vgl. Tab. 27).



**Abb. 43: Bindung von  $^{125}\text{I}$ -tLDL an isolierte Lebermembranen des Karpfen.**

Membranpräparation von 8.000 bis 100.000 g; VT:  $4^\circ\text{C}$ . (A) Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden. (a): Scatchard Plot von (A). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Die maximale Bindungskapazität von  $B_{\max} = 830,7 \pm 133 \text{ ng } ^{125}\text{I-tLDL} / \text{mg}$  Membranprotein ist jedoch um das Vierfache geringer als für  $^{125}\text{I-cLDL}$  nachgewiesen werden konnte. Diese Diskrepanz könnte auf methodische Fehler zurückzuführen sein. Es wäre aber auch möglich, daß sterische Unterschiede in der Bindung der tLDL im Vergleich zur Bindung von cLDL zu einer geringeren maximalen Bindungskapazität führen könnten. So könnte eventuell die Größe und Form eines rezeptorgebundenen Forellen-LDL-Partikels die Bindung anderer LDL-Partikel an LDL-Rezeptoren in direkter Nähe zum bereits gebundenen Partikel negativ beeinflussen.

**Tab. 33: Bindungsparameter von  $^{125}\text{I-tLDL}$  an isolierte Lebermembranen des Karpfen (vgl. Abb. 43).**

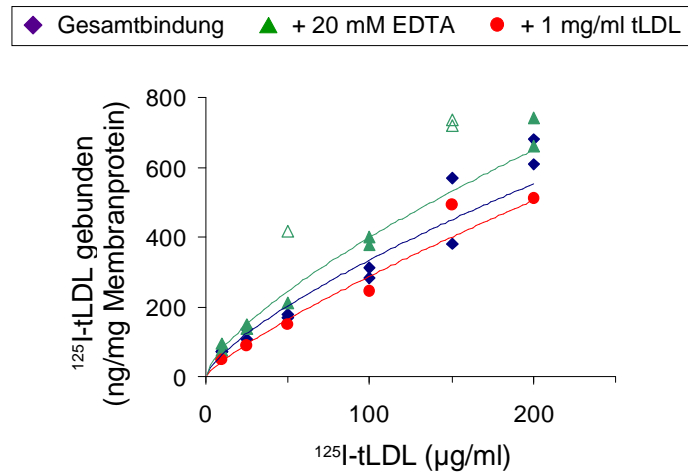
$^{125}\text{I-tLDL}$ - cLM	Gesamtbindung		+ 20 mM EDTA	
initiale Schätzwerte	$K_D$	146,7	$K_D$	96,4
	$B_{\max}$	826,5	$B_{\max}$	835,8
Bindungsparameter	$K_D$	$150,7 \pm 43,3$	$K_D$	$95,9 \pm 34,1$
	$B_{\max}$	$830,7 \pm 133$	$B_{\max}$	$817,3 \pm 130$
95% Konfidenzintervalle	50,8	$\leq K_D \leq 250,6$	18,8	$\leq K_D \leq 173,0$
	524,0	$\leq B_{\max} \leq 1137,4$	523,2	$\leq B_{\max} \leq 1111,4$
nicht-spez. Bindung	$y = 8,2638 x^{0,8463} \quad R^2 = 0,9964$		$y = 8,2638 x^{0,8463} \quad R^2 = 0,9964$	
Iterationen	5		4	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>				
Bindungsparameter	$K_D$	89,7	$K_D$	133,6
	$B_{\max}$	644,9	$B_{\max}$	982,7

**Einheiten:**  $K_D$  in [ $\mu\text{g LDL-Protein/ml}$ ],  $B_{\max}$  in [ $\text{ng LDL-Protein/mg Membranprotein}$ ]

Die Kurven der Gesamtbindung und der Bindung in Anwesenheit von EDTA sind nicht signifikant verschieden (vgl. Tab. 33). Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse aus den Bindungsexperimenten von  $^{125}\text{I-cLDL}$  an Karpfen-Lebermembranen, bei denen auch keine EDTA-Sensitivität der Ligandenbindung festgestellt werden konnte. Eine mögliche Erklärung wurde unter anderem auch in Kap. 3.4.1.5 gegeben.

### 3.5.3 Bindung von Forellen-LDL an isolierte Membranen des Menschen

Eine spezifische Bindung von Forellen-LDL an Human-Lebermembranen konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 44).



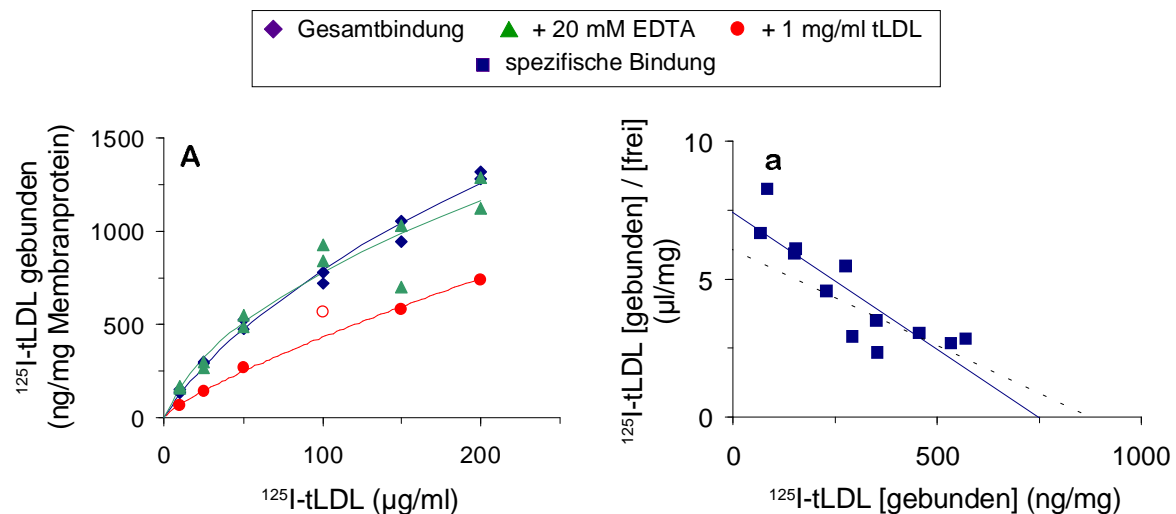
**Abb. 44:** Bindung von  $^{125}\text{I}$ -tLDL an isolierte Lebermembranen des Menschen.

Membranpräparation von 8.000 bis 100.000 g; VT: 4 °C. Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden.

Dieser Befund überrascht um so mehr, als daß eine spezifische Bindung von Karpfen- $^{125}\text{I}$ -LDL an Human-Lebermembranen experimentell ermittelt werden konnte (Kap. 0). Karpfen- und Forellen-LDL werden jedoch interspezifisch von den jeweiligen Membranpräparationen der anderen Spezies spezifisch gebunden. Es liegt also nahe anzunehmen, daß sich beide Liganden in ihrer Struktur und ihren Bindungseigenschaften ähnlich sind. Allerdings wurde bereits bei der Bindung von  $^{125}\text{I}$ -tLDL an Karpfen-Lebermembranen spekuliert, daß sich die LDL-Partikel offensichtlich doch in ihren Bindungseigenschaften unterscheiden. Warum nun Karpfen-LDL, nicht aber Forellen-LDL an Human-Lebermembranen zu binden vermögen, konnte nicht geklärt werden.

### 3.5.4 Bindung von Forellen-LDL an isolierte Membranen des Rinds

Schließlich sind die Bindungskurven für die Bindung von Forellen-LDL an bNNR-Membranen sind in Abbildung 45 dargestellt.



**Abb. 45:** Bindung von <sup>125</sup>I-tLDL an isolierte bNNR-Membranen.

Membranpräparation von 8.000 bis 100.000 g; VT: 4 °C. (A) Direkter Plot. Offene Symbole kennzeichnen Daten, die nicht in die Berechnung der Kurven miteinbezogen wurden. (a): Scatchard Plot von (A). Die gestrichelte Linie entspricht der errechneten Hyperbel der spezifischen Bindung.

Die Bindungsparameter  $K_D$  mit  $144,1 \pm 52,5 \mu\text{g } ^{125}\text{I-cLDL} / \text{ml}$  und  $B_{\text{max}}$  mit  $874,0 \pm 167,0 \text{ ng } ^{125}\text{I-cLDL} / \text{mg Membranprotein}$  sind von den für <sup>125</sup>I-cLDL ermittelten  $K_D$ - und  $B_{\text{max}}$ -Werte nicht signifikant verschieden (vgl. Tab. 34).

**Tab. 34:** Bindungsparameter von <sup>125</sup>I-tLDL an isolierte bNNR-Membranen (vgl. Abb. 45).

<sup>125</sup> I-tLDL - bNNR	Gesamtbindung		+ 20 mM EDTA	
initiale Schätzwerte	$K_D$	134,8	$K_D$	58,6
	$B_{\text{max}}$	859,3	$B_{\text{max}}$	616,0
Bindungsparameter	$K_D$	$144,1 \pm 52,5$	$K_D$	$47,8 \pm 36,4$
	$B_{\text{max}}$	$874,0 \pm 167,0$	$B_{\text{max}}$	$516,2 \pm 133,0$
95% Konfidenzintervalle	25,3	$\leq K_D \leq 262,9$	0	$\leq K_D \leq 130,143$
	496,2	$\leq B_{\text{max}} \leq 1261,8$	215,3	$\leq B_{\text{max}} \leq 817,1$
nicht-spez. Bindung	$y = 11,141 x^{0,7941} \quad R^2 = 0,9978$		$y = 11,141 x^{0,7941} \quad R^2 = 0,9978$	
Iterationen	7		5	
<b>SCATCHARD-PLOT</b>				
Bindungsparameter	$K_D$	100,9	$K_D$	132,0
	$B_{\text{max}}$	749,5	$B_{\text{max}}$	916,2

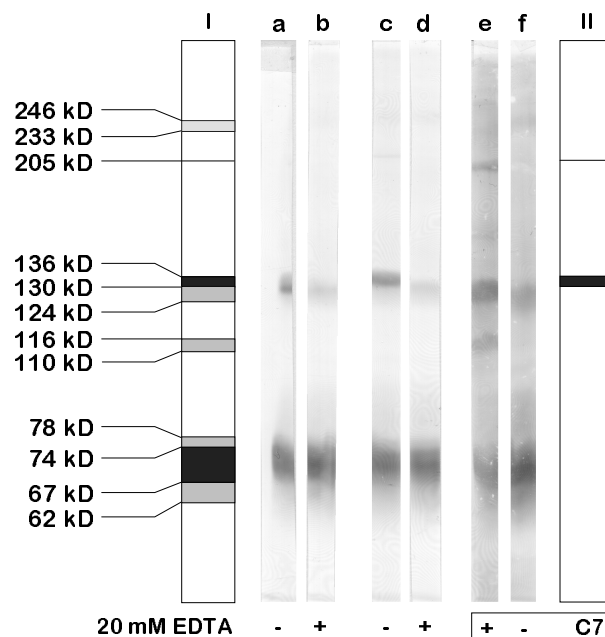
**Einheiten:**  $K_D$  in [ $\mu\text{g LDL-Protein/ml}$ ],  $B_{\text{max}}$  in [ $\text{ng LDL-Protein/mg Membranprotein}$ ]

Die Werte für  $B_{\max}$  und  $K_D$  liegen aber mit dem Faktor 1,7 bzw. 24 weit über den mit  $^{125}\text{I}$ -hLDL ermittelten Werte. Die Diskussion zum Vergleich aller Bindungsparameter aller durchgeführten Versuche findet sich in Kapitel 4. Die Kurven der Gesamtbindung und der Bindung in Anwesenheit von EDTA sind nicht signifikant verschieden (vgl. Tab. 33).

### 3.6 Liganden- und Immunoblot des LDL-Rezeptors

Mehrere Autoren konnten den LDL-Rezeptor aus bovinen und human Nebennieren sowie human Leberpräparationen nach SDS-PAGE und Blotting nachweisen (BEISIEGEL *et al.* 1982, DANIEL *et al.* 1983, WADE *et al.* 1985, SOUTAR *et al.* 1986). Dabei wurden ausschließlich Membranen verwendet, die nach Solubilisation mit Triton X-100 einer DEAE-Chromatographie unterzogen worden waren. Nach den Angaben von BEISIEGEL *et al.* (1982) ist dieser Schritt zur Detektion des Rezeptors (mit dem gegen den bovinen LDL-Rezeptor gerichteten Antikörper C7) notwendig.

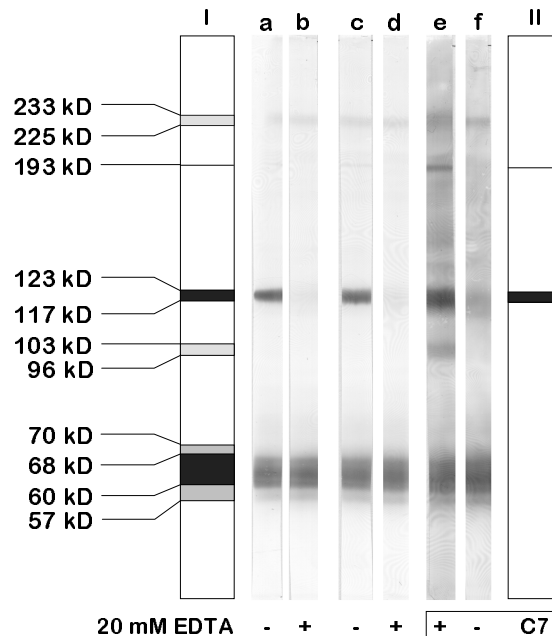
Die hier verwendeten Verfahren beruhen auf der Detektion des Rezeptors (1) durch native LDL, die wiederum von einem Antikörper gegen human ApoB detektiert wurden, (2) durch mit  $^{125}\text{I}$  radioaktiv markierte LDL, deren Bindung autoradiographisch nachgewiesen werden konnte und (3) durch den gegen bovinen LDL-Rezeptor gerichteten Antikörper C7, der über enzymgekoppelte sekundäre Antikörper detektiert wurde.



**Abb. 46:** Ligandenblot von hLDL an bNNR-Membranen und Detektion des LDL-Rezeptors durch Anti-hLDLR C7.

Die Membranen wurden aus  $\text{N}_{2,\text{liq}}$ -gelagerten bNNR präpariert. Elektrophorese nach Tritonextraktion und DEAE-Chromatographie. Blotting in Tank-Transferpuffer mit 20% Methanol. **I:** Größenordnung der Banden von a-f. **II:** Banden rezeptorvermittelter hLDL-Bindung. **a,b:** LDL aus 4 Tage bei 4°C gelagertem Plasma. **c,d:** LDL aus frisch gewonnenem Plasma. **e,f:** C7-Detektion. **b,d:** Bindung in Anwesenheit von 20 mM EDTA. **f:** Detektion in Abwesenheit des Primär-Antikörpers.

Zunächst wurden die Detektionsverfahren mit nativen hLDL und dem Antikörper C7 an bNNR etabliert. Dabei wurde geprüft, ob sich Membranen, die einer Präparation aus N<sub>2</sub>-gelagerten Nebennieren von einer direkt nach der Gewebeentnahme angefertigten und anschließend in N<sub>2</sub> eingefrorenen Präparation in ihrem Detektionsverhalten unterscheiden.



**Abb. 47:** Ligandenblot von hLDL an bNNR-Membranen und Detektion des LDL-Rezeptors durch Anti-hLDLR C7.

Die Präparation der Membranen erfolgte direkt nach der Schlachtung. Elektrophorese nach Tritonextraktion und DEAE-Chromatographie. Blotting in Tank-Transferpuffer mit 20% Methanol. I: Größenzuordnung der Banden von a-f. II: Banden rezeptorvermittelter hLDL-Bindung. a,b: LDL aus 4 Tage bei 4° C gelagertem Plasma. c,d: LDL aus frisch gewonnenem Plasma. e,f: C7-Detektion. b,d: Bindung in Anwesenheit von 20 mM EDTA. f: Detektion in Abwesenheit des Primär-Antikörpers.

Die Abbildungen 46 und 47 dokumentieren diesen Vergleich. Es zeigte sich, daß bei prinzipiell gleich bleibender Anzahl detektierter Banden frisch angefertigte Membranpräparationen zu schärferen Bandenabgrenzungen führen als Präparationen aus eingefrorenem Gewebe. Diese Unschärfe ist vermutlich auf Degradationsprozesse der betreffenden Proteine zurückzuführen, die sich selbst bei niedrigen Temperaturen im Gewebeverbund sehr viel stärker bemerkbar machen als in isolierten Membranen.

LDL-Rezeptoraktivität wurde im Ansatz mit nativen hLDL den Banden zugeordnet, deren Färbung bei einem Kontrollansatz mit EDTA unterblieb. Wie bereits gezeigt werden konnte (Abb. 27) benötigt der bovine LDL-Rezeptor zur Bindung seines Liganden Ca<sup>2+</sup>-Ionen, die

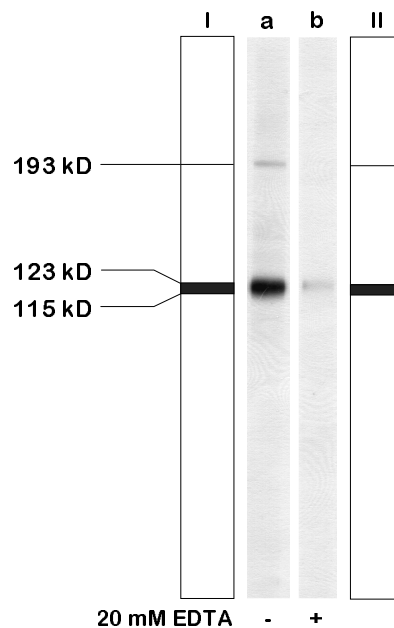
durch EDTA komplexiert nicht mehr zur Stabilisierung des Rezeptormoleküls zur Verfügung stehen, so daß eine Ligandenbindung unterbleibt. Der bovine LDL-Rezeptor besitzt demnach unter nicht reduzierenden Bedingungen während der SDS-PAGE bei den hier vorgestellten Ergebnissen ein apparentes Molekulargewicht zwischen 120 und 140 kD. Diese Angabe deckt sich gut mit den bereits in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen, wonach der bovine LDL-Rezeptor unter denselben Bedingungen ein apparentes Molekulargewicht von 130 kD aufweist (DANIEL *et al.* 1983). Darüber hinaus ist eine schwache, spezifisch angefärbte Bande in einem Bereich von 190 - 210 kD vorhanden, auf die im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus den Autoradiographien noch kurz eingegangen werden soll.

Der Antikörper C7 detektiert zusätzlich zu den Banden bei 120 und 193 kD eine spezifisch markierte Bande zwischen 96 - 103 kD (Abb. 47). Dabei könnte es sich entweder um ein Proteolysespaltprodukt des LDL-Rezeptors oder aber ein nicht-verwandtes Protein handeln, das ein mit dem bLDLR gemeinsames Epitop aufweist (i.e. Kreuzreaktivität besitzt). Eine andere Möglichkeit besteht in Analogie zu den Ergebnissen von TOLLESHAUG *et al.* (1982) darin, daß es sich bei dieser Bande um einen nicht-bindungskompetenten Precursor des bLDLR handelt (DANIEL *et al.* 1983, WADE *et al.* 1985). Genauere Angaben können aufgrund dieser Befunde nicht gemacht werden.

Da sich im Verlauf der Bindungsversuche herausstellte, daß entgegen den Angaben von FAINARU *et al.* (1989) <sup>125</sup>I-hLDL nicht an isolierte Lebermembranen des Karpfen zu binden vermögen und der anti-Human-ApoB-Antikörper cLDL nicht erkennt (WODTKE unveröffentlicht), mußte nach einer Alternative zur Detektion einer Rezeptoraktivität in SDS-PAGE behandelten Membranen des Karpfen gesucht werden. Diese bestand darin <sup>125</sup>I-gekoppelte LDL zu verwenden und die Bindung durch Autoradiographie sichtbar zu machen.

Abbildung 48 zeigt entsprechend dem Experiment aus Abbildung 47 im Bereich um 120 kD eine starke und bei ~190 kD eine schwache Bande, die bei Zugabe von EDTA nicht sichtbar wurde. Diese Methode zeigt gegenüber den oben verwendeten Methoden den Vorteil, daß unspezifische Bindungen (fast) gänzlich unterbleiben.





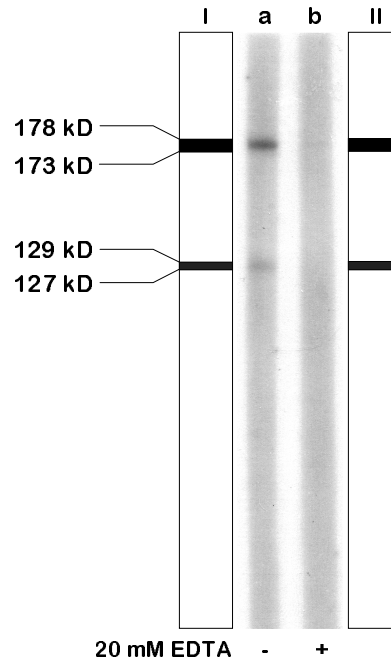
**Abb. 48:** Ligandenblot mit  $^{125}\text{I}$ -hLDL an bNNR. Autoradiographie.

Die Präparation der Membranen erfolgte direkt nach der Schlachtung. Elektrophorese nach Tritonextraktion und DEAE-Chromatographie. Blotting in Tank-Transferpuffer mit 20% Methanol. **I:** Größenzuordnung der Banden von a und b. **II:** Banden rezeptorvermittelter  $^{125}\text{I}$ -hLDL-Bindung. **a,b:**  $^{125}\text{I}$ -hLDL. **b:** Bindung in Anwesenheit von 20 mM EDTA.

Ligandenblottingexperimente mit  $^{125}\text{I}$ -cLDL und mit Triton X-100 solubilisierten Karpfenleber-Membranpräparationen nach DEAE-Chromatographie zeigten weder spezifische noch unspezifische Ligandenbindung, so daß davon ausgegangen werden mußte, daß die elektrophoretisch aufgetrennte Membranfraktion den Karpfen-LDL-Rezeptor nicht enthielt oder die Bindungsfähigkeit des Rezeptors durch die Behandlung der Membranen geschädigt wurde. Deshalb wurde in folgenden Experimenten auf die Zugabe von Methanol während des Blotting verzichtet und entgegen den Angaben von BEISIEGEL *et al.* (1982) versucht, den Rezeptor ohne Triton-Solubilisierung und DEAE-Chromatographie zu detektieren (s.o.).

Abbildung 49 zeigt deutlich, daß weder DEAE-Chromatographie der solubilisierten Membranen noch Methanol während der Blottingprozedur für die Detektion des Rezeptors notwendig sind.  $^{125}\text{I}$ -hLDL wurde wiederum an zwei Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts spezifisch gebunden, wobei es sich um dieselben Proteine handeln dürfte, die bereits in den Experimenten der Abbildungen 46, 47 und 48 vorgestellt wurden. Die Abweichung im apparenten Molekulargewicht ist sicherlich auf die veränderten Bedingungen während der Elektrophorese zurückzuführen. Bemerkenswert ist jedoch, daß

sich bei dieser Art der Präparation die Intensität der Banden in ihrem Verhältnis zueinander im Vergleich zur Präparation mit Triton X-100 und DEAE-Chromatographie entgegengesetzt verhält (vgl. Abb. 48).



**Abb. 49:** Ligandenblot mit  $^{125}\text{I}$ -hLDL an bNNR. Autoradiographie.

Die Präparation der Membranen erfolgte direkt nach der Schlachtung. Elektrophorese mit SDS-solubilisierten bNNR. Blotting in Tank-Transferpuffer ohne Methanol. I: Größenordnung der Banden von a und b. II: Banden rezeptorvermittelter  $^{125}\text{I}$ -hLDL-Bindung. a,b:  $^{125}\text{I}$ -hLDL. b: Bindung in Anwesenheit von 20 mM EDTA.

Die Autoradiographien legen nahe, daß in bNNR-Membranen zwei bindungskompetente Rezeptoren zur Bindung von LDL vorhanden sind. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Bindungsdaten aus Abbildung 27, die eine Bindung der  $^{125}\text{I}$ -hLDL an nur einem Rezeptormolekül nahelegen (vgl. auch Kap. 2.13). Weitere Untersuchungen zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden nicht unternommen, da der bovine LDL-Rezeptor nicht Hauptgegenstand dieser Untersuchungen war und nur zur Etablierung der Methode bzw. zum Vergleich der Ergebnisse herangezogen werden sollte. Als Hypothese für weiterführende Untersuchungen könnten folgende zwei Erklärungsmodelle dienen:

- Die vom C7 detektierte Bande bei 96 - 103 kD stellt ein Abbauprodukt des LDL-Rezeptors oder ein ähnlich strukturiertes, nicht-verwandtes Molekül dar. Das  $^{125}\text{I}$ -hLDL bindungskompetente Protein bei 120 - 130 kD ist ein Precursor des LDL-Rezeptors, der

in Vesikeln verpackt nicht zur Bindung des Liganden im Bindungsassay beiträgt. Durch Triton X-100 Extraktion und DEAE-Chromatographie wird dieser Precursor jedoch stark angereichert und ist mengenmäßig stärker als der reife LDL-Rezeptor vertreten. Die bei 170 - 190 kD detektierte Bande enthält den reifen LDL-Rezeptor.

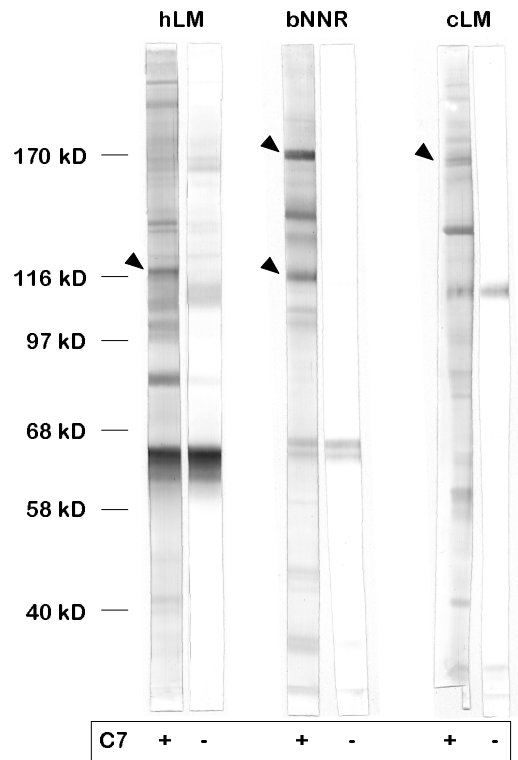
- Einfacher ist es hingegen die spezifisch detektierten Banden unterhalb von 170 kD als Proteolysefragmente bzw. Rezeptormoleküle, deren Kohlenhydratketten durch die methodischen Bedingungen der Solubilisation und DEAE-Chromatographie verkürzt worden sind, anzusehen (vgl. SCHNEIDER *et al.* 1982 und TOLLESHAUG *et al.* 1982)

Der zweite Erklärungsversuch steht mit den Angaben von BEISIEGEL *et al.* (1982) im Einklang (s.o.), die für den bLDLR unter nicht reduzierenden Bedingungen während der SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von 160 kD bestimmen konnten. Eine weitere Bande bei ca. 130 kD wird von den Autoren als Proteolysefragment oder modifiziertes Rezeptormolekül benannt.

Ligandenblotting mit  $^{125}\text{I}$ -cLDL an SDS-solubilierte Karpfen-Lebermembranen zeigten weder spezifische noch unspezifische Banden. Es muß also damit gerechnet werden, daß der Karpfen LDL-Rezeptor seine Bindungsfähigkeit durch die elektrophoretische Applikation mit anschließendem Blotting verliert. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, daß das Rezeptorprotein nicht durch SDS solubilisiert wurde und im Sammelgel verblieb, somit auch nicht geblottet wurde. Eine Anfärbung mit Coomassie zeigte jedoch gegenüber anderen Gelen keine erhöhte Farbintensität, so daß damit zu rechnen ist, daß sich der Rezeptor im Trenngel befand.

Obwohl für den gegen den bovinen LDL-Rezeptor gerichteten monoklonalen Antikörper C7 nur eine Kreuzreaktivität zum human LDLR beschrieben worden ist (BEISIEGEL *et al.* 1982), wurde daraufhin versucht, eine spezifische Bindung des Antikörpers auch für Membranen des Karpfen nachzuweisen. Die Möglichkeit, daß der monoklonale Antikörper C7 auch an LDL-Rezeptoren anderer Spezies bindet ist relativ hoch, da das Epitop des Antikörpers im Bereich der hoch-konservierten LDLR-Bindungsdomäne liegt (VAN DRIEL *et al.* 1987, vgl. SCHNEIDER 1989).

Dazu wurden Lebermembranen des Menschen, NNR-Membranen des Rindes und Lebermembranen des Karpfen mit SDS solubilisiert und nach SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen und Blotting (ohne Methanol) mit dem Antikörper beschickt (siehe Abb. 50).



**Abb. 50:** Detektion des LDL-Rezeptors durch Anti-hLDLR C7 in Blots von hLM, bNNR und cLM nach SDS-PAGE und Blotting).

Elektrophorese mit SDS-solubilierten Membranen. Blotting in Tank-Transferpuffer ohne Methanol. Detektion mit (+) bzw. ohne (-) den Primärantikörper C7. **hLM:** Der Pfeil zeigt auf eine spezifisch detektierte Bande (123 kD), die vermutlich dem hLDLR entspricht. **bNNR:** Die Pfeile zeigen auf Banden mit experimentell belegter Rezeptoraktivität (vgl. Abb. 49; 169 kD und 123 kD). **cLM:** Der Pfeil zeigt auf eine vom C7-Antikörper spezifisch detektierte Bande (167 kD), die vermutlich den Karpfen-LDLR beinhaltet. Nähere Angaben siehe Text.

Auf den ersten Blick ergibt sich bei den drei verschiedenen Wirbeltierspezies ein annähernd übereinstimmendes Bandenmuster. Obgleich bei den Blotstreifen der hLM mehrere spezifische Detektionsbanden zu beobachten sind, repräsentiert vermutlich nur die scharfe Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 132 kD den menschlichen LDL-Rezeptor. Unterstützt wird diese Annahme durch die Arbeit von DANIEL *et al.* (1983), die das apparente Molekulargewicht des hLDLR aus Fibroblasten unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit 130 kD und das Molgewicht des Precursors mit 90 kD angeben (vgl.

TOLLESHAUG *et al.* 1982). Die hier gezeigte Bande bei ~ 93 kD entspricht wahrscheinlich dem Precursormolekül des hLDLR.

Bei den bNNR-Membranen können die Banden bei 169 kD und 123 kD mit Sicherheit als LDL-bindende Proteine angesprochen werden, da in diesem Molekulargewichtsbereich bereits Bindungsaktivität mit <sup>125</sup>I-hLDL nachgewiesen wurde (Abb. 49). Die spezifisch markierte Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von 143 kD, die auch bei hLM (139 kD) und cLM (139 kD) gut ausgeprägt ist, kann hingegen nicht eindeutig zugeordnet werden.

In SDS-solubilisierten und transferierten Lebermembranen des Karpfen zeigt der gegen den bovinen LDL-Rezeptor gerichtete Antikörper C7 spezifische Bindung. Die detektierten Banden liegen in demselben apparenten Molekulargewichtsbereich wie die detektierten Banden in hLM und bNNR Präparationen (i.e. 167 kD, 139 kD). Eine weitere Bande mit einem Molekulargewicht von 118 kD muß hier als unspezifische Bindung angesprochen werden, da an dieser Stelle auch bei Inkubation ohne den Primärantikörper eine Färbung auftritt. Möglicherweise wird aber auch eine spezifisch markierte Bande durch Bindung der sekundären Antikörper an ein anderes Protein maskiert.

Der Versuch den Karpfen-LDL-Rezeptor nach SDS-PAGE und Blotting durch <sup>125</sup>I-markierte cLDL zu detektieren blieb erfolglos. Die Detektion spezifischer Banden mit dem C7-Antikörper lassen allenfalls Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten des Antikörpers zu, beweisen aber nicht die LDL-Bindungskompetenz spezifisch-detektierter Proteine. Geht man jedoch davon aus, daß der monoklonale Antikörper an einer konservativen Sequenz im LDL-Rezeptor bindet (s.o.), ist es durchaus möglich, daß zumindest die Proteinbande bei ~ 167 kD dem LDL-Rezeptor des Karpfen entspricht.

## 4 Zusammenfassende Diskussion

### 4.1 Vergleichende Diskussion der Bindungsparameter aller Experimente

Die rezeptorspezifischen Kenngrößen  $K_D$  und  $B_{max}$  aus allen hier durchgeführten Bindungsexperimenten sind zusammengefaßt in den Tabellen 35 und 36 aufgeführt. Darüber hinaus gibt Tabelle 37 Auskunft darüber, ob die ermittelten Werte für die Präparationen von Human-, Karpfen- und Forellen-LDL signifikant voneinander verschieden sind. Eine Diskussion der Einzelexperimente ist bereits in den vorhergehenden Kapiteln erfolgt, so daß an dieser Stelle nur eine zusammenfassende und vergleichende Übersicht gegeben werden soll.

**Tab. 35: Vergleich der  $K_D$ -Werte der Bindungsversuche.**

	<b>bNNR</b>	<b>cLM</b>	<b>hLM</b>	<b>tLM</b>
<sup>125</sup> I-hLDL	6,1 ± 1,2	n.sp.	87,9 ± 45,3	n.sp.
<sup>125</sup> I-cLDL	69,7 ± 16,6	142,0 ± 39,7	234,6 ± 99,3	97,5 ± 41,1
<sup>125</sup> I-tLDL	144,1 ± 52,5	150,7 ± 43,3	n.sp.	44,0 ± 25,0

n.sp.: nicht-spezifische Ligandenbindung

Zunächst einmal ist es erstaunlich, daß bei zwölf möglichen Kombinationen von Liganden und Membranpräparationen so verschiedener Wirbeltierklassen lediglich in drei Experimente nur eine nicht-spezifische Bindung der Liganden festgestellt werden konnte. Dieses gilt für die Bindung von <sup>125</sup>I-hLDL an isolierte Lebermembranen des Karpfen und der Forelle und für die Bindung von <sup>125</sup>I-tLDL an isolierte Lebermembranen des Menschen. Dagegen wurden die LDL des Karpfen, der Forelle und des Menschen alle rezeptorvermittelt an Membranpräparationen von Rinder-Nebennierenrinden gebunden.

Vergleicht man nun die  $K_D$ -Werte als Maß der Affinität des Liganden zu einer bestimmten Rezeptorpräparation aller Experimente untereinander, so stellt man fest, daß die  $K_D$ -Werte für die Bindung von <sup>125</sup>I-cLDL und <sup>125</sup>I-tLDL an Lebermembranen des Karpfen, sowie der Forelle und auch an Membranen der Rinder-Nebennierenrinde nicht signifikant verschieden sind. Für letzteren Membrantyp sind die  $K_D$ -Werte für diese Liganden aber signifikant größer als für <sup>125</sup>I-hLDL. Es muß deshalb vermutet werden, daß sich das Bindungsverhalten und damit auch LDL an sich innerhalb der Fische stärker ähneln als im Vergleich zu LDL der Säuger.

Eine Beurteilung der  $B_{\max}$ -Werte als Maß für die Rezeptordichte der Membranen ist aufgrund der anscheinend nicht systematisch erfolgenden Abweichungen stark erschwert. Die Erwartung, daß alle Rezeptor-bindenden Liganden trotz abweichender  $K_D$ -Werte prinzipiell denselben maximalen Bindungswert erreichen, kann nicht bestätigt werden (vgl. Tab. 36). Die hier beobachteten Schwankungen entsprechen aber den bereits besprochenen, in Veröffentlichungen dargestellten experimentellen Abweichungen, nach denen der  $B_{\max}$ -Wert von 200 bis 1400 ng LDL / mg Membranprotein für die Bindung von hLDL an bNNR-Membranen schwanken kann (siehe Kap. 3.3.1).

**Tab. 36: Vergleich der  $B_{\max}$ -Werte der Bindungsversuche.**

	<b>bNNR</b>	<b>cLM</b>	<b>hLM</b>	<b>tLM</b>
<sup>125</sup> I-hLDL	492,8 ± 24,5	n.sp.	227,2 ± 60,7	n.sp.
<sup>125</sup> I-cLDL	611,4 ± 60,4	3357,2 ± 494,7	984,2 ± 260,0	1072,7 ± 204,0
<sup>125</sup> I-tLDL	874,0 ± 167,0	830,7 ± 133,0	n.sp.	664,5 ± 124,0

n.sp.: nicht-spezifische Ligandenbindung

Die Unterschiede der  $B_{\max}$ -Werte für die Bindung aller Liganden an bNNR sind deshalb vermutlich auf experimentelle Schwankungen zurückzuführen, da zwar ein signifikanter Unterschied zwischen den  $B_{\max}$ -Werten für <sup>125</sup>I-hLDL und <sup>125</sup>I-tLDL, nicht aber für den Vergleich von <sup>125</sup>I-hLDL und <sup>125</sup>I-cLDL, sowie <sup>125</sup>I-cLDL und <sup>125</sup>I-tLDL besteht (vgl. Tab. 37). Der Unterschied der Ligandenbindung von LDL der beiden Fischarten an Karpfen-Lebermembranen hingegen kann nicht erklärt werden, liegt aber mit einem Unterschied um den Faktor vier in dem oben genannten Abweichungsbereich.

**Tab. 37: Signifikanzniveaus der Bindungsparameter im Vergleich zwischen den Plasmalipoprotein-Präparationen.**

	<sup>125</sup> I-hLDL vs. <sup>125</sup> I-cLDL		<sup>125</sup> I-hLDL vs. <sup>125</sup> I-tLDL		<sup>125</sup> I-cLDL vs. <sup>125</sup> I-tLDL	
	$K_D$	$B_{\max}$	$K_D$	$B_{\max}$	$K_D$	$B_{\max}$
<b>bNNR</b>	p<0,002	n.s.	p<0,02	p<0,05	n.s.	n.s.
<b>cLM</b>	-----	-----	-----	-----	n.s.	p<0,001
<b>hLM</b>	n.s.	p<0,02	-----	-----	-----	-----
<b>tLM</b>	-----	-----	-----	-----	n.s.	n.s.

n.s.: nicht signifikant; -----: kein Vergleich möglich, da für einen Liganden nur eine nicht-spezifische Ligandenbindung nachgewiesen werden konnte

Die Vorstellung, daß das Liganden-Rezeptor-System für Lipoproteine geringer Dichte in einem für Wirbeltiere gemeinsamen Vorfahren wurzelt, wird durch die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützt. Dabei muß dieses System bereits mit dem Auftreten der ersten Wirbeltiere im Untersilur vor ungefähr 500 Millionen Jahren etabliert worden sein (vgl. ROMER und PARSONS 1991), da Proteine der LDL-Rezeptorfamilie in allen Wirbeltierklassen nachzuweisen sind (vgl. Kap. 1.2). Der Befund, daß LDL einiger Spezies nicht universell an alle Membrantypen rezeptorvermittelt binden können, mag zum Teil in methodischen Faktoren begründet sein, ist aber vermutlich auch auf Spezies-spezifische Anpassungen zurückzuführen, die im Rahmen einer adaptiven Radiation zu Veränderungen im Rezeptor-Gen bzw. Apolipoprotein-B-Gen geführt haben. Der Befund, daß eine strenge Calcium-Abhängigkeit der Ligandenbindung nur bei der Bindung von Human-LDL an bNMR-Membranen beobachtet werden konnte, während beispielsweise die cLDL-Bindung an bNMR-Membranen offenbar nicht Calciumabhängig erfolgt, läßt in diesem Zusammenhang vermuten, daß die Ligandenbindung auf eine Eigenschaft sowohl des Rezeptors als auch des Apolipoprotein B zurückzuführen ist. Dabei scheint es so, daß evolutiv gesehen die Calciumsensitive Bindung des Liganden erst im LDL-LDLR-System der Säuger realisiert ist. Diese Eigenschaft ist vermutlich eher auf eine Veränderung des Apolipoprotein B als auf eine Veränderung des Rezeptors zurückzuführen, da nicht Calcium-‘stabilisierte’ LDL-Rezeptoren in Säugermembranen sehr wohl LDL von Fischen nicht aber von Säugern zu binden vermögen.

Der biochemisch-physiologische Nachweis LDL-bindender Proteine in Geweben ‘niederer’ Wirbeltiere kann also als Nachweis für die molekularbiologischen Untersuchungen dienen. Der zunächst gegenteilige Befund, nämlich daß  $^{125}\text{I}$ -hLDL nicht spezifisch an Membranpräparationen des Karpfen binden und Karpfen als Vertreter der Fische deshalb keinen LDL-Rezeptor besitzen, konnte revidiert werden. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß sowohl Karpfen als auch Forellen ein LDL-bindendes Protein mit hoher spezifischer Bindung nicht nur für arteigene sondern auch artfremde LDL-Präparationen besitzen.



## **4.2 Erweiterte Kritik ausgewählter methodischer Aspekte**

Da die hier vorgestellten Methoden für die Erstellung dieser Arbeit zunächst etabliert und modifiziert werden mußten, kann an dieser Stelle prinzipiell auf Abschnitte des Kapitels 'Material und Methoden' verwiesen werden, in denen größtenteils eine Einordnung und kritische Analyse der experimentellen Vorgehensweise bereits vorgenommen worden ist.

Im Folgenden sollen deshalb nur Aspekte behandelt werden, die möglicherweise Auswirkungen auf den Gesamtverlauf der vorliegenden Untersuchung hatten oder in Kapitel 2 inhaltlich keinen Platz fanden.

### **4.2.1 Präparation von isolierten Membranen**

Die Präparation der sogenannten Mikrosomenfraktion (700 bzw. 8.000 - 100.000 g) ist von mehreren Faktoren abhängig. Dazu gehören unter anderem die Art und Zusammensetzung des Gewebes, die unterschiedliche Verwendung und Handhabung von Homogenisatoren und der Einsatz von Geräten zum Resuspendieren von Gewebefragmenten (Ultraschall, Spritze mit Kanüle). Die einzelnen Arbeitsschritte sind dabei sehr von der Erfahrung im Umgang mit dem Material geprägt, so daß einheitliche Präparationen nur durch annähernd gleiche Arbeitsschritte angefertigt werden können.

Die hier untersuchten Präparationen sind alle von mir eigenhändig durchgeführt worden. Auf eine Charakterisierung der einzelnen Fraktionen wurde verzichtet, wohl in dem Bewußtsein, daß sich die einzelnen Präparationen geringfügig voneinander unterscheiden können. Als einheitliche Grundlage für die Verwendung in weiterführenden Experimenten diente die Proteinbestimmung (vgl. Kap. 4.2.3).

### **4.2.2 Präparation von Plasmalipoproteinen**

Zur Kritik der Plasmalipoprotein-Isolierung sei auf die Kapitel 2.4 und 3.2 verwiesen und an dieser Stelle nur kurz auf die Lagerung, die bereits teilweise abgehandelt wurde, eingegangen:

Neben der Isolierung ist die Lagerung eine die Bindungseigenschaften der Plasmalipoproteine beeinflussende, kritische Phase. Die Oxidation der Lipid- und Proteinkomponenten führt dazu, daß die Immunreaktivität bestimmter, exponiert liegender Epitope von Apolipoprotein B-100 abnimmt und die Bindungseigenschaften verändert werden (VALENTINOVA *et al.* 1994). Dabei verändert sich auch die Motilität von Apolipoprotein B in SDS-Page-Applikationen (COMINACINI *et al.* 1991).

Zumindest letzteres konnte bei den hier unter  $N_{2;gas}$  gelagerten Human-, Karpfen- und Forellen-LDL nicht beobachtet werden (vgl. Kap. 3.2). Bei Proben, die länger als 4 Wochen gelagert wurden, konnte jedoch teilweise ein Niederschlag festgestellt werden, der vermutlich auf Aggregation der Partikel zurückzuführen ist.

Grundsätzlich wurden aber nur Plasmalipoproteine zu Versuchen eingesetzt, die in zeitlich nahem Abstand zum Experiment präpariert worden waren. Der Einfluß der Lagerung ist somit als sehr gering einzustufen.

### **4.2.3 Proteinbestimmung**

Die aus den Proteinbestimmungen ermittelten Werte bilden die Grundlage aller hier durchgeführten Experimente (siehe Kap. 2.1). Eine vergleichende Analyse verschiedener Methoden der Proteinbestimmung wurde bereits in Kap. 3.1.2 und eine Analyse der unterschiedlichen Auswertungsmethoden der modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY in Kap. 3.1.1 vorgenommen. Abschließend seien deshalb nur allgemeine Anmerkungen zur Genauigkeit der Bestimmung des Proteingehalts durch relative Meßverfahren angeführt:

Die Durchführung relativer Meßverfahren zur Bestimmung des Proteingehalts biologischer Proben basiert auf der photometrischen bzw. fluorimetrischen Erfassung von Kopplungsprodukten der Proteine mit chromogenen Substanzen. Da aber nicht jeder der jeweiligen Methode zugrundeliegende Reaktionsmechanismus die Vielfalt der Proteine gleichermaßen gut abdeckt, kann es zu Differenzen der Proteingehaltsangaben zwischen verschiedenen Proteinen kommen. Das bedeutet, daß ein Protein 'A' durch eine bestimmte Proteinbestimmungsmethode gut erfaßt werden kann, dieselbe Methode jedoch bei einem

Protein 'B' Werte liefern kann, die weit entfernt vom 'wahren' Wert liegen (vgl. BROWN 1992).

Nach den Angaben verschiedener Autoren (zusammengefaßt von HENDERSON *et al.* 1990), wird z.B. der Proteingehalt von Apolipoprotein B in Human-LDL-Proben durch die Proteinbestimmung nach LOWRY *et al.* (1951) mit 7,5 - 30 % überbewertet, wenn BSA als Standardprotein eingesetzt wird. Inwiefern beispielsweise die Proteinbestimmung von Membranproteinen eine Abweichung vom 'wahren' Wert erfährt, ist meines Wissens nach nicht bekannt.

Die übliche Angabe von  $B_{\max}$  in [ng gebundener Ligand / mg Membranprotein] kann also, je nachdem ob die Bestimmung des Proteingehalts des Liganden und der Membranen gleichwertig oder verschiedenartig gewichtet erfolgt, unter Umständen zu einer Verzerrung des Wertes für die maximale Bindung führen und muß auf jeden Fall in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Proteinbestimmung interpretiert werden.

#### **4.2.4 <sup>125</sup>I- Markierung der Plasmalipoproteine**

Es liegen mehrere Untersuchungen zum Einfluß der Markierungsmethode mit <sup>125</sup>Iod auf die Bindungseigenschaften von LDL vor (RAMAKRISHNAN *et al.* 1990, SUNDARAM *et al.* 1972, SHEPHERD *et al.* 1976, VIRGOLINI *et al.* 1991). Dabei haben sowohl Bindungsstudien (VIRGOLINI *et al.* 1991) als auch Experimente zur Charakterisierung der <sup>125</sup>I-gekoppelten LDL durch Antikörper zeigen können (SHEPHERD *et al.* 1976), daß weder zwischen den verwendeten Markierungsmethoden noch zwischen nativen und <sup>125</sup>I-modifizierten LDL Unterschiede vorliegen, die eine Rezeptorbindung beeinflussen könnten. Ob diese Befunde auch auf die radioaktive Markierung von Karpfen-LDL zutreffen ist zwar nicht gesichert, kann aber als wahrscheinlich gelten.

Die Lagerung von <sup>125</sup>I-markierten LDL hingegen kann als kritisch betrachtet werden. Um den Einfluß der radioaktiven Strahlung auf die Komponenten der LDL möglichst gering zu halten (vgl. KHOUW *et al.* 1993), wurde zum Abfangen der Strahlung BSA hinzugegeben. Eine Veränderung der Bindungseigenschaften der LDL konnte innerhalb einer Woche nicht

festgestellt werden. Dieses Vorgehen entspricht den Angaben aus der Literatur (vgl. FAINARU *et al.* 1988).

#### 4.2.5 Vergleich der Auswertung von Bindungsexperimenten durch nicht-lineare Regression und durch den SCATCHARD-Plot

In Kapitel 2.12.4 wurden bereits die Gründe detailliert dargelegt, die für eine Berechnung der rezeptorspezifischen Bindungsparameter aus Bindungsexperimenten durch nicht-lineare Regression und gegen die Verwendung des SCATCHARD-Plots sprechen. Letzterer ist zumindest für eine bessere Visualisierung der Experimente noch häufig nachgefragt und wurde aus diesem Grund für jedes Experiment zusätzlich angefertigt. Ein Vergleich dieser beiden Methoden kann somit zusammenfassend vorgenommen werden:

- Die Abweichung aller  $K_D$ -Wertes aus Scatchard-Linearisierungen beträgt gegenüber allen  $K_D$ -Werten aus nicht-linearer Regression durchschnittlich  $43 \pm 70,9$  Prozent ( $n=27$ ). Dabei liegt die geringste Abweichung bei 2 % und stärkste Abweichung bei 353 %.
- Die Abweichung aller  $B_{\max}$ -Wertes aus Scatchard-Linearisierungen beträgt gegenüber allen  $B_{\max}$  -Werten aus nicht-linearer Regression durchschnittlich  $17 \pm 19,5$  Prozent ( $n=27$ ). Dabei liegt die geringste Abweichung bei 0 % und stärkste Abweichung bei 77 %.

Die Analyse zeigt, daß die Bestimmung der Rezeptordichte ( $B_{\max}$ ) im Scatchard-Plot weit zuverlässiger ist als die Bestimmung des  $K_D$ -Wertes. Jedoch ist eine durchschnittliche Abweichung von 17 % vom berechneten Wert aus nicht-transformierten Daten als inakzeptabel einzustufen.

Vergleicht man die Ligandenbindung von  $^{125}\text{I}$ -hLDL an bNNR-Membranen mit der Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an Karpfen-Lebermembranen ergibt sich, bezogen auf die Abweichung der Bindungsparameter aus dem SCATCHARD-Plot im Vergleich zu den Parametern aus nicht-linearer Regression, folgendes Bild:

- Die  $K_D$ -Werte der Experimente „ $^{125}\text{I}$ -hLDL - bNNR“ besitzen eine Abweichung von  $8 \pm 9,0$  % (Min: 2, Max: 21; n=4). Die  $K_D$ -Werte der Experimente „ $^{125}\text{I}$ -cLDL - cLM“ besitzen eine wesentlich höhere Abweichung von  $30 \pm 23,4$  % (Min: 3, Max: 71; n=9).
- Die  $B_{\max}$ -Werte der Experimente „ $^{125}\text{I}$ -hLDL - bNNR“ besitzen eine Abweichung von  $1 \pm 1,6$  % (Min: 0, Max: 3; n=4). Die  $B_{\max}$ -Werte der Experimente „ $^{125}\text{I}$ -cLDL - cLM“ besitzen wiederum eine wesentlich höhere Abweichung von  $15 \pm 10,3$  % (Min: 2, Max: 31; n=9).

Dieser Befund ist erstaunlich, da die Anpassungsgüte der Regressionsgeraden im SCATCHARD-Plot sich nicht unterschiedlich verhält. Vergleicht man nur die Experimente zum Einfluß der Membranpräparation und der Versuchstemperatur auf die Ligandenbindung miteinander, erhält man für die Anpassung der Regressionsgeraden für „ $^{125}\text{I}$ -hLDL - bNNR“-Experimente ein durchschnittliches  $r^2$  von  $0,783 \pm 0,074$  (n=4) und für „ $^{125}\text{I}$ -cLDL - cLM“-Experimente sogar ein etwas besseres durchschnittliches  $r^2$  von  $0,813 \pm 0,137$  (n=4).

Eine Begründung für die Abweichung der Parameter zwischen den Analysemethoden kann auch nicht auf eine schlechtere Anpassungsgüte im direkten Plot zurückgeführt werden, da der prozentuale Anteil der Standardabweichung zumindest für die oben beschriebenen Versuche nahezu identisch sind. Eine weitere Analyse dieses Befundes bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Die variierende Abweichung der Parameter aus den Linearisierungsplots nach SCATCHARD dokumentieren neben der Diskrepanz zur Auswertung der Daten durch nicht-lineare Regression, die Unzuverlässigkeit dieser Methode im Vergleich mehrerer Versuche. Es ist daher zu empfehlen, die Experimente aus den Bindungsassay, wie bereits mehrfach diskutiert, ausschließlich durch das Verfahren der nicht-linearen Regression auszuwerten.

Die Anpassung der Regressionskurve erfolgte in allen durchgeführten Experimenten mit weniger als zehn Iterationen. Dieses, im Vergleich zu anderen Programmen (SPSS, Prism), sehr strenge Konvergenzkriterium zeigt, daß nicht nur die experimentellen Daten von akzeptabler Qualität, sondern auch das angewendete mathematische Modell für ‘1 Ligand - 1 Rezeptor’ die Daten adäquat beschreibt (vgl. Kap. 2.13).

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Charakterisierung der Bindungseigenschaften des LDL-Rezeptors von Vertretern verschiedener Wirbeltierklassen mit besonderem Schwerpunkt auf Untersuchungen am Karpfen (*Cyprinus carpio*). Zusätzlich wurden Präparationen von Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) von Mensch, Forelle und Karpfen auf ihre Bindungsfähigkeit an Geweben von Mensch, Rind, Forelle und Karpfen überprüft.

Zu den Bindungseigenschaften des Karpfen-LDL-Rezeptors können folgende Aussagen getroffen werden:

1. In Membranpräparationen von Lebergewebe des Karpfen kann eine spezifische, rezeptorvermittelte Bindung von  $^{125}\text{I}$ -gekoppelte Karpfen-LDL (cLDL) nachgewiesen werden. Die dazu verwendeten Methoden wurden anhand bereits veröffentlichter Versuchsbeschreibungen mit Human-LDL an Membranen des Rinds etabliert und lieferten zu Werten aus der Literatur ähnliche Ergebnisse, so daß eine Vergleichbarkeit der Daten gewährleistet ist.
2. Der relative Rezeptorproteingehalt ist in Membranpräparationen der Karpfenleber von 8.000 - 100.000 g ungefähr dreimal höher als in Präparationen von 700 - 100.000 g.
3. Die gemessene maximale Bindungskapazität der Karpfen-Lebermembranen ist bei einer Versuchstemperatur von 37 °C vermutlich aufgrund einer höheren Rezeptordichte in den *coated pits* um den Faktor 1,7 höher als bei 4 °C.
4. Die Bindungseigenschaften des Rezeptors werden in zweisömmerigen Karpfen ( $K_2$ ) nicht durch die aufgenommene Futtermenge beeinflusst.
5. Die Bindungseigenschaften des LDL-Rezeptors sind bei an unterschiedliche Temperaturen langfristig angepaßten Karpfen verschieden. Lebermembranen von an 10 °C adaptierten Karpfen (n=3) besitzen einen Rezeptor mit einem  $K_D$  von  $79,9 \pm 62,2$   $\mu\text{g } ^{125}\text{I-cLDL} / \text{ml}$  und einem  $B_{\text{max}}$  von  $1361,5 \pm 684,4$   $\text{ng } ^{125}\text{I-cLDL} / \text{mg}$  Membranprotein. Für an 22 °C angepaßte Karpfen (n=3) hingegen konnte ein  $K_D$  von

$118,5 \pm 32,7 \mu\text{g } ^{125}\text{I-cLDL} / \text{ml}$  und ein  $B_{\text{max}}$  von  $2916,2 \pm 239,5 \text{ ng } ^{125}\text{I-cLDL} / \text{mg}$  Membranprotein ermittelt werden.

6. Bereits an den LDL-Rezeptor der Karpfenleber gebundene  $^{125}\text{I}$ -gekoppelte cLDL werden durch native LDL und VLDL des Karpfen kompetitiv verdrängt. Karpfen-HDL hingegen besitzen nur einen geringen Einfluß auf die Rezeptorbindung durch cLDL.
7. Die Ligandenbindung der cLDL ist nur teilweise EDTA-sensitiv und wird dementsprechend kaum durch EDTA beeinflusst. Die Ligandenbindung erfolgt also größtenteils Calcium-unabhängig.
8. Suramin hemmt die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -cLDL an den LDL-Rezeptor des Karpfen.
9. Der LDL-Rezeptor kann in solubilisierten Membranpräparationen nach SDS-PAGE und Elektrotransfer auf Nitrocellulose nicht durch Ligandenblotting nachgewiesen werden. Dagegen bindet der gegen den bovinen LDL-Rezeptor isolierte Antikörper C7 in diesen Präparationen vermutlich auch am LDL-Rezeptor des Karpfen.

Mit Ausnahme von Human- und Forellen-LDL sind alle hier verwendeten Membranpräparationen für  $^{125}\text{I}$ -gekoppelte LDL-Präparationen der Vertreter der verschiedenen Wirbeltierklassen prinzipiell bindungskompetent. Die Experimente zeigen, daß

10. die  $K_D$ -Werte für artfremde LDL-Präparationen zum Teil höher sind als für innerartliche LDL. Prinzipiell binden LDL von Fischen mit niedrigerer Affinität an Säuger-Membranpräparationen als Säuger-LDL und umgekehrt.
11. eine streng Calcium-abhängige LDL-Bindung an den LDL-Rezeptor bei den hier untersuchten Arten nur für die Bindung von Human-LDL an den bovinen LDL-Rezeptor gilt. Die Bindung von Fisch-LDL an Membranen von Fischen und an Membranen der hier untersuchten Säuger kann nicht vollständig durch EDTA unterbunden werden. Aufgrund dieses Befundes kann vermutet werden, daß die Calciumsensitivität der Ligandenbindung auf eine Eigenschaft, sowohl des Rezeptors, als auch des

Apolipoprotein B zurückgeht, die evolutiv gesehen vermutlich erst im Säugerorganismus realisiert ist.

12. Human-LDL nicht rezeptorvermittelt, sondern nur unspezifisch an Membranen von Forelle und Karpfen gebunden werden;

13. Forellen-LDL nicht rezeptorvermittelt, sondern nur unspezifisch an Human-Lebermembranen gebunden werden.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß sich das Lipid-Transportsystem von LDL und LDL-Rezeptor aus einem für die Wirbeltiere gemeinsamen Vorfahren entwickelt hat. Ein universelles Bindungsvermögen der LDL an Membranpräparationen aller Wirbeltiere kann hingegen, wohl aufgrund der adaptiven Radiation, nicht angenommen werden.

Die Untersuchungen wurden von einer kritischen Analyse der Auswertungsmethoden der Proteinbestimmung und der Rezeptorbindungsstudien begleitet, zu deren objektiven Durchführung zwei Computerprogramme entwickelt wurden.



## 6 Literaturverzeichnis

ALAUPOVIC P. (1980) The Concepts, Classification System, and Nomenclature of Human Plasma Lipoproteins. In: LEWIS LA, OPPLT JJ (eds.) CRC Handbook of Electrophoresis, Volume 1, pp. 27-46. Boca Raton: CRC press.

BALASUBRAMANIAM S, SZANTO A, ROACH PD. (1994) Circadian Rhythm in Hepatic Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Receptor Expression and Plasma LDL Levels. *Biochem J.* 298: 39-43.

BEISIEGEL U, SCHNEIDER WJ, BROWN MS, GOLDSTEIN JL. (1982) Immunoblot Analysis of Low Density Lipoprotein Receptors in Fibroblasts from Subjects with Familial Hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 257: 13150-13156.

BENSADOUN A, WEINSTEIN D. (1976) Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. *Anal Biochem.* 70: 241-250.

BILHEIMER DW, EISENBERG S, LEVY RI. (1972) The Metabolism of Very Low Density Lipoprotein Proteins. I. Preliminary *In Vitro* and *In Vivo* Observations. *Biochim Biophys Acta.* 260: 212-221.

BILLARD R. (1999) *Carp: Biology and Culture.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.

BOLTON AE, HUNTER WM. (1973) The Labelling of Proteins to High Specific Radioactivities by Conjugation to a <sup>125</sup>I-containing Acylating Agent. *Biochem J.* 133: 529-539.

BROHMER, P. (1988) *Fauna von Deutschland: ein Bestimmungsbuch unserer heimischen Tierwelt.* Heidelberg, Wiesbaden, Quelle und Meyer.

BROWN MS, GOLDSTEIN JL. (1974) Familial Hypercholesterolemia: Defective Binding of Lipoproteins to Cultured Fibroblasts Associated with Impaired Regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 71: 788-792.

BROWN MS, GOLDSTEIN JL. (1979) Receptor-Mediated Endocytosis: Insights from the Lipoprotein Receptor System. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76: 3330-3337.

BROWN MS, DANA SE, GOLDSTEIN JL. (1973) Regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity in Human Fibroblasts by Lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 70: 2162-2166.

BROWN MS, HERZ J, GOLDSTEIN JL (1997) Calcium Cages, Acid Baths and Recycling Receptors. *Nature.* 388: 629-630.

BROWN RA. (1992) An Appreciation of the Folin-Lowry Protein Assay. *J Pharm Pharmacol.* 44: 369.

BUJO H, HERMANN M, KADERLI MO, JACOBSEN L, SUGAWARA S, NIMPF J, YAMAMOTO T, SCHNEIDER WJ. (1994) Chicken Oocyte Growth is Mediated by an Eight Ligand Binding Repeat Member of the LDL Receptor Family. *EMBO J.* 13: 5165-5175.

CAMPBELL HD. (1983) The Lowry Protein Assay: Linearization of Standard Curve by Double Reciprocal Plot. *Analytical Letters.* 16: 1495-1507.

CHAPMAN MJ. (1980) Animal Lipoproteins: Chemistry, Structure, and Comparative Aspects. *J Lipid Res.* 21: 789-853.

CHEN WJ, GOLDSTEIN JL, BROWN MS. (1990) NPXY, A Sequence Often Found in Cytoplasmic Tails, is Required for Coated Pit-Mediated Internalization of the Low Density Lipoprotein Receptor. *J Biol Chem.* 265: 3116-3123.

CLARK S. (1984) Determination of Membrane Protein Concentration. In: Receptor Purification Procedures. pp. 149-161. New York: Alan R. Liss, Inc.

COMINACINI L, GARBIN U, DAVOLI A, MICCIOLO R, BOSELLO O, GAVIRAGHI G, SCURO LA, PASTORINO AM. (1991) A Simple Test for Predisposition to LDL Oxidation Based on the Fluorescence Development During Copper-Catalyzed Oxidative Modification. J Lipid Res. 32: 349-358.

CONTRERAS MA, BALE WF, SPAR IL. (1983). Iodine Monochloride (ICI) Iodination Techniques. Meth Enzymol. 92: 277-292.

COPPENS I, BASTIN P, OPPERDOES FR, BAUDHUIN P, COURTOY PJ. (1992) *Trypanosoma brucei brucei*: Antigenic Stability of Its LDL Receptor and Immunological Cross-reactivity with the LDL Receptor of the Mammalian Host. Exp Parasitol. 74: 77-86.

CORNISH-BOWDEN A. (1979) Fundamentals of Enzyme Kinetics. London: Butterworth.

CUMMINGS RD, KORNFELD S, SCHNEIDER WJ, HOBGOOD KK, TOLLESHAUG H, BROWN MS GOLDSTEIN JL. (1983) Biosynthesis of N- and O-linked Oligosaccharides of the Low Density Lipoprotein Receptor. J Biol Chem. 258: 15261-15273.

DANIEL TO, SCHNEIDER WJ, GOLDSTEIN JL, BROWN MS. (1983) Visualization of Lipoprotein Receptors by Ligand Blotting. J Biol Chem. 258: 4606-4611.

DAVIS CG, GOLDSTEIN JL, SUDHOF TC, ANDERSON RG, RUSSELL DW, BROWN MS. (1987) Acid-dependent Ligand Dissociation and Recycling of LDL Receptor Mediated by Growth Factor Homology Region. Nature. 326: 760-765.

DERANLEAU DA. (1969) Theory of the Measurement of Weak Molecular Complexes. I. General Considerations. J Am Chem Soc. 91: 4044-4049.

DI CROCE L, BRUSCALUPI G, TRENTALANCE A. (1997) Independent Responsiveness of Frog Liver Low-Density Lipoprotein Receptor and HMGCoA Reductase to Estrogen Treatment. Pflügers Arch - Eur J Physiol. 435: 107-111.

DOLPHIN PJ. (1985) Lipoprotein Metabolism and the Role of Apolipoproteins as Metabolic Programmers. Can J Biochem Cell Biol. 63: 850-869.

DUGGLEBY RG. (1981) A Nonlinear Regression Program for Small Computers. Anal Biochem. 110: 9-18.

EVANS WH, GRAHAM JM. (1991) Struktur und Funktion biologischer Membranen. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

FAINARU M, SCHAFFER Z, GAVISH D, HAREL A, SCHWARTZ M. (1988) Interactions between Human and Carp (*Cyprinus carpio*) Low Density Lipoproteins (LDL) and LDL Receptors. Comp Biochem Physiol [B]. 91: 331-338.

FASS D, BLACKLOW S, KIM PS, BERGER JM. (1997) Molecular Basis of Familial Hypercholesterolaemia from Structure of LDL Receptor Module. Nature. 388: 691-693.

FELDMAN HA. (1972) Mathematical Theory of Complex Ligand-Binding Systems at Equilibrium: Some Methods for Parameter Fitting. Anal Biochem. 48: 317-338.

FELDMAN HA. (1983) Statistical Limits in Scatchard Analysis. J Biol Chem. 258: 12865-12867.

FÖRSTER E, RÖNZ B. (1979) Methoden der Korrelations- und Regressionsanalyse - Ein Leitfaden für Ökonomen. Berlin: Verlag Die Wissenschaft.

FRYER HJL, DAVIS GE, MANTHORPE M, VARON S. (1986) Lowry Protein Assay Using an Automatic Microtiter Plate Spectrophotometer. Anal Biochem. 153: 262-266.

- FUNG KP, LEE J. (1991) BASIC Program for Polynomial Regression and Smoothing. CABIOS. 7: 103-104.
- GEORGE R, BARBER DL, SCHNEIDER WJ. (1987) Characterization of the Chicken Oocyte Receptor for Low and Very Low Density Lipoproteins. J Biol Chem. 262: 16838-16847.
- GJØEN T, BER T. (1992) Metabolism of Low Density Lipoproteins in Rainbow Trout. Fish Physiol Biochem. 9: 453-461.
- GOERLICH R. (1983) Untersuchungen zur Immunantwort beim Karpfen (*Cyprinus carpio*, L.) unter besonderer Berücksichtigung des Temperatureinflusses. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- GOLDSTEIN JL, ANDERSON RGW, BROWN MS. (1979) Coated Pits, Coated Vesicles, and Receptor-mediated Endocytosis. Nature. 279: 679-685.
- GRANT KI. (1990) LOWRY - A Simple BASIC Program for the Analysis of Protein Assays over a Wide Range of Concentrations. Comp Methods Programs in Biomed. 31: 237-242.
- GRIMM H, RECKNAGEL R-D. (1985) Grundkurs Biostatistik. Thun: Verlag Harri Deutsch.
- HANES CS. (1932) The Effect of Starch Concentration upon the Velocity of Hydrolysis by the Amylase of Germinated Barley. Biochem J. 26:1406-1421.
- HARRINGTON, CR. (1990) Lowry Protein Assay Containing Sodium Dodecyl Sulfate in Microtiter Plates for Protein Determinations on Fractions from Brain Tissue. Anal Biochem. 186: 285-287.
- HAVEL RJ, EDER HA, BRAGDON JH. (1955) The Distribution and Chemical Composition of Ultracentrifugally Separated Lipoproteins in Human Serum. J Clin Invest. 34: 1345-1353.
- HENDERSON LO, POWELL MK, SMITH SJ, HANNON WH, COOPER GR, MARCOVINA SM. (1990) Impact of Protein Measurements on Standardization of Assay of Apolipoproteins A-I and B. Clin Chem. 36: 1911-1917.
- HERZ J, HAMANN U, ROGNE S, MYKLEBOST O, GAUSEPOHL H, STANLEY KK. (1988) Surface Location and High Affinity for Calcium of a 550-kd Liver Membrane Protein Closely Related to the LDL-Receptor Suggest a Physiological Role as Lipoprotein Receptor. EMBO J. 7: 4119-4127.
- HOEG JM, DEMOSKY SJ JR, LACKNER KJ, OSBORNE JC JR, OLIVER C, BREWER HB JR. (1986) The Expressed Human Hepatic Receptor for Low-Density Lipoproteins Differs from the Fibroblast Low-Density Lipoprotein Receptor. Biochim Biophys Acta. 876: 13-21.
- HOHENEGGER M, MATYASH M, POUSSU K, HERRMANN-FRANK S, SARKÖZI S, LEHMANN-HORN F, FREISSMUTH M. (1996) Activation of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor by Suramin and Suramin Analogs. Mol Pharmacol. 50: 1443-1453.
- HOLTZHAUER M. (1988) Biochemische Labormethoden. Arbeitsvorschriften und Tabellen. Berlin: Springer Verlag.
- HUI DY, BRECHT WJ, HALL EA, FRIEDMAN G, INNERARITY TL, MAHLEY RW. (1986) Isolation and Characterization of the Apolipoprotein E Receptor from Canine and Human Liver. J Biol Chem. 261: 4256-4267.
- HULME EC. (1992) Receptor-Ligand Interactions: A Practical Approach. Oxford: IRL Press.
- HUNTER WM, GREENWOOD FC. (1962) Preparation of Iodine-131 Labelled Human Growth Hormone of High Specific Activity. Nature. 194: 495-496.

INNERARITY TL, MAHLEY RW. (1978) Enhanced Binding by Cultured Human Fibroblasts of Apo-E-Containing Lipoproteins as Compared with Low Density Lipoproteins. *Biochemistry*. 17: 1440-1447.

JOHNSTON A. (1985) SIMP: A Computer Program in BASIC for Nonlinear Curve Fitting. *J Pharm Meth*. 14: 323-329.

KEMNITZ F, ENGELHARD R. (1980) Große mathematische Formelsammlung - Mathematische und naturwissenschaftliche Tafeln. 2. verbesserte Auflage. Braunschweig: Friedr. Vieweg & Sohn.

KERMODE, JC. (1989) The Curvilinear Scatchard Plot: Experimental Artifact or Receptor Heterogeneity? *Biochem Pharmacol*. 38: 2053-2060.

KHOUW AS, PARTHASARATHY S, WITZTUM JL. (1993) Radioiodination of Low Density Lipoprotein Initiates Lipid Peroxidation: Protection by Use of Antioxidants. *J Lipid Res*. 34: 1483-1496.

KLOTZ IM. (1982) Numbers of Receptor Sites from Scatchard Graphs: Facts and Fantasies. *Science*. 217: 1247-1249.

KOOLMAN J, RÖHM K-H. (1994) Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

KOVANEN PT, FAUST JR, BROWN MS, GOLDSTEIN JL. (1979a) Low Density Lipoprotein Receptors in Bovine Adrenal Cortex. I. Receptor-Mediated Uptake of Low Density Lipoprotein and Utilization of Its Cholesterol for Steroid Synthesis in Cultured Adrenocortical Cells. *Endocrinology*. 104: 599-609.

KOVANEN PT, BASU SK, GOLDSTEIN JL, BROWN MS. (1979b) Low Density Lipoprotein Receptors in Bovine Adrenal Cortex. II. Low Density Lipoprotein Binding to Membranes Prepared from Fresh Tissue. *Endocrinology*. 104: 610-616.

LASKEY RA, MILLS AD. (1975) Quantitative Film Detection of  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  in Polyacrylamide Gels by Fluorography. *Eur J Biochem*. 56: 335-341.

LAEMMLI UK. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

LEATHERBARROW RJ. (1990) Using Linear and Non-Linear Regression to Fit Biochemical Data. *TIBS*. 15: 455-458.

LEGLER G, MÜLLER-PLATZ CM, MENTGES-HETTKAMP M, PFLIEGER G, JÜLICH E. (1985) On the Chemical Basis of the Lowry Protein Determination. *Anal Biochem*. 150: 278-287.

LEHRMAN MA, RUSSELL DW, GOLDSTEIN JL, BROWN MS. (1987) Alu-Alu Recombination Deletes Splice Acceptor Sites and Produces Secreted Low Density Lipoprotein Receptor in a Subject with Familial Hypercholesteremia. *J Biol Chem*. 262: 3354-3361.

LINWEAVER H, BURK D. (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J Am Chem Soc*. 56: 658-666.

LOBEMEIER M. (1999) A Non-Linear Regression Program for the Evaluation of Ligand-Receptor Interactions in the Microsoft Excel Environment. *Gött Neurobiol Rep*, Vol. II, Nr. 761. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

LOBEMEIER M. (2000) Linearization Plots: Time for Progress in Regression. *HMS Beagle: The BioMedNet Magazine* ([http://www.biomednet.com/hmsbeagle/73/viewpts/op\\_ed](http://www.biomednet.com/hmsbeagle/73/viewpts/op_ed)). Issue 73.

LOBEMEIER M, WODTKE E. (1999) Characterization of the LDL-Receptor in Carp (*Cyprinus carpio*). *Zoology*. 102, Suppl. II: 68.

- LOWRY OJ, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- MAÑANÓS EL, NÚÑEZ RODRÍGUEZ J, LE MENN F, ZANUY S, CARRILLO M. (1997) Identification of Vitellogenin Receptors in the Ovary of a Teleost Fish, the Mediterranean Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Reprod Nutr Dev.* 37: 51-61.
- MARCHALONIS JJ. (1969) An Enzymic Method for the Trace Iodination of Immunoglobulins and Other Proteins. *Biochem J.* 113: 299-305.
- MARKWELL MAK, HAAS SM, BIEBER LL, TOLBERT NE. (1978) A Modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples. *Anal Biochem.* 87: 206-210.
- MARTTILA ONT, NIKINMAA M. (1989) Effects of Membrane-Perturbing Drugs and Noradrenalin on cAMP Accumulation and Water Content in Carp (*Cyprinus carpio*) Red Cells. *Comp Biochem Physiol A.* 92: 263-266.
- McFARLANE AS. (1958) Efficient Trace-labelling of Proteins with Iodine. *Nature.* 182: 53.
- MENRAD A. (1989) Charakterisierung des menschlichen LDL-Rezeptorsystems. Dissertation, Universität Stuttgart.
- METHA KD, CHEN W-J, GOLDSTEIN JL, BROWN MS. (1991) The Low Density Lipoprotein Receptor in *Xenopus laevis*. I. Five Domains that Resemble the Human Receptor. *J Biol Chem.* 266: 10406-10414.
- MEHTA KD, CHANG R, NORMAN J. (1996) *Chiloscyllium plagiosum* Low-Density Lipoprotein Receptor: Evolutionary Conservation of Five Different Functional Domains. *J Mol Evol.* 42: 264-272.
- MEYER V. (1977) Atlas zur Anatomie und Morphologie der Nutzfische - Band 5: *Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758. Hamburg: Verlag Paul Parey.
- MILLS GB, ZHANG N, MAY C, HILL M, CHUNG A. (1990) Suramin Prevents Binding of Interleukin 2 to its Cell Surface Receptor: A Possible Mechanism for Immunosuppression. *Cancer Res.* 50: 3036-3042.
- MILLS GL, LANE PA, WEECH PK. (1984) A Guidebook to Lipoprotein Technique. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- MOTULSKY H. (1998) Comparing Dose-Response or Kinetic Curves with GraphPad Prism. In HMS Beagle: The BioMedNet Magazine (<http://hmsbeagle.com/hmsbeagle/34/booksoft/softsol.htm>). Issue 34.
- MOTULSKY HJ, RANSNAS LA. (1987) Fitting Curves to Data Using Nonlinear Regression: A Practical and Nonmathematical Review. *FASEB J.* 1: 365-374.
- MUNSON PJ, RODBARD D. (1980) LIGAND: A Versatile Computerized Approach for Characterization of Ligand-Binding Systems. *Anal Biochem.* 107: 220-239.
- MYANT NB. (1990) Cholesterol Metabolism, LDL, and the LDL Receptor. San Diego: Academic Press.
- NOVAK S, HIESBERGER T, SCHNEIDER WJ, NIMPF J. (1996) A New Low Density Lipoprotein Receptor Homologue with 8 Ligand Binding Repeats in Brain of Chicken and Mouse. *J Biol Chem.* 271: 11732-11736.
- PAGE A. (1987) A Non-Linear Regression Program in BASIC for Estimating  $K_m$  and  $V_{max}$ . *CABIOS.* 3: 49-51.

- PENZLIN H. (1996) Lehrbuch der Tierphysiologie. 6. Auflage. Jena: Gustav Fischer Verlag.
- PETERSON GL. (1979) Review of the Folin Phenol Quantitation Method of LOWRY, ROSEBROUGH, FARR and RANDALL. Anal Biochem. 100: 201-220.
- PRUDENZI PS. (1997) VBA mit Excel 97 lernen. Bonn: Addison Wesley Longman GmbH.
- RAMAKRISHNAN R, ARAD Y, WONG S, GINSBERG HN. (1990) Nonuniform Radiolabeling of VLDL Apolipoprotein B: Implications for the Analysis of Studies of the Kinetics of the Metabolism of Lipoproteins Containing Apolipoprotein B. J Lipid Res. 31: 1031-1042.
- RHOADES R, PFLANZER R. (1989) Human Physiology. Philadelphia: Saunders College Publishing.
- RODRÍGUEZ-VICO F, MARTÍNEZ-CAYUELA M, GARCÍA-PEREGRÍN E, RAMÍREZ H. (1989) A Procedure for Eliminating Interferences in the Lowry Method of Protein Determination. Anal Biochem. 183: 275-278.
- ROMER AS, PARSONS TS. (1991) Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere. 5. Auflage. Hamburg, Berlin: Verlag Paul Parey.
- ROMER A. (1984) 50 BASIC-Programme: Der Computer als Hilfe in Unterricht und Praxis. Mannheim: Bibliographisches Institut.
- ROSENTHAL HE. (1967) A Graphic Method for the Determination and Presentation of Binding Parameters in a Complex System. Anal Biochem. 20: 525-532.
- RUSLING JF, KOMUSINSKI TF. (1996) Nonlinear Computer Modeling of Chemical and Biochemical Data. San Diego, London: Academic Press.
- RUSSELL DW, SCHNEIDER WJ, YAMAMOTO T, LUSKEY KL, BROWN MS, GOLDSTEIN JL. (1984) Domain Map of the LDL Receptor: Sequence Homology with the Epidermal Growth Factor Precursor. Cell. 37: 577-85.
- SAITO A, PIETROMONACO S, LOO AK-C, FARQUHAR MG. (1994) Complete Cloning and Sequencing of Rat gp330/"megalin", a Distinctive Member of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family. Proc Natl Acad Sci USA. 91: 9725-9729.
- SAPPINGTON TW, RAIKHEL AS. (1998) Ligand-Binding Domains in Vitellogenin Receptors and Other LDL-Receptor Family Members Share a Common Ancestral Ordering of Cysteine-Rich Repeats. J Mol Evol. 46: 476-487.
- SAPPINGTON TW, KOKOZA VA, CHO W-L, RAIKHEL AS. (1996) Molecular Characterization of the Mosquito Vitellogenin Receptor Reveals Unexpected High Homology to the *Drosophila* Yolk Protein Receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 93: 8934-8939.
- SCATCHARD G. (1949) The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. Ann NY Acad Sci. 51: 660-672.
- SCHÄPERCLAUS W. (1954) Fischkrankheiten. 3. Auflage. Berlin: Akademie-Verlag.
- SCHNEIDER WJ. (1989) The Low Density Lipoprotein Receptor. Biochim Biophys Acta. 988: 303-317.
- SCHNEIDER WJ, BASU SK, MCPHAUL MJ, GOLDSTEIN JL, BROWN MS. (1979) Solubilization of the Low Density Lipoprotein Receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 76: 5577-5581.
- SCHNEIDER WJ, BEISIEGEL U, GOLDSTEIN JL, BROWN MS. (1982) Purification of the Low Density Lipoprotein Receptor, an Acidic Glycoprotein of 164,000 Molecular Weight. J Biol Chem. 257: 2664-2673.

- SCHONBAUM CP, LEE S, MAHOWALD AP. (1995) The *Drosophila* Yolkless Gene Encodes a Vitellogenin Receptor Belonging to the Low Density Lipoprotein Receptor Superfamily. Proc Natl Acad Sci USA. 92: 1485-1489.
- SCOPES RK. (1987) Protein Purification – Principles and Practice. 2<sup>nd</sup> edition. New York: Springer Inc.
- SHEN BW, SCANU AM, KÉZDY FJ. (1977) Structure of Human Serum Lipoproteins Inferred from Compositional Analysis. Proc Natl Acad Sci USA. 74: 837-841.
- SHEPHERD J, BEDFORD DK, MORGAN HG. (1976) Radioiodination of Human Low Density Lipoprotein: A Comparison of Four Methods. Clin Chim Acta. 66: 97-109.
- SKINNER ER, ROGIE A. (1978) The Isolation and Partial Characterization of the Serum Lipoproteins and Apolipoproteins of the Rainbow Trout. Biochem J. 179: 507-520.
- SOUTAR AK, HARDERS-SPENGLER K, WADE DP, KNIGHT BL. (1986) Detection and Quantitation of Low Density Lipoprotein (LDL) Receptors in Human Liver by Ligand Blotting, Immunoblotting, and Radioimmunoassay. J Biol Chem. 261: 17127-17133.
- STANLEY KK, KOCHER HP, LUZIO JP, JACKSON P, TSCHOPP J. (1985) The Sequence and Topology of Human Complement Component C9. EMBO J. 4: 375-382.
- STAUFFER CE. (1975) A Linear Standard Curve for the Folin Lowry Determination of Protein. Anal Biochem. 69: 646-648.
- STEFFENS, W. (1980) Der Karpfen. 5. Auflage. Wittenberg: A. Ziemsen Verlag.
- STENFLO J, OHLIN AK, OWEN WG, SCHNEIDER WJ. (1988) Beta-Hydroxyaspartic Acid or Beta-Hydroxyasparagine in Bovine Low Density Lipoprotein Receptor and in Bovine Thrombomodulin. J Biol Chem. 263: 21-24.
- STEYRER E, BARBER DL, SCHNEIDER WJ. (1990) Evolution of Lipoprotein Receptors. J Biol Chem. 265: 19575-19581.
- STEYRER E, KOSTNER GM, SCHNEIDER WJ. (1995) A Double Labeling Procedure for Lipoproteins: Independent Visualization of Dual Ligand-Receptor Interaction with Colloidal Gold- and <sup>125</sup>I-Labeled Ligands. Anal Biochem. 226: 44-50.
- STIFANI S, LE MENN F, NÚÑEZ RODRÍGUEZ J, SCHNEIDER WJ. (1990) Regulation of Oogenesis: The Piscine Receptor for Vitellogenin. Biochim Biophys Acta. 1045: 271-279.
- STRYER L. (1988) Biochemistry. New York: W.H. Freeman and Company.
- SUELTER CH. (1990) Experimentelle Enzymologie (Grundlagen für die Laborpraxis). Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag
- SULISTİYANI, ST. CLAIR RW. (1991) The Method of Isolation of Primary Cells and Their Subculture Influences the Expression of LDL Receptors on Pigeon and Chicken Embryo Cells in Culture. Atherosclerosis. 91: 123-135.
- SUNDARAM GS, SODHI HS, BHATNAGAR R. (1972) Comparison of Methods for Iodinating Plasma Lipoproteins. Clin Chim Acta. 39: 115-123.
- SUZUKI T, RIGGS AF. (1993) Linker Chain L1 of Earthworm Hemoglobin: Structure of Gene and Protein: Homology with Low Density Lipoprotein Receptor. J Biol Chem. 268: 13548-13555.
- SWANSTROM R, SHANK PR. (1978) X-Ray Intensifying Screens Greatly Enhance the Detection by Autoradiography of the Radioactive Isotopes <sup>32</sup>P and <sup>125</sup>I. Anal Biochem. 86: 184-192.

TAKAHASHI S, KAWARABAYASI Y, NAKAI T, SAKAI J, YAMAMOTO T. (1992) Rabbit Very Low Density Lipoprotein Receptor: A Low Density Lipoprotein Receptor-like Protein with Distinct Ligand Specificity. Proc Natl Acad Sci USA. 89: 9252-9256.

TEICHERT T. (1988) Untersuchungen zum hepatischen Cholesterollowerstand unterschiedlich Temperatur-angepaßter Karpfen (*Cyprinus carpio* L.). Dissertation, Universität Kiel.

TEICHERT T, WODTKE E. (1992) Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase and 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase in Carp-liver Microsomes: Effect of Cold Acclimation on Enzyme Activities and on Hepatic and Plasma Lipid Composition. Biochim Biophys Acta. 1165: 211-221.

TOLLESHAUG H, GOLDSTEIN JL, SCHNEIDER WJ, BROWN MS. (1982) Posttranslational Processing of the LDL Receptor and Its Genetic Disruption in Familial Hypercholesterolemia. Cell. 30: 715-724.

TOLLESHAUG H, HOBGOOD KK, BROWN MS, GOLDSTEIN JL. (1983) The LDL Receptor Locus in Familial Hypercholesterolemia: Multiple Mutations Disrupt Transport and Processing of a Membrane Receptor. Cell. 32: 941-951.

URIZZI P, SOUCHARD JP, TAFANI JAM, COULAIS Y, NEPVEU F. (1997) Attachment of Radiometals to LDL with Lipid Analogues of EDTA or DTPA Type Complexing Agents. Comparison of Two Labeling Procedures. J Chim Phys. 94: 371-375.

VALENTINOVA NV, GU Z-W, YANG M, YANUSHEVSKAYA EV, ANTONOV IV, GUYTON JR, SMITH CV, GOTTO AM JR, YANG C-Y. (1994) Immunoreactivity of Apolipoprotein B-100 in Oxidatively Modified Low Density Lipoprotein. Biol Chem Hoppe-Seyler. 375: 651-658.

VAN DRIEL IR, GOLDSTEIN JL, SÜDHOF TC, BROWN MS. (1987) First Cysteine-Rich Repeat in Ligand-Binding Domain of Low Density Lipoprotein Receptor Binds  $Ca^{2+}$  and Monoclonal Antibodies, but not Lipoproteins. J Biol Chem. 262: 17443-17449.

VIRGOLINI I, ANGELBERGER P, LUPATELLI G, LI S, PIDLICH J, MOLINARI E, SINZINGER H. (1991) Comparison of Different Methods for LDL Isolation and Radioiodination on Liver Receptor Binding *In Vitro*. Nucl Med Biol. 18: 513-517.

WADE DP, KNIGHT BL, SOUTAR AK. (1985) Detection of the Low-Density-Lipoprotein Receptor with Biotin-Low-Density Lipoprotein. Biochem J. 229: 785-790.

WANG C-S, SMITH RL. (1975) Lowry Determination of Protein in the Presence of Triton X-100. Anal Biochem. 63: 414-417.

WEBER K, OSBORN M. (1969) The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J Biol Chem. 244: 4406-4412.

WEHNER R, GEHRING W. (1990) Zoologie. 22. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

WESSEL GM. (1995) A Protein of the Sea Urchin Cortical Granules is Targeted to the Fertilization Envelope and Contains an LDL-Receptor-like Motif. Dev Biol. 167: 388-397.

WESTERMEIER R. (1990) Elektrophorese-Praktikum. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.

WILKINSON GN. (1961) Statistical Estimations in Enzyme Kinetics. Biochem J. 80: 324-332.

WODTKE E, COSSINS AR. (1991) Rapid Cold-Induced Changes of Membrane Order and  $\Delta^9$ -Desaturase Activity in Endoplasmic Reticulum of Carp Liver: A Time-Course Study of Thermal Acclimation. Biochim Biophys Acta. 1064: 343-350.

WODTKE E, THUN R. (1990) Charakterisierung der Plasmalipoproteine in warm- und kalt-angepaßten Karpfen (*Cyprinus carpio* L.). In: Verh Dtsch Zool Ges 1990. 563. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.



YAMAMOTO T, DAVIS CG, BROWN MS, SCHNEIDER WJ, CASEY ML, GOLDSTEIN JL, RUSSELL DW. (1984) The Human LDL Receptor: A Cysteine-Rich Protein with Multiple Alu Sequences in Its mRNA. Cell. 39: 27-38.

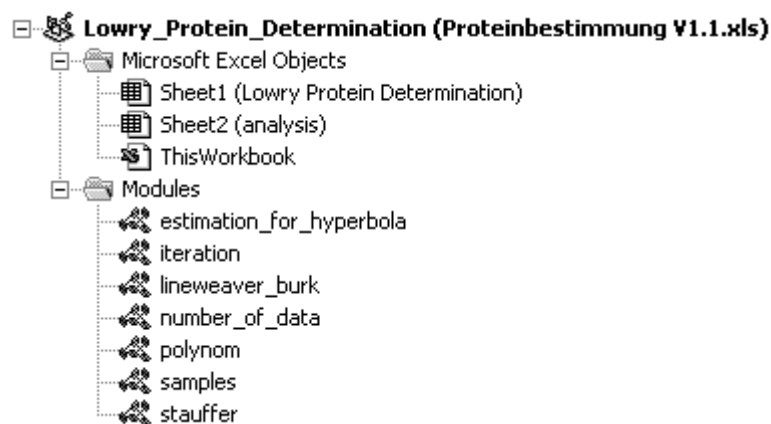
YOCHEM J, GREENWALD I. (1993) A Gene for a Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci USA. 90: 4572-4576.

## 7 Anhang

### 7.1 Das Programm Lowry for Excel 97

#### 7.1.1 Allgemeiner Programmaufbau

*Lowry for Excel 97* besitzt die in Abbildung 51 dargestellte Programmstruktur. Der Aufbau der beiden Tabellenblätter *Lowry Protein Determination* und *analysis* muß aus den Abbildungen 10 und 11 übernommen werden, um einen fehlerfreien Programmablauf zu gewährleisten.



**Abb. 51: Programmierstruktur des Programms Proteinbestimmung (Lowry for Excel 97).**

Im Gegensatz zu *Hyperbola for Excel 97* wird die Berechnung der Anpassungen automatisch und ohne Möglichkeit der Einflußnahme während des Programmablaufs durchgeführt. Dazu werden einzelne Module, denen jeweils eine bestimmte Aufgabe zugeordnet ist, aufgerufen:

**Tab. 38: Name und Funktion der *Lowry for Excel 97* Module**

Name des Moduls	Funktion
estimation_for_hyperbola	Berechnung der ersten Näherung der Parameter für eine rechtwinklige Hyperbel nach Cornish-Bowden
iteration	Anpassung einer rechtwinkligen Hyperbel und Berechnung der Parameter durch nichtlineare Regression
lineweaver_burk	Berechnung einer Regressionsgeraden in einem doppelt reziproken Plot nach CAMPBELL
number_of_data	Bestimmung der Anzahl der eingegebenen Datenpunkte
polynom	Berechnung eines Regressionspolynoms 4. Grades
samples	Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben für die verschiedenen Anpassungen
stauffer	Berechnung einer Regressionsgeraden in einem doppelt logarithmischen Plot nach STAUFFER

### 7.1.2 Elemente im Tabellenblatt *Sheet1 (Lowry Protein Determination)*

Die Eigenschaften des *CommandButton1* sind in Abbildung 52 zusammengefaßt und entsprechen größtenteils den von Excel vorgeschlagenen Grundeinstellungen. Die Position dieses Elementes kann beliebig gewählt werden und beeinträchtigt die Funktion des Programms nicht; es erscheint jedoch sinnvoll die angegebenen Werte nicht zu verändern, da sich der Befehlsknopf gut in den Tabellenaufbau einordnet.

Das auf diesem Tabellenblatt enthaltene VBA-Skript verwaltet als Stapeldatei den Ablauf der einzelnen Module. Darüber hinaus übernimmt es die Variablenzuordnung der vom Anwender in *Sheet1* eingetragenen Werte. Weitere Erläuterungen finden sich im Skript; es lautet:

```
Dim srange(12)
Dim dilution(12) As Single
Dim s(12) As Double
Dim cell(9) As Variant
Public bckgrnd As Double

Private Sub Worksheet_Activate()

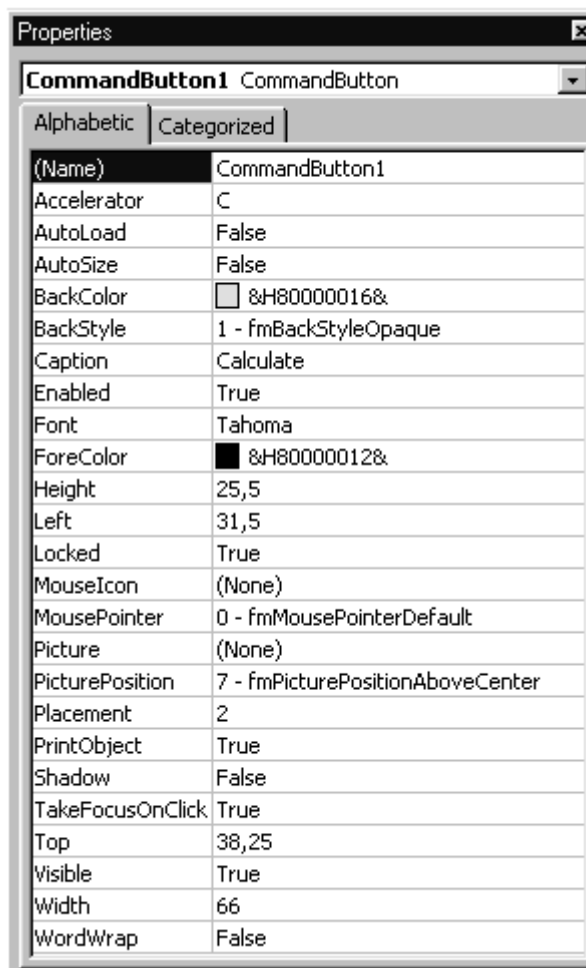
    'Festlegung der Fenstergröße auf 90%
    ActiveWindow.Zoom = 90

End Sub

Private Sub CommandButton1_Click()

    datanumber = 0
    samplenummer = 0
    'Aufruf des Moduls number_of_data
    Run ("datanr")
    'Aufruf des Tabellenblatts analysis
    Sheet2.Activate

    'Transfer der x-Werte auf das Tabellenblatt analysis
    ASCIIA = Asc("A")
    ASCIIB = Asc("B")
```



**Abb. 52: Eigenschaften des CommandButton1.**  
Erklärung siehe Text.

```

For i = 1 To datanumber
    ActiveSheet.Range(Chr(i + ASCIIA) & "3").Activate
    ActiveCell.FormulaR1C1 = Sheet1.Range(Chr(i + ASCIIB) & "5").Value
    ActiveSheet.Range(Chr(i + ASCIIA) & "5").Activate
    ActiveCell.FormulaR1C1 = Sheet1.Range(Chr(i + ASCIIB) & "12").Value
Next i
'Berechnung der Mittelwerte für die Standardreihe und Abzug des Nullwertes
For i = 1 To datanumber
    srange(i) = Worksheets("Lowry Protein Determination").Range(Chr(i + ASCIIB) & "6:"
        & Chr(i + ASCIIB) & "9")
    s(i) = Application.WorksheetFunction.average(srange(i)) -
        Application.WorksheetFunction.average(srange(1))
    ActiveSheet.Range(Chr(i + ASCIIA) & "4").Value = s(i)
Next i

'Zuordnung der Extinktionen der Proben
For i = 1 To samplenummer
    ActiveSheet.Range(Chr(i + ASCIIA) & "6").Value = sample(i)
Next i

'Aufruf des Moduls polynom
Run ("polynomial_fit")
'Aufruf des Moduls estimation_for_hyperbola
Run ("estimation")
'Aufruf des Moduls stauffer
Run ("logarithmus")
'Aufruf des Moduls lineweaver_burk
Run ("reciprocal_plot")
'Aufruf des Moduls samples
Run ("samplecalc")
ActiveSheet.Range("A3").Select

```

End Sub

Nota: Nachfolgend ist der Programmcode der Module angegeben (vgl. Tab. 38).

### 7.1.3 Das Modul *estimation\_for\_hyperbola*

```

Public x(12) As Double
Public y(12), b(2) As Double

```

```

Sub estimation()

    letter = Asc("B")
    sumv3 = 0
    sumv4 = 0
    sumv3s = 0
    sumv4s = 0
    sumv4s2 = 0

    'Einlesen der x/y-Werte und Berechnung der Summen für die erste Näherung
    For i = 1 To datanumber - 1
        letter = letter + 1
        x(i) = ActiveSheet.Range(Chr(letter) & "3").Value
        y(i) = ActiveSheet.Range(Chr(letter) & "4").Value
        sumv3 = sumv3 + (y(i) ^ 3)
        sumv4 = sumv4 + (y(i) ^ 4)
        sumv3s = sumv3s + ((y(i) ^ 3) / x(i))
        sumv4s = sumv4s + ((y(i) ^ 4) / x(i))
        sumv4s2 = sumv4s2 + ((y(i) ^ 4) / (x(i) ^ 2))
    Next i

    'Berechnung der ersten Näherung
    vmax = ((sumv4s2 * sumv4) - (sumv4s ^ 2)) / ((sumv4s2 * sumv3) - (sumv4s * sumv3s))
    km = ((sumv4 * sumv3s) - (sumv4s * sumv3)) / ((sumv4s2 * sumv3) - (sumv4s * sumv3s))

    letter = Asc("B")
    sumv2k = 0
    sums2v2k = 0
    sumsv2k = 0
    sums2vk = 0
    sums2v = 0
    sumsv = 0

    'Einlesen der x/y-Werte und Berechnung der Summen für die erweiterte Näherung
    For i = 1 To datanumber - 1
        letter = letter + 1
        x(i) = ActiveSheet.Range(Chr(letter) & "3").Value
        y(i) = ActiveSheet.Range(Chr(letter) & "4").Value
    
```

```

sumv2k = sumv2k + ((y(i) ^ 2) / ((km + x(i)) ^ 2))
sums2v2k = sums2v2k + (((x(i) ^ 2) * (y(i) ^ 2)) / ((km + x(i)) ^ 2))
sumsv2k = sumsv2k + ((x(i) * (y(i) ^ 2)) / ((km + x(i)) ^ 2))
sums2vk = sums2vk + (((x(i) ^ 2) * y(i)) / ((km + x(i)) ^ 2))
sumsvk = sumsvk + ((x(i) * y(i)) / ((km + x(i)) ^ 2))
Next i
'Berechnung der erweiterten Näherung
formulaa = ((sumv2k * sums2v2k) - (sumsv2k ^ 2)) / ((sumv2k * sums2vk) - (sumsv2k *
sumsvk))
formulab = ((sums2v2k * sumsvk) - (sumsv2k * sums2vk)) / ((sumv2k * sums2vk) -
(sumsv2k * sumsvk))

formulaa = Format(formulaa, "0.00")
formulab = Format(formulab, "0.00")

b(1) = formulaa
b(2) = formulab

Run ("nonlinear_regression")

```

End Sub

## 7.1.4 Das Modul *iteration*

Dim w(12), p(12), q(12), currentx As Double

```

Sub nonlinear_regression()

nonlinregr:

s1 = 0
s2 = 0
s3 = 0
s4 = 0
s5 = 0
s6 = 0
r1 = 0

For i = 1 To datanumber
w(i) = 1
Next i

'Konfiguration des Iterationszählers
itcount = itcount + 1
If itcount > 10 Then GoTo termination

letter = Asc("B")
For i = 1 To datanumber - 1
letter = letter + 1
x(i) = ActiveSheet.Range(Chr(letter) & "3").Value
y(i) = ActiveSheet.Range(Chr(letter) & "4").Value
Next i

For i = 1 To datanumber - 1

'Berechnung der theoretischen Werte von y' und der Residuen
currentx = x(i)
GoSub formula
z = y(i) - g
r5 = Sqr(w(i)) * z
r1 = r1 + Abs(r5)

j = 0

'Berechnung der partiellen Ableitungen
For j = 1 To 2
b(j) = 1.02 * b(j)
GoSub formula
u = g
b(j) = b(j) * 0.98 / 1.02
GoSub formula
b(j) = b(j) / 0.98
p(j) = (u - g) / (0.04 * b(j))
Next j

r3 = 1

```

```

sums:
    'Berechnung der Summen s1 bis s6
    s1 = s1 + r3 * w(i) * p(1) ^ 2
    s2 = s2 + r3 * w(i) * p(1) * p(2)
    s3 = s3 + r3 * w(i) * p(2) ^ 2
    s4 = s4 + r3 * w(i) * p(1) * z
    s5 = s5 + r3 * w(i) * p(2) * z
    s6 = s6 + r3 * w(i) * z ^ 2
    Next i
    'Korrektur der Parameter und Überprüfung der Parametergenauigkeit
    r2 = 6 * r1 / (datanumber - 1)
    d = s1 * s3 - s2 ^ 2
    q(1) = (s3 * s4 - s2 * s5) / d
    q(2) = (s1 * s5 - s2 * s4) / d
    c = Abs(q(1) / b(1)) + Abs(q(2) / b(2))
    b(1) = b(1) + q(1)
    b(2) = b(2) + q(2)

    If c > 10 ^ -5 Then GoTo nonlinregr

summary:
    'Genauigkeitskriterium erfüllt - Berechnung des endgültigen Ergebnisses
    v = s6 / ((datanumber - 1) - 2)
    q(1) = Sqr(v * s3 / d)
    q(2) = Sqr(v * s1 / d)

    q(1) = Format(q(1), "0.00E+00")
    q(2) = Format(q(2), "0.00E+00")

    ActiveSheet.Range("B22").FormulaR1C1 = "0"
    ActiveSheet.Range("B23").FormulaR1C1 = "0"
    ActiveSheet.Range("B24").FormulaR1C1 = "0"

    ASCIIB = Asc("B")

    'Ausgabe der Werte auf das Tabellenblatt analysis
    For i = 1 To datanumber - 1
        ActiveSheet.Range(Chr(i + ASCIIB) & "22").Select
        ActiveCell.FormulaR1C1 = x(i)
        currentx = x(i)
        GoSub formula
        ActiveSheet.Range(Chr(i + ASCIIB) & "23").Select
        ActiveCell.FormulaR1C1 = g
        ActiveSheet.Range(Chr(i + ASCIIB) & "24").Select
        ActiveCell.FormulaR1C1 = y(i) - g
    Next i

    Exit Sub

    'Beginn der Subroutinen

formula:
    'Formel für eine rechtwinklige Hyperbel
    g = b(1) * currentx / (b(2) + currentx)

Return

termination:
    MsgBox "terminated after 10 iterations!"
    GoTo summary

End Sub

```

## 7.1.5 Das Modul *lineweaver\_burk*

```

Dim rec_x(12), rec_y(12) As Double
Public rec_a, rec_m As Double

```

```

Sub reciprocal_plot()

    ASCIIB = Asc("B")

    'Berechnung der Kehrwerte
    For i = 1 To datanumber - 1
        x(i) = ActiveSheet.Range(Chr(ASCIIB + i) & "3").Value
        y(i) = ActiveSheet.Range(Chr(ASCIIB + i) & "4").Value
        rec_x(i) = 1 / x(i)
    Next i

```

```

    rec_y(i) = 1 / y(i)
    Range(Chr(ASCIIB + i) & "47").Value = rec_x(i)
    Range(Chr(ASCIIB + i) & "48").Value = rec_y(i)
Next i

'Berechnung der Regressionsparameter für lineare Regression: y = a x + m
rec_a = WorksheetFunction.Slope(Range("C48:M48"), Range("C47:M47"))
rec_m = WorksheetFunction.Intercept(Range("C48:M48"), Range("C47:M47"))

'Ausgabe der Werte auf das Tabellenblatt analysis
For i = 1 To datanumber - 1
    Range(Chr(ASCIIB + i) & "49").Value = rec_a * rec_x(i) + rec_m
    Range(Chr(ASCIIB + i) & "50").Value = Range(Chr(ASCIIB + i) & "49").Value -
        Range(Chr(ASCIIB + i) & "48").Value
Next i

End Sub

```

### 7.1.6 Das Modul *number\_of\_data*

```

Dim cell(17) As Variant
Public datanumber, samplenummer As Integer
Public dilution(12), sample(12), bckgrnd As Double
Dim srange(12)

Sub datanr()

'Berechnung der Anzahl der Datenpunkte
ASCIIB = Asc("B")

For i = 1 To 12
    j = 0
    For j = 6 To 9
        cell(j) = Chr(i + ASCIIB) & CStr(j)
    Next j
    If Range(cell(6)).FormulaR1C1 = "" And Range(cell(7)).FormulaR1C1 = "" And
        Range(cell(8)).FormulaR1C1 = "" And Range(cell(9)).FormulaR1C1 = "" Then Exit For
    datanumber = datanumber + 1
Next i

For i = 1 To 12
    j = 0
    For j = 14 To 17
        cell(j) = Chr(i + ASCIIB) & CStr(j)
    Next j
    If Range(cell(14)).FormulaR1C1 = "" And Range(cell(15)).FormulaR1C1 = "" And
        Range(cell(16)).FormulaR1C1 = "" And Range(cell(17)).FormulaR1C1 = "" Then Exit
        For samplenummer = samplenummer + 1
Next i

'Bildung der Differenz zwischen den Extinktionen der Proben und dem Nullwert
'der Eichreihe
bck = Worksheets("Lowry Protein Determination").Range("C6:C9")
bckgrnd = Application.WorksheetFunction.average(bck)

For i = 1 To samplenummer
    srange(i) = Worksheets("Lowry Protein Determination").Range(Chr(i + ASCIIB) &
        "14:" & Chr(i + ASCIIB) & "17")
    sample(i) = Application.WorksheetFunction.average(srange(i)) - bckgrnd
Next i

For i = 1 To samplenummer
    dilution(i) = Worksheets("Lowry Protein Determination").Range(Chr(i + ASCIIB) &
        "13").Value
    If dilution(i) = 0 Then dilution(i) = 1
Next i

End Sub

```

## 7.1.7 Das Modul *polynom*

```
Dim polyx(12), polyy(12), a(5, 5), c(5, 5), e(5, 5), h(5, 5) As Double
Public polya, polyb, polyc, polyd, polye As Double
```

```
Sub polynomial_fit()

    ASCIIA = Asc("A")
    ASCIIB = Asc("B")
    letter = Asc("A")

    For i = 1 To datanumber
        letter = letter + 1
        x(i) = ActiveSheet.Range(Chr(letter) & "3").Value
        y(i) = ActiveSheet.Range(Chr(letter) & "4").Value
    Next i

    'Erstellen der Matrices
    'Matrix A
    For i = 0 To 4
        For j = 0 To 4
            a(i + 1, j + 1) = 0
            For k = 1 To datanumber
                If i + j = 0 And x(k) = 0 Then GoTo plusone
                a(i + 1, j + 1) = a(i + 1, j + 1) + x(k) ^ (i + j)
            nextk:
                Next k
            Next j
        Next i

        'Matrix C
        For i = 0 To 4
            c(i + 1, 1) = 0
            For k = 1 To datanumber
                If i = 0 And x(k) = 0 Then GoTo plusy
                c(i + 1, 1) = c(i + 1, 1) + y(k) * x(k) ^ i
            cnextk:
                Next k
        Next i

        'Invertieren der Matrix A
        For i = 1 To 5
            For j = 1 To 5
                e(i, j) = 1 - Abs(Sgn(i - j))
            Next j
        Next i

        For j = 1 To 5
            For i = j To 5
                If a(i, j) <> 0 Then GoTo invert
            Next i

            MsgBox "a ist nicht invertierbar!"
            Exit Sub
        Next j

    invert:

        For k = 1 To 5
            aa = a(j, k)
            a(j, k) = a(i, k)
            a(i, k) = aa
            ee = e(j, k)
            e(j, k) = e(i, k)
            e(i, k) = ee
        Next k

        f = 1 / a(j, i)

        For l = 1 To 5
            a(j, l) = f * a(j, l)
            e(j, l) = f * e(j, l)
        Next l

        For s = 1 To 5
            If s = j Then GoTo nexts
            g = -a(s, j)

            For k = 1 To 5
                a(s, k) = a(s, k) + g * a(j, k)
                e(s, k) = e(s, k) + g * e(j, k)
            Next k
        Next s
    End Sub
```



```

nexts:
    Next s
    Next j

'inv(A) * Matrix C
For i = 1 To 5
    h(i, 1) = 0
    For k = 1 To 5
        h(i, 1) = h(i, 1) + e(i, k) * c(k, 1)
    Next k
Next i
For i = 1 To 5
    If Abs(h(i, 1)) < 0.00001 Then h(i, 1) = 0
Next i

polye = h(1, 1)
polyd = h(2, 1)
polyc = h(3, 1)
polyb = h(4, 1)
polya = h(5, 1)

ASCIIA = Asc("A")

For i = 1 To datanumber
    Range(Chr(ASCIIA + i) & "11").Value = polya * (x(i)) ^ 4 + polyb * (x(i)) ^ 3 +
        polyc * (x(i)) ^ 2 + polyd * x(i) + polye
    Range(Chr(ASCIIA + i) & "12").Value = Range(Chr(ASCIIA + i) & "11").Value -
        Range(Chr(ASCIIA + i) & "4").Value
Next i

Exit Sub

plusone:
a(i + 1, j + 1) = a(i + 1, j + 1) + 1
GoTo nextk
Exit Sub

plusy:
c(i + 1, 1) = c(i + 1, 1) + y(k)
GoTo cnextk
Exit Sub

End Sub

```

## 7.1.8 Das Modul *samples*

```

Sub samplecalc()

    ASCIIA = Asc("A")
    ASCIIB = Asc("B")

    For i = 1 To samplenummer
        ActiveSheet.Range(Chr(i + ASCIIA) & "60").Select
        ActiveCell.FormulaR1C1 = Worksheets("Lowry Protein Determination").Range(Chr(i +
            ASCIIB) & "12").Value
    Next i

    'Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben und Ausgabe der Werte
    'auf das Tabellenblatt analysis
    For i = 1 To samplenummer
        If sample(i) = 0 Then i = i + 1
        Range(Chr(i + ASCIIA) & "62").FormulaR1C1 = (b(2) * sample(i) / (b(1) -
            sample(i))) * dilution(i)

        xvalue = 1
        For j = 1 To 10
            fx = polya * xvalue ^ 4 + polyb * xvalue ^ 3 + polyc * xvalue ^ 2 + polyd *
                xvalue + polye - sample(i)
            ffx = 4 * polya * xvalue ^ 3 + 3 * polyb * xvalue ^ 2 + 2 * polyc * xvalue +
                polyd
            xvalue = xvalue - fx / ffx
        Next j
        ActiveSheet.Range(Chr(i + ASCIIA) & "61").FormulaR1C1 = xvalue * dilution(i)
        Range(Chr(i + ASCIIA) & "63").FormulaR1C1 = (10 ^ (((Log(sample(i)) / Log("10")) -
            m) / a)) * dilution(i)
        Range(Chr(i + ASCIIA) & "64").FormulaR1C1 = (1 / ((1 / sample(i) - rec_m) /
            rec_a)) * dilution(i)
    Next i

End Sub

```

## 7.1.9 Das Modul *Stauffer*

```
Public log_x(12), log_y(12), a, m As Double
```

---

```
Sub logarithmus()
```

```
'Logarithmierung der Extinktionswerte der Standardreihe  
ASCIIB = Asc("B")
```

```
For i = 1 To datanumber - 1  
    x(i) = ActiveSheet.Range(Chr(ASCIIB + i) & "3").Value  
    y(i) = ActiveSheet.Range(Chr(ASCIIB + i) & "4").Value  
    log_x(i) = Log(x(i)) / Log(10)  
    log_y(i) = Log(y(i)) / Log(10)  
    Range(Chr(ASCIIB + i) & "34").Value = log_x(i)  
    Range(Chr(ASCIIB + i) & "35").Value = log_y(i)  
Next i
```

```
a = WorksheetFunction.Slope(Range("C35:M35"), Range("C34:M34"))  
m = WorksheetFunction.Intercept(Range("C35:M35"), Range("C34:M34"))
```

```
'Ausgabe der Werte auf das Tabellenblatt analysis
```

```
For i = 1 To datanumber - 1  
    Range(Chr(ASCIIB + i) & "36").Value = a * log_x(i) + m  
    Range(Chr(ASCIIB + i) & "37").Value = Range(Chr(ASCIIB + i) & "36").Value -  
        Range(Chr(ASCIIB + i) & "35").Value  
Next i
```

```
End Sub
```

---

## 7.2 Das Programm *Hyperbola for Excel 97*

### 7.2.1 Allgemeiner Programmaufbau

*Hyperbola for Excel 97* besitzt die in Abbildung 53 dargestellte Programmstruktur. Neben den beiden bereits vorgefertigten Tabellenblättern *data* und *analysis*, deren Layout für einen fehlerfreien Ablauf genauestens einzuhalten ist (vgl. Abb. 17 und Abb. 19), muß die Excel-Datei auch die Dialogbox *Hyperbola* enthalten (vgl. Abb.18 und Abb.53).

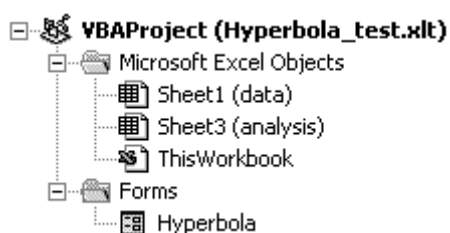


Abb. 53: Programmierstruktur des Programms *Hyperbola*.

Letztere öffnet sich erst nachdem der auf *Sheet1* implementierte Befehlsknopf *CommandButton1* gedrückt wurde. Die Namen der für das Programm wichtigen Elemente sind in Abbildung 54 angegeben und können nur dann geändert werden, wenn gleichzeitig die Anweisungen im VBA-Skript geändert werden. Durch Klicken des *CalculateButton1* wird die eigentliche Berechnung der Konstanten durchgeführt, die sich unter der Subroutine *CalculateButton1\_Click ()* befindet.

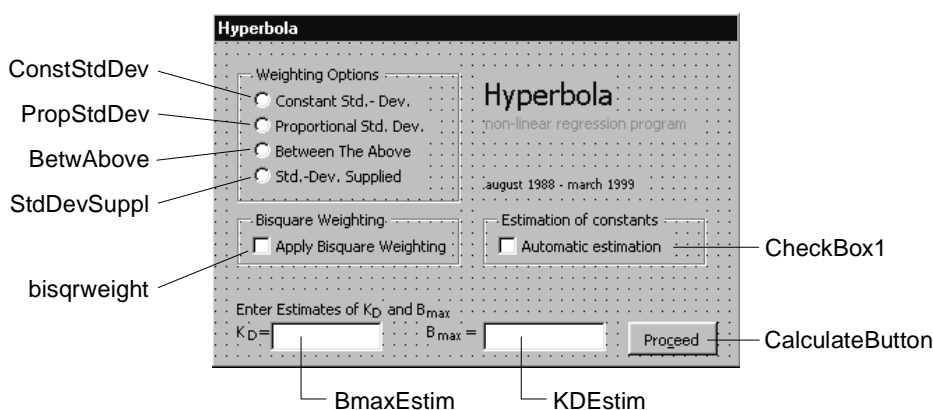
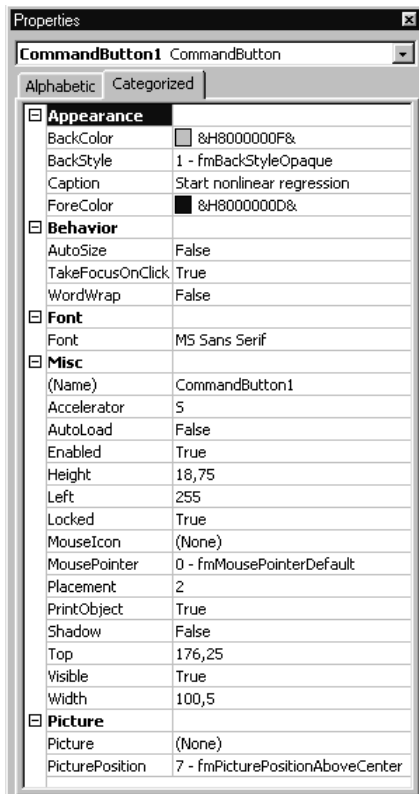


Abb. 54: Die Dialogbox *Hyperbola* mit den Namen einiger Elemente.

Nach der Ausgabe der Werte und Umsetzung in die entsprechenden Grafiken, schließt sich das Dialogfeld automatisch und das Tabellenblatt *analysis* wird angezeigt.

## 7.2.2 Elemente in Tabellenblatt Sheet1 (data)

Die Eigenschaften des *CommandButton1* sind in Abbildung 55 zusammengefaßt und



entsprechen größtenteils den von Excel vorgeschlagenen Grund-einstellungen. Die Position dieses Elementes kann beliebig gewählt werden und beeinträchtigt die Funktion des Programms nicht; hingegen muß der Aufbau der vordefinierten Tabelle erhalten bleiben, da die Position der Datenreihen im VBA-Skript fixiert worden ist.

Die Befehle, die durch Drücken des *CommandButton1* ausgeführt werden, lauten:

```
Private Sub CommandButton1_Click()

    bisqrw = 0

    'Laden und Anzeigen der Dialogbox
    Load Hyperbola
    Hyperbola.Show

End Sub
```

Mit den Befehlen *Load Hyperbola* und *Hyperbola.Show* wird die Dialogbox *Hyperbola* aufgerufen und angezeigt.

**Abb. 55: Eigenschaften des CommandButton1.**  
Erklärung s. Text.

## 7.2.3 VBA-Skript der Dialogbox *Hyperbola*

Das hier definierte VBA-Skript wertet die Eingaben in der Dialogbox *Hyperbola* aus. Es steuert die automatische Berechnung der ersten Näherung der Parameter, wie auch die genaue iterative Berechnung durch nichtlineare Regression und deren grafische Presentation auf dem Tabellenblatt *Sheet2 (analysis)*. Weitere Erläuterungen finden sich im VBA-Skript.

```
Private x(100), y(100), w(100), s(100), b(2), p(2), q(2) As Double
Private bndfree(100), logx(100) As Single
Private iwsheet, i, OptNr, itc, itcount As Integer
Private KDEst, BmaxEst As Double
Private vmax, km As Single

Private Sub CheckBox1_Click()

    'Bestimmung der Anzahl der Datenpunkte
    'Die Zelle C4 ist der Bezugspunkt im Koordinatensystem des Tabellenblatts
    cell = "C4"
    iwsheet = 4

    Do Until Sheet1.Range(cell).Formula = ""
        iwsheet = iwsheet + 1
        cell = "C" & CStr(iwsheet)
    Loop:
```

```

'n ist die Anzahl der x/y-Wertepaare
n = iwsheet - 4

'Berechnung der ersten Näherung von KD und Bmax
cellnr = 3
sumv3 = 0
sumv4 = 0
sumv3s = 0
sumv4s = 0
sumv4s2 = 0

For i = 1 To n
    cellnr = cellnr + 1
    x(i) = Sheet1.Range("C" & cellnr).Value
    y(i) = Sheet1.Range("D" & cellnr).Value
    sumv3 = sumv3 + (y(i) ^ 3)
    sumv4 = sumv4 + (y(i) ^ 4)
    sumv3s = sumv3s + ((y(i) ^ 3) / x(i))
    sumv4s = sumv4s + ((y(i) ^ 4) / x(i))
    sumv4s2 = sumv4s2 + ((y(i) ^ 4) / (x(i) ^ 2))
Next i

vmax = ((sumv4s2 * sumv4) - (sumv4s ^ 2)) / ((sumv4s2 * sumv3) - (sumv4s * sumv3s))
km = ((sumv4 * sumv3s) - (sumv4s * sumv3)) / ((sumv4s2 * sumv3) - (sumv4s * sumv3s))

cellnr = 3
sumv2k = 0
sums2v2k = 0
sumsv2k = 0
sums2vk = 0
sums2v = 0
sumsv = 0

For i = 1 To n
    cellnr = cellnr + 1
    x(i) = Sheet1.Range("C" & cellnr).Value
    y(i) = Sheet1.Range("D" & cellnr).Value
    sumv2k = sumv2k + ((y(i) ^ 2) / ((km + x(i)) ^ 2))
    sums2v2k = sums2v2k + (((x(i) ^ 2) * (y(i) ^ 2)) / ((km + x(i)) ^ 2))
    sumsv2k = sumsv2k + ((x(i) * (y(i) ^ 2)) / ((km + x(i)) ^ 2))
    sums2vk = sums2vk + (((x(i) ^ 2) * y(i)) / ((km + x(i)) ^ 2))
    sumsvk = sumsvk + ((x(i) * y(i)) / ((km + x(i)) ^ 2))
Next i

vmax = ((sumv2k * sums2v2k) - (sumsv2k ^ 2)) / ((sumv2k * sums2vk) - (sumsv2k * sumsvk))
km = ((sums2v2k * sumsvk) - (sumsv2k * sums2vk)) / ((sumv2k * sums2vk) - (sumsv2k * sumsvk))

vmax = Format(vmax, "0.00")
km = Format(km, "0.00")

'Ausgabe in die Textboxen der Dialogbox
KDEstim.Value = km
BmaxEstim.Value = vmax

```

---

End Sub

```

Private Sub ConstStdDev_Click()
    OptNr = 1
End Sub

```

---

```

Private Sub PropStdDev_Click()
    OptNr = 2
End Sub

```

---

```

Private Sub BetwAbove_Click()
    OptNr = 3
End Sub

```

---

```

Private Sub StdDevSuppl_Click()
    OptNr = 4
End Sub

```

---

```
Private Sub KDEstim_Change()  
  
'manuelle Eingabe der ersten Näherung für KD in die Textbox KDEstim  
b(2) = KDEstim.Value  
If IsNumeric(b(2)) Then  
ElseIf b(2) <> "" Then  
    MsgBox "Enter a number!"  
    KDEstim.Value = Left$(b(2), Len(b(2)) - 1)  
End If  
  
For i = 1 To Len(KDEstim)  
    If Mid$(KDEstim, i, 1) = "." Then  
        KDEstim = Mid$(KDEstim, 1, i - 1) & "," & Right$(KDEstim, Len(KDEstim) - i)  
    End If  
Next i  
  
End Sub
```

---

```
Private Sub BmaxEstim_Change()  
  
'manuelle Eingabe der ersten Näherung für Bmax in die Textbox BmaxEstim  
b(1) = BmaxEstim.Value  
If IsNumeric(b(1)) Then  
ElseIf b(1) <> "" Then  
    MsgBox "Enter a number!"  
    BmaxEstim.Value = Left$(b(1), Len(b(1)) - 1)  
End If  
  
For i = 1 To Len(BmaxEstim)  
    If Mid$(BmaxEstim, i, 1) = "." Then  
        BmaxEstim = Mid$(BmaxEstim, 1, i - 1) & "," & Right$(BmaxEstim, Len(BmaxEstim)  
            - i)  
    End If  
Next i  
  
End Sub
```

---

```
Private Sub UserForm_Initialize()  
    ConstStdDev.Value = True  
    OptNr = 1  
End Sub
```

---

```
Private Sub CalculateButton1_Click()  
  
'Löschen der Feldinhalte des Tabellenblatts Sheet2 (analysis)  
Sheet3.Range("c5:h16,c24:d35,c40:d51,k4,k5,n6,n7,e18,e19,l18,l19,n18,  
    n19,i25:i27,m26,m27").Formula = ""  
  
Select Case OptNr  
    Case 4  
        If Sheet1.Range("E4").Formula = "" Then  
            MsgBox "There is no standard deviation given!"  
            Exit Sub  
        End If  
End Select  
  
If KDEstim.Value = "" Then  
    MsgBox "Enter Estimate for KD!": Exit Sub  
ElseIf BmaxEstim.Value = "" Then  
    MsgBox "Enter Estimate for Bmax!": Exit Sub  
End If  
  
Sheet3.Range("E18").Formula = KDEstim.Value  
Sheet3.Range("E19").Formula = BmaxEstim.Value  
  
cell = "C4"  
iwsheet = 4  
Do Until Sheet1.Range(cell).Formula = ""  
    iwsheet = iwsheet + 1  
    cell = "C" & CStr(iwsheet)  
Loop:  
  
n = iwsheet - 4  
  
'Variablenzuordnung der x- und y-Werte  
For i = 1 To n  
  
    x(i) = Sheet1.Range("C" & CStr(i + 3)).Value  
    y(i) = Sheet1.Range("D" & CStr(i + 3)).Value
```

```

Select Case OptNr
  Case 1
    w(i) = 1
  Case 2
    w(i) = 1 / (y(i) ^ 2)
  Case 3
    w(i) = 1 / y(i)
  Case 4
    s(i) = Sheet1.Range("E" & CStr(i + 3)).Value
    w(i) = 1 / s(i) ^ 2
End Select

Next i

itcount = 0

'Start der nichtlinearen Regression
nonlinregr:

s1 = 0
s2 = 0
s3 = 0
s4 = 0
s5 = 0
s6 = 0
r1 = 0

' Konfiguration des Iterationszählers
itcount = itcount + 1
If itcount > 10 Then GoTo termination

For i = 1 To n

  'Berechnung der theoretischen Werte von y', der Residuen
  'und der Werte r1 und r5 für die Wichtungsoption bisquare weighting
  currentx = x(i)
  GoSub Formula
  z = y(i) - g
  r5 = Sqr(w(i)) * z
  r1 = r1 + Abs(r5)

  'Berechnung der partiellen Ableitungen
  For j = 1 To 2
    b(j) = 1.02 * b(j)
    GoSub Formula
    u = g
    b(j) = b(j) * 0.98 / 1.02
    GoSub Formula
    b(j) = b(j) / 0.98
    p(j) = (u - g) / (0.04 * b(j))
  Next j

  'Abfrage zur Wichtungsoption bisquare weighting
  r3 = 1
  If bisqrweight = False Then
    GoTo sums
  Else
    If itcount = 1 Then
      GoTo sums
    Else
      r3 = 0
      r4 = (r5 / r2) ^ 2
      If r4 >= 1 Then
        GoTo sums
      Else
        r3 = (1 - r4) ^ 2
      End If
    End If
  End If

  End If
End If

sums:
'Berechnen der Summen s1 bis s6
s1 = s1 + r3 * w(i) * p(1) ^ 2
s2 = s2 + r3 * w(i) * p(1) * p(2)
s3 = s3 + r3 * w(i) * p(2) ^ 2
s4 = s4 + r3 * w(i) * p(1) * z
s5 = s5 + r3 * w(i) * p(2) * z
s6 = s6 + r3 * w(i) * z ^ 2

Next i

```

```

'Korrektur der Parameter und Überprüfung der Parametergenauigkeit
r2 = 6 * r1 / n
d = s1 * s3 - s2 ^ 2
q(1) = (s3 * s4 - s2 * s5) / d
q(2) = (s1 * s5 - s2 * s4) / d
c = Abs(q(1) / b(1)) + Abs(q(2) / b(2))
b(1) = b(1) + q(1)
b(2) = b(2) + q(2)

If c > 10 ^ -5 Then GoTo nonlinregr

summary:
'Genauigkeitskriterium erfüllt - Berechnung des endgültigen Ergebnisses
v = s6 / (n - 2)
q(1) = Sqr(v * s3 / d)
q(2) = Sqr(v * s1 / d)
q(1) = Format(q(1), "0.00E+00")
q(2) = Format(q(2), "0.00E+00")

'Ausgabe der Parameter auf dem Tabellenblatt Sheet2 (analysis)
Sheet3.Range("L18").Formula = b(2)
Sheet3.Range("N18").Formula = q(2)
Sheet3.Range("L19").Formula = b(1)
Sheet3.Range("N19").Formula = q(1)
Sheet3.Range("N6").Formula = itcount - 1
Sheet3.Range("N7").Formula = s6

'Berechnung des 95% Konfidenzintervalls
TVAl = WorksheetFunction.TInv(0.05, (n - 3))
CLKD = TVAl * q(2)
CLBMAX = TVAl * q(1)
CLKD = Format(CLKD, "#.###")
CLBMAX = Format(CLBMAX, "#.###")
Sheet3.Range("L20").Formula = "+/- " & CLKD
Sheet3.Range("N20").Formula = "+/- " & CLBMAX

Select Case OptNr
    Case 1
        Sheet3.Range("K4").Formula = "Constant Std.-Dev."
    Case 2
        Sheet3.Range("K4").Formula = "Proportional Std.-Dev."
    Case 3
        Sheet3.Range("K4").Formula = "Between the Above"
    Case 4
        Sheet3.Range("K4").Formula = "Std.-Dev. supplied"
End Select

If bisqrweight = True Then Sheet3.Range("K5").Formula = "plus bisquare weighting!"

cellnr = 4

'Berechnung der y-Werte der Kurvenanpassung für die gegebenen x-Werte
For i = 1 To n

    cellnr = cellnr + 1
    Sheet3.Range("C" & cellnr).Formula = x(i)
    Sheet3.Range("D" & cellnr).Formula = y(i)
    currentx = x(i)
    GoSub Formula
    Sheet3.Range("E" & cellnr).Formula = g
    Sheet3.Range("F" & cellnr).Formula = y(i) - g

Next i

'Berechnungen zum Scatchard-Plot und Ausgabe auf dem Tabellenblatt Sheet2 (analysis)
cellnr = 23
For i = 1 To n
    cellnr = cellnr + 1
    bndfree(i) = y(i) / x(i)
    Sheet3.Range("C" & cellnr).Formula = y(i)
    Sheet3.Range("D" & cellnr).Formula = bndfree(i)
Next i

Set ydatasc = Worksheets("analysis").Range("D24:D35")
Set xdatasc = Worksheets("analysis").Range("C24:C35")
scatchslope = Application.WorksheetFunction.Slope(ydatasc, xdatasc)
Sheet3.Range("I25").Formula = scatchslope
Sheet3.Range("M26").Formula = -1 / scatchslope
scatchintercept = Application.WorksheetFunction.Intercept(ydatasc, xdatasc)
Sheet3.Range("I26").Formula = scatchintercept
scatchcorrel = Application.WorksheetFunction.Correl(ydatasc, xdatasc)

```



---

```
Sheet3.Range("I27").Formula = scatchcorrel ^ 2
Sheet3.Range("M27").Formula = -scatchintercept / scatchslope

'Berechnungen zum Klotz-Plot
cellnr = 39
For i = 1 To n
    cellnr = cellnr + 1
    logx(i) = Log(x(i))
    Sheet3.Range("C" & cellnr).Formula = logx(i)
    Sheet3.Range("D" & cellnr).Formula = y(i)
Next i

Sheet3.Activate

Unload Me

Exit Sub

'Beginn der Subroutinen

'Subroutine zur Kurvenanpassung
Formula:
'Formel für eine einfache bimolekulare Rezeptor-Liganden Interaktion
'ohne Ligandendepletion
g = b(1) * currentx / (b(2) + currentx)

Return

'Subroutine zur Wichtungsoption bisquare weighting
bisquare:

    r3 = 0
    r4 = 0
    r4 = (r5 / r2) ^ 2
    If r4 >= 1 Then
        Return
    Else
        r3 = (1 - r4) ^ 2
    End If
Return

'Abbruch nach 10 Iterationen
termination:
MsgBox "terminated after 10 iterations!"
GoTo summary

End Sub
```

---

### 7.3 Allgemeine Versuchsangaben

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die durchgeführten und hier dargestellten Experimente. Während sich in Tabelle 39 Angaben zum Datum des Versuchstags, der Art des Versuchs und der dabei verwendeten Membranen finden, zeigt Tabelle 40 wann und wie diese Membranen hergestellt und unter welchen Bedingungen sie gelagert wurden.

Diese Angaben ermöglichen eine qualitative Beurteilung der Bindungsparameter und wurden zur kritischen Analyse der Ergebnisse aus Bindungsversuchen miteinbezogen.

**Tab. 39: Angaben zum Versuchsablauf.**

Ligand	Membrantyp	Präparation <sup>*</sup>	Versuchsdatum	Anmerkungen	
cLDL	bNNR	bNNR1	08.11.1999		
		cLM	C1	22.10.1998	Fütterung bei 0,5 % KG
			C2	23.10.1998	Fütterung bei 2,0 % KG
			C3	24.10.1998	Fütterung bei 1,0 % KG
			C3	17.03.1999	VT 4 °C / 37 °C Zeitbedarf
			C3	17.11.1999	VT 4 °C / 37 °C Bindung
			C4	16.02.1999	AT10 (C5), AT22 (C4)
			C5	17.02.1999	AT10 (C5), AT22 (C4)
				18.02.1999	AT10 (C5), AT22 (C4)
			C5	04.08.1999	Suramin
			C5	04.08.1999	EDTA
			C6	20.10.1999	Membranpräparation bei 700g bzw. 8.000 g
	hLM	H1	07.08.1999		
	tLM	T1	06.08.1999		
hLDL	bNNR	bNNR1	28.08.1998	Membranpräparation bei 700g bzw. 8.000 g	
		bNNR1	31.08.1998	VT 4 °C, 37 °C	
	cLM	C3	04.06.1998		
	hLM	H1	21.09.1999		
	tLM	T1	10.12.1998		
tLDL	bNNR	bNNR2	09.12.1999		
	cLM	C4	14.09.1999		
	hLM	H1	21.09.1999		
	tLM	T2	28.03.2000		

<sup>\*</sup> Der Schlüssel zu den unter *Präparation* verwendeten Abkürzungen findet sich in Tabelle 40.

**Tab. 40: Auflistung der Membranpräparationen nach den Angaben aus Tabelle 39.**

Präparation*	Membrantyp		Datum	Lagerung	Anmerkungen
bNNR1	bNNR	700 - 100.000 g	26.08.1998	-80 °C	700 g, 8.000 g
bNNR2	bNNR	8.000 - 100.000 g	08.07.1999	-80 °C	
C1	cLM	700 - 100.000 g	07.04.1998	-80 °C	0,5 % KG
C2	cLM	700 - 100.000 g	08.04.1998	-80 °C	2,0 % KG
C3	cLM	700 - 100.000 g	08.04.1998	-80 °C	1,0 % KG
C4	cLM	8.000 - 100.000 g	02.02.1999	-80 °C	AT22
C5	cLM	8.000 - 100.000 g	03.02.1999	-80 °C	AT10
C6	cLM	700 - 100.000 g	04.10.1999	-80 °C	AT10 Hungertiere
		8.000 - 100.000 g			
H1	hLM	8.000 - 100.000 g	13.07.1999	-80 °C	Autopsie, Lebercarcinom
T1	tLM	8.000 - 100.000 g	08.12.1998	-80 °C	
T2	tLM	8.000 - 100.000 g	25.03.2000	-80 °C	

Der Vollständigkeit halber finden sich in der folgenden Tabelle nähere Angaben zur Präparation der Lipoproteine. Dabei zeigt sich, daß Forellen-LDL und Human-LDL in Bezug auf das gewonnene Plasma einen hohen Proteingehalt besitzen. Dagegen sind Karpfen-LDL aufgrund ihres geringen LDL-Protein-Plasma-Quotienten nur bedingt für LDL-Rezeptor-Bindungsstudien geeignet.

**Tab. 41: Angaben zu den Plasmalipoproteinpräparationen**

Ligand	Präparationsdatum	mg Protein / ml Plasma	Gesamtproteingehalt	Anmerkungen
hLDL	12.02.1997	0,257	38,42	M. Lobemeier, VB: 360 ml, P: 149,5 ml
	18.03.1997	0,084	7,64	Pool, S: 91 ml
	07.04.1997	0,15	16,8	Pool, P: 112 ml
	03.06.1997	0,433	77,94	Pool, P: 180 ml
	09.07.1997	0,51	91,8	Pool, P: 180 ml
	29.07.1997	0,408	73,44	Pool, P: 180 ml
	19.08.1997	0,242	38,236	Pool, P: 158 ml
	02.10.1997	0,243	28,431	M. Lobemeier, VB: 225 ml, P: 117 ml
	28.10.1997	0,44	78,76	Pool, P: 179 ml
	09.12.1997	0,422	70,05	Pool, P: 166 ml
	06.01.1998	0,414	45,54	Pool, P: 110 ml
	03.02.1998	0,449	54,78	Pool, P: 122 ml
	03.03.1998	0,523	69,04	Pool, P: 132 ml
	10.03.1998	0,549	60,94	Pool, P: 111 ml
	17.03.1998	0,443	73,1	Pool, P: 165 ml
	24.03.1998	0,423	62,6	Pool, P: 148 ml
	31.03.1998	0,421	24,84	Pool, P: 59 ml
	15.04.1998	0,34	54,4	Pool, P: 160 ml
	21.04.1998	0,415	34,86	Pool, P: 84 ml

Fortsetzung der Tab. 41

Ligand	Präparationsbeginn	mg Protein / ml Plasma	Gesamtproteingehalt	Anmerkungen
<b>hLDL</b>	28.04.1998	0,453	70,67	Pool, P: 156 ml
	26.05.1998	0,397	58,76	Pool, P: 148 ml
	28.05.1998	0,262	31,44	M. Lobemeier, VB: 450 ml, P: 120 ml
	09.06.1998	0,453	65,23	Pool, P: 144 ml
	16.06.1998	0,539	50,67	Pool, P: 94 ml
	23.06.1998	0,432	65,66	Pool, P: 152 ml
	30.06.1998	0,424	39,22	Pool, P: 92,5 ml
	14.07.1998	0,395	71,1	Pool, P: 180 ml
	04.08.1998	0,511	72,05	Pool, P: 141 ml
	11.08.1998	0,41	68,06	Pool, P: 166 ml
	19.08.1998	0,465	69,75	Pool, P: 150 ml
	01.12.1998	0,49	40,67	Pool, P: 83 ml
<b>cLDL</b>	11.10.1997	0,72	†	2 Fische AT 10
	11.06.1998	0,233	6,83	2 Fische AT 10, VB: 48 ml, P: 29,3 ml
	12.10.1998	0,111	26,14	2 Fische AT 22, P: 23,5 ml
	14.10.1998	0,14	5,6	3 Fische AT 22, P: 40 ml
	04.11.1998	0,117	7,96	4 Fische AT 22, VB: 111 ml, P: 68 ml
	12.12.1998	0,133	12,64	5 Fische AT 22, VB: 161 ml, P: 95 ml
	26.01.1999	0,16	8,0	3 Fische AT 22, VB: 90 ml, P: 50 ml
	09.03.1999	0,25	21,25	5 Fische AT 22, VB: 141 ml, P: 85 ml
	23.03.1999	0,108	6,7	4 Fische AT 22, VB: 130 ml, P: 62 ml
	04.05.1999	0,29	10,73	2 Fische AT 10, VB: 65 ml, P: 37 ml
	07.06.1999	0,053	5,3	8 Fische AT 22, VB: 160 ml, P: 100 ml
	30.07.1999	†	†	6 Fische AT 22, P: 72 ml
	11.08.1999	†	†	VB: 90 ml, P: 60 ml
	29.09.1999	†	†	2 Fische AT 10, VB: 23 ml, P: 15,5 ml
26.10.1999	†	†	12 Fische AT 22, P: 104 ml	
<b>tLDL</b>	30.08.1999	0,76	34,2	11 Fische, VB: 90ml, P: 45 ml
	21.03.2000	0,657	20,7	10 Fische, VB: 55 ml, P: 31,5 ml

† Nachdem die Methoden zur Anfertigung von Bindungsstudien etabliert worden waren, wurde weitestgehend auf Verfahren zur Berechnung der hier aufgelisteten Parameter verzichtet. Letztendlich war es nur wichtig ein möglichst großes LDL-Volumen mit hoher Proteinkonzentration zu isolieren.

## 7.4 Reagenzien

Name			Hersteller / Händler	Artikel-Nr.
2-Mercaptoethanol	(reinst)	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Serva	28.625
α-Macroglobulin	Lyophilisat		Boehringer	602.442
Acrylamid rotiphorese 30	†	†	Roth	3029.1
Acrylamid rotiphorese 40	†	†	Roth	3030.1
Aldolase	Suspension		Boehringer	102.644
Ammoniumpersulfat	†	H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	Sigma	A-9164
Ammoniumsulfat	(p.a.)	H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	Roth	3746.1
Aprotinin	†	C <sub>284</sub> H <sub>432</sub> N <sub>84</sub> O <sub>79</sub> S <sub>7</sub>	Roth	A162
β-Galactosidase	Lyophilisat		Serva	22.076
Bromphenolblau	(reinst)	C <sub>19</sub> H <sub>9</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> Sna	Serva	15.375
Borsäure	(p.a.)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Merck	100.165
BSA	<i>s. Rinderserumalbumin</i>			
Calciumchlorid-2-hydrat	(p.a.)	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	Merck	102.382
Carboanhydrase	Lyophilisat		Boehringer	1.363.116
Catalase	Lyophilisat		Sigma	C-100
Chloriod	~97%	ICl	Fluka	24.906
Chloroform	(p.a.)	CHCl <sub>3</sub>	Merck	102.445
Coomassie® Brilliantblau G250	†		Merck	112.553
Cu-EDTA Dinatriumsalz	(reinst)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> CuN <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Fluka	03.668
Cytochrom c	†		Boehringer	103.870
Dimethylformamid	(reinst)	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO	Serva	20.270
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	(p.a.)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	Merck	106.580
EDTA	<i>s. Titriplex® III</i>			
Essigsäure	(100%; Eisessig)	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Merck	100.063
Ethanol	(p.a.; ≥ 99,8%)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Roth	9065
FCS	<i>s. Fötales Kälberserum</i>			
Fluorescamin	†		Sigma	F9015
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz			Merck	109.001
Fötales Kälberserum	(steril)		Boehringer	210.463
Fötales Kälberserum	(steril)		Linaris	S3111KG
Glycerin	(p.a.)	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Serva	23.175
Glycin	(p.a.)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Roth	3908
Heparin (Ammoniumsalz)	†		Sigma	H6279
Isopropanol	(p.a.)	CH <sub>3</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>	Merck	9634
Jodlösung (0.1N)	(Indikator: Stärke)	I <sub>2</sub>	Merck	109.099
Kaliumchlorid	(p.a.)	KCl	Merck	104.933
Kaliumdihydrogenphosphat	(p.a.)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	104.873
Kaliumferricyanid	(p.a.)	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Merck	4973
Kaliumferrocyanid	(p.a.)	K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] •3H <sub>2</sub> O	Merck	4984
K-Na-Tartrat	(p.a.)	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> •4H <sub>2</sub> O	Merck	108.087
Leupeptin	purity>86%	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Bachem	N-1000
Malachitgrünoxalat	(p.a.)	C <sub>48</sub> H <sub>50</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> •2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Merck	101.398
Maleinsäure	(reinst)	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	Serva	28.337
Merckoquant® Nitrat-Test			Merck	110.050
Methanol	(p.a.)	CH <sub>4</sub> O	Roth	4627.2
MS 222	†	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> •CH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub>	Sandoz	A-5040
Natriumbromid	(reinst)	NaBr	Merck	106.360
Natriumchlorid	(p.a.)	NaCl	Merck	106.404
Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat	(p.a.)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	Merck	106.346
Natriumdodecylsulfat	(p.a.)	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> 4SNa	Serva	20.763
Natriumhydroxid-Plätzchen	(p.a.)	NaOH	Merck	106.498
Natriumjodid	(in 10 <sup>-5</sup> M NaOH)	Na <sup>125</sup> I	NEN	NEZ-033A

## Fortsetzung

Name			Hersteller / Händler	Artikel-Nr.
Natriumjodid	(pH7-11)	Na <sup>125</sup> I	Amersham	IMS30
Nonidet P40	†	†	Sigma	N3268
Octylglucosid	†	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	United States Biochemical Corp.	19.775
ortho-Phosphorsäure	(85%)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	100.573
Pefabloc® SC-Protease Inhibitor	(≥95%)	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NSO <sub>2</sub> F•HCl	Roth	A154
Perhydrol®	(p.a.)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck	107.209
Phosphorylase b	Lyophilisat		Sigma	P6635
PMSF	†	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> FO <sub>2</sub> S	Sigma	P-7626
Rinderserumalbumin (Fraktion V pH7.0)	(standard grade)		Serva	11.930
Rinderserumalbumin (initial fraction by heat shock)	(>98%)		Sigma	A-7030
Röntgenfilm Entwickler	Konzentrat		Adefo	8658
Röntgenfilm Fixier	Konzentrat		Adefo	00062
Saccharose	(für die Mikrobio.)	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Merck	7651
Salzsäure	(p.a.; 36-38%)	HCl	Baker	6081
SDS	<i>siehe Natriumdodecylsulfat</i>			
Stickstoff	(liq. & gas.)	N <sub>2</sub>	Messer Griesheim	†
TEMED	(reinst)	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	Serva	35.925
Tetrachlorkohlenstoff	(p.a.)	CCl <sub>4</sub>	Merck	102.208
Titriplex® III	(p.a.)	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Merck	108.418
Trichloressigsäure	(p.a.)	CCl <sub>3</sub> COOH	Merck	8.0711.000
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan	(p.a.)	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Roth	4855
Triton X-100	(gereinigt)	C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>11</sub>	Boehringer	789.704
Trypsin-Inhibitor	Lyophilisat		Sigma	T-9003
Tusche (Fount India Füllhaltertusche)			Pelikan	†
Tween® 20	(reinst)	†	Serva	37.470
X-Gal	†	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> BrClNO <sub>6</sub>	Roth	2315.2

† ohne Angabe

## 7.5 Lösungen

Name	Zusammensetzung	Referenz
Alkalische Kupferlösung	250 mg Cu-EDTA in 800 ml A. bidest, 100 ml 20 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 10 ml 10 N NaOH, A. bidest ad 1 l	WANG und SMITH (1975)
Amidoschwarz-Färbelösung	0,1 % (w/v) Amidoschwarz, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in A. bidest.	
Amidoschwarz-Entfärbelösung	25 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in A. bidest.	
Aprotinin-Stammlsg.	10 mg Aprotinin /ml 0,1 mM Tris/HCl, pH <sub>RT</sub> 7,5, bei -20 °C bis zu 6 Monaten gelagert	
Aufbewahrungslösung	25 % (w/v) Ammoniumsulfat, 3 % (v/v) Essigsäure in A. bidest.	
Boratpuffer	0,2 M Borsäure mit NaOH auf pH <sub>RT</sub> 9,25	
Coomassie-Färbelösung	23,5 ml ortho-Phosphorsäure, 60 g Ammoniumsulfat, 1g Coomassie® Brilliantblau G250 ad 1 l A. bidest.	
Dialysepuffer	150 mM NaCl, 1mM EDTA	
Dichtelsg. d=1,006	11,1 g NaCl / 1 A. bidest., 1% PBS, 0,02% Na-Azid, 0,001% Merthiolat, 0,04% EDTA, pH <sub>RT</sub> 7,7	
Dichtelsg. d=1,02	28,3 g NaBr / 1 A. bidest., 1% PBS, 0,02% Na-Azid, 0,001% Merthiolat, 0,04% EDTA, pH <sub>RT</sub> 7,7	
Dichtelsg. d=1,063	85,01 g NaBr / 1 A. bidest., 1% PBS, 0,02% Na-Azid, 0,001% Merthiolat, 0,04% EDTA, pH <sub>RT</sub> 7,7	
EDTA-Stammlsg.	200 mM EDTA in A. bidest., pH 7,7	

## Fortsetzung

Name	Zusammensetzung	Referenz
Elektrodenpuffer	32 mM Tris-Base, 245 mM Glycin, 0,16 % [w/v] SDS in A. bidest.	
Entfärbelösung	10 % [v/v] Essigsäure in A. bidest.	
EXRAPID®-Analogon	10 K <sub>2</sub> (Cu-EDTA), 30 mg Malachitgrünnoxalat ad 50 ml A. bidest.	
Fischringer	135 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O, 1,5 mM CaCl <sub>2</sub> , 5 mM Glucose, 15 mM Imidazol in A. bidest., pH <sub>RT</sub> 7,7	mod. nach MARTTILA und NIKINMAA (1989)
Fluorescaminreagenz	2 mg Fluorescamin in 10 ml Aceton	
Folin-Ciocalteus-Reagenz	1:1 mit A. bidest. verdünnen	LOWRY <i>et al.</i> (1951)
Heparinlsg.	40 mg Heparin / ml Fischringer	
ICI-Lsg. (19,08 mM)	Chlorid wurde im Wasserbad auf 30 °C erwärmt. Zu 10 ml einer 2 M NaCl-Lösung in 0,1 M HCl wurden 10µl verflüssigtes Chlorid gegeben und über 90 ml Chloroform bei 4 °C im Dunkeln gelagert.	
Indian-Ink-Färbelösung	0,1 % (v/v) Tusche (Pelikan) in PBS-Tween 20	
Leupeptin-Stammlsg.	10 mg Leupeptin / ml A. bidest., bei -20 °C bis zu 6 Monaten gelagert	
LOWRY-Lsg. A	2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 0.1 NaOH	LOWRY <i>et al.</i> (1951)
LOWRY-Lsg. B	0,5% CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O in 1% wässriger Na-K-Tartrat	LOWRY <i>et al.</i> (1951)
Membranpuffer I	20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> in A. bidest., pH <sub>4 °C</sub> 8,0.	
Membranpuffer II	20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> in A. bidest., pH <sub>4 °C</sub> 8,0.	SCHNEIDER <i>et al.</i> (1979)
Na-Azid-Stammlsg.	10% Na-Azid in A. bidest., bei RT gelagert	
Nonidet-P-40-Lsg.	20% Nonidet P-40	
PBS	8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 2,9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O in 1000 ml A. bidest. Der pH-Wert wird bei Bedarf mit 0,1 M HCl auf pH 7,4 eingestellt.	HOLTZHAUER (1989)
PBS-Cyanoferrat <sup>II/III</sup> - Mg <sup>++</sup>	1 mM CaCl <sub>2</sub> , 3 mM K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ], 3mM K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] in PBS	
PBS-Tween 20	0,3 % (v/v) Tween 20 in PBS	
Pefabloclsg.	100 mM in Fischringer	
Pefabloc-Stammlsg.	100 mM Pefabloc in A. bidest., bei -20 °C bis zu 2 Monaten gelagert	
PMSF-Stammlsg.	100 mM PMSF in 100 % Isopropanol.	
PMSF-Puffer	Membranpuffer I + 1 Vol.-% PMSF-Stammlsg.	
Puffer B	50 mM Tris/HCl, 2mM CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, 90 mM NaCl, pH <sub>RT</sub> 7,4	
Puffer C-199	60 mM Tris/HCl, 25 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 20mg BSA/ml, pH <sub>4 °C</sub> 8,0	SCHNEIDER <i>et al.</i> (1979)
Puffer D-199	20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mg BSA/ml, pH <sub>4 °C</sub> 8,0	SCHNEIDER <i>et al.</i> (1979)
Puffer D- 37°C	10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH <sub>37 °C</sub> 7,4	
Puffer D/E	10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH <sub>20 °C</sub> 7,4	
Puffer D-199	20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1mg BSA/ml, pH <sub>4 °C</sub> 8,0	SCHNEIDER <i>et al.</i> (1979)
Puffer E-20 °C	0,1% SDS, 0,2% Nonidet P-40, 0,25% Na-Desoxycholat in Puffer D/E	
Solubilisationspuffer	50 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2 mM EDTA, 10 % [w/v] SDS (zusätzlich für reduzierende Bedingungen: 10 % [v/v] Mercaptoethanol)	
SOUTAR-Puffer	50 mM Tris/Maleat, 2mM CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, pH <sub>4 °C</sub> 6,0	SOUTAR <i>et al.</i> (1986)
Substratmix	22 µl X-Gal-Stammlsg. / ml PBS-Cyanoferrat <sup>II/III</sup> -Mg <sup>++</sup>	
Transferpuffer	20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % Methanol in A. bidest.	
Waschpuffer I	50 mM Tris/HCl, 2mM CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, 90 mM NaCl, pH <sub>RT</sub> 8,0	DANIEL <i>et al.</i> (1983)

## Fortsetzung

Name	Zusammensetzung	Referenz
Waschpuffer II	10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH <sub>RT</sub> 7,4	
X-Gal-Stammlsg.	20 mg X-Gal / ml Dimethylformamid	

## 7.6 Antikörper

Name	Host	Firma	Artikel-Nr.
$\alpha$ -human-Apolipoprotein-B-Antiserum	Schaf	Boehringer	726.494
C7 ( $\alpha$ -bNNR-LDLr; monoclonal)	Maus	Amersham	RPN 537
$\alpha$ -Maus-IgG, biotyniliert	Ziege	DAKO	E 43.301
Streptavidin- $\beta$ -Gal-Konjugat	-----	Boehringer	1.112.481

## 7.7 Geräte

Artikel	Hersteller / Händler	Name	
<i>Elektrophoresezubehör</i>	Biorad	Teflonkamm (1,5mm)	Art.-Nr. 1.652.929
	Biorad	Spacer (1,5mm)	Art.-Nr. 1.652.933
	Pharmacia	Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 2000/300	
	Pharmacia	Gel Electrophoresis Apparatus GE-2/4LS	
<i>Filtrationsgeräte</i>	Atlanta Chemie- und Handelsges. mbH	Hoefer G Ten Place Filter Manifold	
	Schleicher & Schuell	Minifold II	
<i>Mixgeräte</i>	Biometra	Mini Rocking Platform	
	Flow Laboratories	Titertek (Schütteltisch)	
	Gerhard	Schütteltisch RO10	
	Heidolph	Rotationsmixer	
	Janke & Kunkel	IKA-Combimag REO (Magnetrühr Tisch)	
	Janke & Kunkel	IKA-Combimag RET (Magnetrühr Tisch + Temperatur)	
<i>pH-Messgerät</i>	Orion Research	Microprocessor Ionalyzer/901 mit Elektrode	
<i>Photometer/-zubehör</i>	Eppendorf	Photometer 'eppendorf'	
	Flow Laboratories	Titertek Multiscan MCC/340 MK II	
	Shimazu	Spectrophotometer UV-120-02 bzw. UV-100-02	
	Tecan	Spectra Fluor Titerplattenphotometer Anregungsfilter: $\lambda = 390$ nm, Emissionsfilter: $\lambda = 485$ nm	
<i>Thermostat</i>	Julabo	Julabo JV	
<i>Ultraschallgeräte</i>	B.Braun Melsungen	Labsonic 1510	
	MSE	MSE Ultraschalldesintegrator (150 Watt)	
<i>Waagen</i>	Mettler	PM 4600	
	Sartorius	Research R160P	
	Soehnle	Digital Küchenwaage	
<i>Wasserbäder</i>	GFL	Wasserbad 1012	
	Haake	Haake F3 mit Haake C	
<i>Zentrifugen/ -zubehör</i>	Beckman	L8-55 Ultracentrifuge	Rotor: TI 60
		35 ml Zentrifugenröhrchen	Art.Nr. 355.631
		14 ml Zentrifugenröhrchen	Art.Nr. 355.630
		Airfuge	Rotor: 30°
	Eppendorf	PE-Röhrchen	Art.Nr. 343.622
		PE-Rotordeckscheiben	Art.Nr. 339.643
		Centrifuge 5402	Rotor: F-45-18-11 Rotor: F-38-30-6
		Adapter für Safe Lock 0,5ml	(Kat.-Nr. 5415 029.006)



Fortsetzung

Artikel	Hersteller / Händler	Name	
	Heraeus Sepatech	Omnifuge 2.0RS	Rotor: Kat.-Nr. 2250
		Centrilab Adapter 12x15ml	(Kat.-Nr. 5323)
		Centrilab Adapter 2x50ml	(Kat.-Nr. 5324)
	Kontron-Hermle	Centricon H-401	Rotor: A8.24
		Zentrifugengefäße 40 ml	Art.Nr. 253.100
<i>andere Geräte</i>	Berthold	LB MAG 315R ( $\gamma$ -Zähler)	
	Brand	Vacuubrand RS 4 (Pumpe)	
	Sander	Ozonisator Modell IV	Art.Nr. 101.411
	Scotsman	Eismaschine	

## 7.8 Pipetten, Pipettenzubehör und Reaktionsgefäße

Artikel	Name	Hersteller / Händler	Artikel-Nr.
<i>Küvetten</i>	Einwegküvetten, Halbmikro 1,5ml	Eydam <sup>†</sup>	9.406.114
<i>Pipetten</i>	Finpipette Stepette	Labsystems	<sup>†</sup>
	Research 100-1000 $\mu$ l	Eppendorf	9.283.385
	Research 500-5000 $\mu$ l	Eppendorf	9.283.386
	10-100 $\mu$ l	Eppendorf	<sup>†</sup>
	0,5-10 $\mu$ l	Eppendorf	<sup>†</sup>
<i>Pipettenspitzen</i>	Standardtips 5ml	Eppendorf	9.409.110
	gelbe Spitzen für 10-100 $\mu$ l	Roth	8156.1
	blaue Spitzen für 100-1000 $\mu$ l	Roth	8160.1
	Kristallspitzen für 0,5-10 $\mu$ l	Roth	8136.1
	Steptip 3	Labsystems	9.404.050
<i>Spritzen und Kanülen</i>	100 $\mu$ l Hamiltonspritze	Eydam	<sup>†</sup>
	1, 5, 10 ml Einwegspritzen	Henke-Sass-Wolf GmbH	9.410.001/ 005/010
	Einwegkanüle 26G (0,45x25mm)	Henke-Sass-Wolf GmbH	9.410.118
	Einwegkanüle 20G (0,9x40mm)	Henke-Sass-Wolf GmbH	9.410.101
	Einwegkanüle 18G (1,2x50mm)	Eydam <sup>†</sup>	<sup>†</sup>
<i>Reaktionsgefäße</i>	0,4ml Safe Seal <sup>®</sup>	Eppendorf	0013 036.004
	0,5ml Safe Lock	Eppendorf	0030 121.023
	0,65ml Multi <sup>®</sup> -Reaktionsgefäß	Roth	7060.1
	1,5ml Safe Lock	Eppendorf	0030 120.086
	2,0ml Safe Lock	Eppendorf	0030 120.094
	2,0ml Minivial	Alltech	95.020
	15ml Zentrifugenröhre	Sarstedt	554.502
	50ml Zentrifugenröhrchen	NUNC	373.687
<i>Reaktionsgefäßzubehör</i>	Magnetic Stirrer	Alltech	903.063
	TFA/Silicone Septum	Alltech	95.302
	Open Hole Caps	Alltech	95.301
<i>Titerplatten</i>	Linbro Platten F-Form (96 wells)	ICN	763.075
	Fluorimeterplatten	Nunc	437.796

<sup>†</sup> ohne Angabe <sup>‡</sup> ohne Angabe des Herstellers

## 7.9 Andere Verbrauchsmaterialien

Artikel	Name	Hersteller / Händler	Artikel-Nr.
<i>Chromatographiesäulen</i>	PD10	Pharmacia Biotech	17-0851-01
	Extract-Clean Empty Columns 4,0ml	Alltech	210.712
<i>Dialysierschlauch</i>	Visking Typ 8/32	Roth	1780
<i>Filtrationsmedien</i>	Gel-Blotting-Papier GB002	Schleicher & Schuell	10.426.682
	Gel-Blotting-Papier GB003	Schleicher & Schuell	10.426.890
	Centricon 10 (MW cut off: 10.000)	Amicon Inc.	4205
	FP30/0.45 CA-S	Schleicher & Schuell	10.462.100
	Ø 30mm Porengröße: 0,45 $\mu$ m		

## Fortsetzung

Artikel	Name	Hersteller / Händler	Artikel-Nr.
<i>andere Materialien</i>	Fuji RX Röntgenfilm	Hugo Rost	†
	Minisart RC4	Sartorius	17.822
	Ø 4mm Porengröße: 0,45µm		
	Optitran BA-S 83 (63x84mm) Porengröße: 0,45µm	Schleicher & Schuell	10.439.393
	Membranfilter OE67 Celluloseacetat	Schleicher & Schuell	10.404.006
	Ø 25mm Porengröße: 0,45µm		
	Protran BA 79 Porengröße: 0,1µm	Schleicher & Schuell	402.096
<i>Handschuhe</i>	Latexhandschuhe, puderfrei	Roth	C269.1
<i>SchlauchverschlüÙe</i>	Schlauchverschluß (12mm)	Eydam†	9.206.734
	Mediclip (50mm)	Eydam†	9.206.300
	Dr. Goos Verstärkerfolie (feinzeichnend)	Hugo Rost	†
	Parafilm® (American National Can™)	Eydam†	9.170.002
	Kodak Filter Wratten 22	Kodak	†

† ohne Angabe ‡ ohne Angabe des Herstellers

## 7.10 Verwendete Software

Name	Lizenznehmer
Biometra ScanPack 3.0 Vers.4.75	Zoologisches Institut der CAU, Abt. Zoophysiology
GraphPad Prism 1.02	Klinikum der CAU, Hautklinik
Hyper Vers. 1.1s	im Rahmen des <i>Shareware</i> -Probezeitraums
Micrografx Designer 6.0	Martin Lobemeier
Micrografx Picture Publisher 6.0	Martin Lobemeier
Microsoft Excel 97	Martin Lobemeier
Microsoft Word für Windows 95	Martin Lobemeier
Scion PC-Image	Freeware
SPSS für Windows	Zoologisches Institut der CAU, Abt. Ökologie
Tecan easyWIN fitting Ver. 6.0a	Zoologisches Institut der CAU, Abt. Zoophysiology

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Kiel, den 25.05.2000

---



## LEBENS LAUF

<b>NAME</b>	Lobemeier
<b>VORNAMEN</b>	Martin Landolf
<b>GEBURTSDATUM</b>	26.09.1970
<b>GEBURTSORT</b>	Eckernförde; Staatsangehörigkeit: deutsch
<b>FAMILIENSTAND</b>	seit 03.06.1994 verheiratet mit Maike Ehmsen 04.09.1994 Geburt unserer Tochter Eva Lotta Ehmsen
<b>SCHULBILDUNG</b>	1976-1980 Max-Tau-Grundschule, Kiel-Mettenhof 1980-1989 Alexander-von-Humboldt-Schule, Kiel 04.06.1989 Abitur
<b>WEHRDIENST</b>	01.10.1989 - 30.09.1990 in Neumünster
<b>STUDIUM</b>	01.10.1990 - Studium der Biologie an der Christian-Albrechts- 02.09.1996 Universität, Kiel 30.10.1992 Vordiplom Nov.1995 Diplomprüfung in den Fächern Zoologie, Botanik, Biochemie und dem Zusatzfach Mikrobiologie 02.09.1996 Abschluß mit Diplom; Titel der Diplomarbeit: „Peptiderge Neurone im Nervensystem von <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae) und die Einflußnahme von Pyrethroiden <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .“ angefertigt am Biochemischen Institut der CAU.
<b>BERUF</b>	01.10.1996 - wissenschaftlicher Angestellter am Zoologischen 31.03.2000 Institut der CAU

