# Biochemische und physiologische Untersuchungen der lysosomalen sauren Lipase im transgenen Tiermodell

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

> vorgelegt von Stefanie Mayet aus Berlin

> > Hamburg 2003

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg auf Antrag von Frau Professor Dr. U. BEISIEGEL Weitere Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. H. BRETTING

Tag der Disputation: 31. Oktober 2003

Hamburg, den 02. Oktober 2003



Ano 40

Professor Dr. A. Frühwald Dekan

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
	<ul> <li>1.1 Lipidstoffwechsel</li> <li>1.1.1 Lipide</li> <li>1.1.2 Lipoproteinmetabolismus</li> <li>1.1.2.1 Exogener Weg</li> <li>1.1.2.2 Endogener Weg</li> <li>1.1.2.3 Reverser Cholesterintransport</li> <li>1.1.3 Stoffwechsel der Leber</li> <li>1.1.3.1 Lipidstoffwechsel der Leber</li> <li>1.1.3.2 Intrazelluläre Lipidhomöostase</li> </ul> 1.2 Lysosomale saure Lipase <ul> <li>1.2.1 Stoffwechsel lysosomaler Enzyme</li> <li>1.2.2 Lipasen</li> <li>1.2.3 Funktion und Molekularbiologie der lysosomalen sauren Lipase</li> </ul>	2 2 3 3 4 5 7 8 11 17 17 18 20
	<ul><li>1.2.4 Wolman´sche Krankheit und Cholesterinester-Speicherkrankheit</li><li>1.2.5 Tiermodelle der Defizienz der lysosomalen sauren Lipase</li></ul>	22 25
	1.3 Transgene Mausmodelle	26
	1.4 Ziel der Arbeit	28
2	MATERIAL UND METHODEN	29
	2.1 Material	29
	<ul> <li>2.1.1 Geräte</li> <li>2.1.2 Verbrauchsmaterialien</li> <li>2.1.3 Chemikalien, Proteine und Enzyme</li> <li>2.1.4 Kits</li> <li>2.1.5 Primer</li> <li>2.1.6 Antikörper</li> <li>2.1.7 Adenoviren, Bakterienstämme, Mäuse, Plasmide, und Zelllinien</li> <li>2.1.8 Zellkulturmedien</li> </ul>	29 30 31 31 32 32 33
	2.2 Methoden	33
	<ul> <li>2.2.1 Molekularbiologische Methoden</li> <li>2.2.1.1 Standardmethoden</li> <li>2.2.1.2 Klonierung des Plasmids pcDNA3-CMV-ApoAI-hLAL</li> <li>2.2.1.3 DNA-Sequenzierung</li> <li>2.2.2 Zellkultur</li> </ul>	33 33 35 36 37

	<ul> <li>2.2.6 Quantifizierung von mRNA</li> <li>2.2.6.1 Präparation von Gesamt RNA</li> <li>2.2.6.2 Amplifikation und Quantifizierung der mRNA durch Reverse Transkription und</li> </ul>	43 43
	Echtzeit-PCR 2.2.7 Messung der enzymatischen Aktivität der lysosomalen sauren Lipase 2.2.7.1 Proteinextraktion 2.2.7.2 Proteinbestimmung 2.2.7.3 Trioleinhydrolyse 2.2.7.4 Cholesteryloleinhydrolyse 2.2.8 Bestimmung von Lipiden 2.2.8.1 Enzymatische Bestimmung von Lipiden 2.2.8.2 Gelfiltration 2.2.8.3 Bestimmung des Fettsäuremusters mittels Gaschromatographie 2.2.9 Histologie 2.2.10 Westernblotanalyse 2.2.10.1 Proteinextraktion aus der Leber 2.2.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 2.2.10.3 Westernblot 2.2.11 Messung der enzymatischen Aktivität der Katalase und der sauren Phosphatase 2.2.12 Sicherheitsvorkehrungen und Entsorgung 2.2.13 Statistik	43 45 46 46 47 48 48 48 50 51 52 53 53 53 54 55 56
3	ERGEBNISSE	57
	<ul> <li>3.1 Transiente Überexpression der lysosomalen sauren Lipase im Zellkultursystem</li> <li>2.2 Etablierung einer LAL übereursimierenden Meuelinie</li> </ul>	57
	<ul> <li>3.2.1 Klonierung des Expressionsplasmids pc-DNA3-CMV-ApoAI-hLAL</li> <li>3.2.2 Charakterisierung des Transgens ApoAI-hLAL in Zellkultur</li> <li>3.2.3 Generierung und Identifikation von transgenen Mäusen</li> <li>3.2.4 Etablierung homozygot transgener Mauslinien</li> <li>3.2.5 Generierung eines LAL-spezifischen Antikörpers</li> </ul>	58 61 62 64 64
	3.3 Physiologische Charakterisierung der <i>in vivo</i> Überexpresssion der lysosomalen sauren Lipase	66
	<ul> <li>3.3.1 mRNA-Expression der humanen und murinen LAL</li> <li>3.3.1.1 Etablierung der reversen Transkription und der PCR</li> <li>3.3.1.2 RNA-Isolierung aus Darm und Leber</li> <li>3.3.1.3 Standardisierung der Echtzeit-PCR</li> <li>3.3.1.4 mRNA-Expression der humanen transgenen und endogenen murinen lysosom sauren Lipase</li> <li>3.3.2 Aktivität der lysosomalen sauren Lipase in der Leber</li> <li>3.3.3 Immunhistologischer Nachweis der lysosomalen sauren Lipase</li> <li>3.3.4 Fettsäurenzusammensetzung der Leber</li> <li>3.3.5 Plasmalipide und Plamalipoproteinprofil</li> </ul>	67 69 70 alen 72 73 75 75 75
	3.4 Physiologische Charakterisierung der <i>in vivo</i> Überexpression der lysosoma sauren Lipase unter einer westlichen Diät	ilen 79
	<ul> <li>3.4.1 Plasmalipide und Plasmalipoproteinprofil</li> <li>3.4.2 Auswirkungen der westlichen Diät auf die Leber</li> <li>3.4.2.1 Lipide</li> <li>3.4.2.2 Proliferation der Peroxisomen</li> <li>3.4.2.3 Einfluss auf die Expression von regulatorisch wichtigen Proteinen des Lipidstoffwechsels</li> </ul>	81 84 87 89

4		DISKUSSION	94
	4.1	Generierung eines transgenen Tiermodells der leberspezifischen Überexpression der lysosomalen sauren Lipase	94
	4.2	Bedeutung der lysosomalen sauren Lipase unter normaler Haltungsdiät	97
	4.3	Bedeutung der lysosomalen sauren Lipase unter "westlicher" Diät	101
	4.4	Pathophysiologische Überlegungen zur Überexpression der lysosomalen sauren Lipase	109
5		ZUSAMMENFASSUNG	111
6		ANHANG	113
	6.1	Sequenzierung des leberspezifischen Promotorfragmentes des humanen Apo A-I	113
	6.2	Plasmalipide der Mauslinien 21 und 24	114
	6.3	Plasmalipoproteinprofil der Mauslinie 21	115
	6.4	Zusätzliche Westernblotanalysen von Leberproteinen nach westlicher Diät	116
7		VERZEICHNISSE	118
	7.1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	118
	7.2	Abkürzungsverzeichnis	120
	7.3	Literaturverzeichnis	122
8		DANKSAGUNG	142

# 1 Einleitung

Der Lipoproteinstoffwechsel wird durch den intrazellulären Lipidstoffwechsel und das intravaskuläre Transportsystem reguliert. Dabei spielen neben den Transportproteinen (Apolipoproteine) und den Lipoproteinrezeptoren vor allem verschiedene lipolytische Enzyme eine Rolle. Die vorliegende Arbeit untersucht ein solches intrazelluläres lipolytisches Enzym: die lysosomale saure Lipase (LAL). Die LAL ist in allen Zellen essentiell für die Hydrolyse von Cholesterinestern und Triglyzeriden, welche durch das Lipoproteinrezeptorsystem den Lysosomen zugeführt werden.

Die Regulationsmechanismen des Lipidstoffwechsels und die Verflechtung mit hormonellen und neurochemischen Vorgängen sind Gegenstand aktueller Forschung und von starkem klinischen Interesse, da Störungen des Lipidstoffwechsels maßgeblich am Auftreten folgenschwerer und kostenintensiver Erkrankungen beteiligt sind. Die Entwicklung solcher Störungen wird durch endogene und exogene Faktoren beeinflusst. Als endogene Faktoren werden genetische Veränderungen bezeichnet, die zu Fehlfunktionen im Körper führen. Hierzu gehören seltene dominante Defekte in Genen des Lipidstoffwechsel, die direkt zu Stoffwechselstörungen führen. Betroffen sein können Gene der Apolipoproteine, der Lipoproteinrezeptoren und der verschiedenen Enzyme (Assmann 1982; Breslow 1989; Cooper 1990; Lusis 2000; Beisiegel 1995), inklusive der LAL. Erste Hinweise auf die Bedeutung der LAL gab es durch die klinische Beschreibung von zwei Krankheiten, die durch die Defizienz der Lipase verursacht werden: die Wolman'sche Krankheit (WD) (Abramov et al. 1956; Patrick & Lake 1969; Wolman et al. 1961; Crocker et al. 1965) und die Cholesterinester-Speicherkrankheit (CESD) (Fredrickson 1963; Burke & Schubert 1972; Infante et al. 1967; Lageron et al. 1967). Rezessive genetische Veränderungen und Polymorphismen werden oft erst klinisch relevant, wenn exogene Einflüsse hinzukommen.

Als exogene Faktoren werden Einflüsse von außen wie Lebensgewohnheiten und Umwelteinflüsse bezeichnet. Dazu gehören Essgewohnheiten, körperliche Aktivität, Alkoholkonsum und Rauchen (Genest et al. 1991; Genest, Jr. et al. 1992; Schaefer 2002; Simon et al. 1985). Lipidstoffwechselstörungen treten in den westlichen Ländern häufig als Folge langjähriger Fehlernährung auf und gehen dann oft mit Übergewicht einher. Übergewicht kann mit Diabetes mellitus Typ II und mit atherosklerotischen Veränderungen vergesellschafte sein, welche koronare Herzkrankheiten und

1

periphere arterielle Verschlüsse nach sich ziehen können. Herz-Kreislauferkrankungen sind die häufigsten Krankheits- und Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland und anderen Ländern der zivilisierten Welt.

Im Folgenden wird zunächst in den Lipidstoffwechsel allgemein eingeführt. Hierzu gehören der Transport der Lipoproteine sowie der intrazelluläre Lipidstoffwechsel der Leber, unter besonderer Berücksichtigung der Regulationsmechanismen zur Wahrung der zellulären Lipidhomöostase. Nach einer allgemeinen Beschreibung von Lipasen, werden anschließend Funktionen, strukturelle und biochemische Eigenschaften der LAL sowie Auswirkungen einer Defizienz des Enzyms in Mensch und Tier beschrieben. Abschließend wird kurz auf die Technik und Anwendung von gentechnisch veränderten Tiermodellen eingegangen.

# 1.1 Lipidstoffwechsel

# 1.1.1 Lipide

Lipide sind lipophile Stoffe, die im Wasser nicht oder nur schlecht löslich sind und sich in hydrolysierbare und nichthydrolysierbare Lipide einteilen. Zu der ersten Gruppe gehören die einfachen Ester (Triglyzeride, Wachse, Sterolester), Phospholipide (Phosphatiden und Sphingolipiden) und Glykolipide (Cerebroside, Ganglioside). Zu den nichthydrolysierbaren Lipiden gehören die Isoprenoide (Carotenoide: Vitamin A, E und K), Lipidalkohole (Alkanole, zyklische Sterole wie das Cholesterin und Vitamin D und Steroide wie das Östrogen und Testosteron) sowie Fettsäuren und deren Derivate, wie die Eicosanoide.

Die wichtigsten Funktionen der verschiedenen Lipide sind im Folgenden kurz aufgelistet. Fettsäuren, gespeichert in Triglyzeriden, sind der wichtigste Energieträger der Nahrung und stellen die bedeutendste Energiereserve dar. Lipide sind essentiell als Isolator und gewährleisten die thermische Isolierung durch Einlagerung im subkutanen Gewebe und um verschiedene Organe. Lipide sind gleichzeitig lebenswichtige Baustoffe. Phospholipide, Glykolipide und Cholesterin sind Hauptbestandteil von Membranen. Als Hauptbestandteil der Zellmembran dienen Lipide der mechanischen und elektrischen Isolierung der Zelle und ermöglichen den Aufbau eines elektrischen Membranpotentials. Einige werden als "Anker" benutzt, um Moleküle an eine Membran zu heften. Lipide sind außerdem Cofaktoren von enzymatischen Reaktionen (Blutgerinnung, Elektronentransport) oder haben eine Rolle im Sehprozess (Carotinoide). Steroide, Vitamine, Eicosanoide und andere Derivate von Phospholipiden haben zudem Signalfunktion und dienen als Hormone, Mediatoren und Second-Messenger.

## 1.1.2 Lipoproteinmetabolismus

Lipide wie primär Triglyzeride, Cholesterin, Cholesterinester und Vitamine werden im Plasma in Form von Lipoproteinkomplexen transportiert. Diese bestehen aus Lipiden und Transportproteinen, den Apolipoproteinen. Den hydrophilen Kern dieser Komplexe bilden die apolaren Cholesterinester und Triglyzeriden, sowie andere lipidlösliche Substanzen (z. B. Vitamine). Die Hülle besteht aus den amphiphilen Phospholipiden, freiem Cholesterin und den Apolipoproteinen.

Die klassische Einteilung der Lipoproteine erfolgt nach ihrem Dichteverhalten in der Ultrazentrifugation in folgende Hauptgruppen: Chylomikronen, Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL), Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL), Lipoproteine geringer Dichte (LDL) und Lipoproteine hoher Dichte (HDL). Die Apolipoproteine haben spezielle Funktionen bei der Entstehung, dem Transport und dem Metabolismus der Lipoproteine. Mit Ausnahme von Apolipoprotein (a) (Apo (a)) sind sie amphiphatische Proteine mit hydrophoben und hydrophilen Anteilen, die sowohl Lipidbindung als auch Wasserlöslichkeit vermitteln können (Kostner & März 2001). Der Stoffwechsel der Lipoproteine verläuft über drei verschiedene Wege: einen exogenen Weg, einen endogenen Weg und den so genannten reversen Cholesterintransport.

#### 1.1.2.1 Exogener Weg

Der exogene Weg beginnt mit der Synthese der Chylomikronen in der Dünndarmwand. Mit der Nahrung aufgenommene Lipide werden im Duodenum mit Hilfe der Gallensalze emulgiert, z. T. enzymatisch gespalten und in die Epithelzellen der Darmwand aufgenommen. Die reveresterten Triglyzeride, Cholesterinester und sonstige Lipide sowie andere lipidlösliche Substanzen wie Vitamine werden mit einer Hülle aus Phospholipiden und den Apolipoproteinen (Apo) A-I, A-II, A-IV und B-48 umgeben. Nach ihrer Sekretion in die Lymphe gelangen die Chylomikronen über den Duktus thoracicus in die Blutzirkulation. Hier nehmen sie die von der HDL bereitgestellten Proteine Apo C-II, C-III und E auf und geben Apo A-I und A-II ab (Hussain et al. 1996). Vor allem in den Muskel- und Fettgewebskapillaren hydrolisiert die durch Apo C-II aktivierte endothelständige Lipoprotein-Lipase (LpL) die Triglyzeride der Chylomikronen (Mahley & Ji 1999; Merkel et al. 2002; Olivecrona & BengtssonOlivecrona 1993). Die hierbei freigesetzten Fettsäuren werden vom peripheren Gewebe aufgenommen und als Energiequelle oder zur Einspeicherung genutzt. Im Verlauf ihres Stoffwechsels verlieren die Chylomikronen ihre C-Apolipoproteine. Nach weiteren Interaktionen vor allem mit der HDL bleibt schließlich ein cholesterinester- und Apo E-reicher Restpartikel (Chylomikronen-Remnant) übrig. Dieser wird vor allem durch Apo E-vermittelte, hepatische Aufnahme aus der Zirkulation entfernt (Beisiegel 1995; Beisiegel et al. 1994). Apo E vermittelt einerseits die Bindung an den LDL-Rezeptor (LDL-R), andererseits ermöglicht es ihre Aufnahme über das LDL-Rezeptor-related Protein (LRP) (Kowal et al. 1989; Kowal et al. 1990; Kuhn et al. 1995; Rohlmann et al. 1998; Beisiegel et al. 1989; Beisiegel et al. 1994). Bei dieser rezeptorvermittelten Aufnahme spielt auch die LpL als Ligand eine wichtige Rolle, welche unabhängig von ihrer enzymatischen Funktion ist (Beisiegel 1992; Kraemer 1992; Heeren et al. 2002; Merkel et al. 2002). In den Hepatozyten unterliegt ein Teil der Oberflächenkomponenten einem Recycling (z. B. Apo E), während der hydrophobe Kern dem lysosomalen Abbau zugeführt wird (Heeren et al. 2003; Heeren et al. 2001).

#### 1.1.2.2 Endogener Weg

Der endogene Fettstoffwechsel besteht aus dem VLDL-, IDL- und LDL-enthaltenden Apo B-100-System. Die in der Leber synthetisierten VLDL dienen vor allem im Hungerzustand der Versorgung des peripheren Gewebes mit Triglyzeriden und Cholesterin. Neben Apo B-100 und Apo E enthalten sie zunächst Phospholipide, Cholesterin und Triglyzeride (Fazio & Yao 1995; Kostner & März 2001). Im Plasma werden Apo C-I, C-II, C-III und E aus dem HDL-Pool auf die VLDL transferiert. Durch die katalytische Aktivität der LpL an den Endothelzellen verlieren die VLDL ihre Triglyzeride, daraus resultieren VLDL-Remnants und die kleineren und dichteren IDL-Partikel. Gleichzeitig werden Apo C-II, C-III, E, Phospholipide und freies Cholesterin an die HDL abgegeben und Cholesterinester, vermittelt durch die Aktivität des Cholesterinester-Transferproteins (CETP), aus der HDL aufgenommen. Im Verlauf weiterer Lipolyse u. a. durch die hepatischen Lipase (HL) werden die IDL zu den cholesterinreichen LDL-Partikeln konvertiert (Grosser et al. 1981; Rubinstein et al. 1985). Die VLDL-Remnants und IDL können auch direkt aus der Zirkulation entfernt werden (Havel & Hamilton 1988). Die zelluläre Aufnahme von LDL erfolgt hauptsächlich Apo B/E-vermittelt über rezeptorvermittelte Endozytose durch den LDL-R. Dieser wird sowohl von der Leber als auch von allen extrahepatischen Geweben exprimiert, die höchste bekannte Rezeptordichte haben aufgrund ihres hohen Cholesterinbedarfs die Nebennieren (Faust et al. 1977). Ungefähr 30 % der LDL-Partikel werden über LDL-R-unabhängige Mechanismen, dem so genannten "scavanger pathway" absorbiert (Illingworth 1993). Scavanger-Rezeptoren werden vor allem von Makrophagen und anderen Zellen des Retikulo-histiozytären Systems exprimiert und binden modifizierte LDL. Dieser Stoffwechselweg ist nicht sättigbar, unterliegt also keiner Feedbackregulation. Bei übermäßiger Infiltration von LDL in die Gefäßwand nehmen Makrophagen proportional viel LDL auf und es kommt zur Transformation vom Makrophagen in eine Schaumzelle. Damit spielt der "scavanger pathway" eine besondere Rolle in der Ausbildung von atherosklerotischen Veränderungen (Krieger & Herz 1994).

### 1.1.2.3 Reverser Cholesterintransport

Da nur die Leber Cholesterin oder Gallensäuren ausscheiden kann, dient der reverse Cholesterintransport durch die HDL dem Transfer des Cholesterins aus den peripheren Zellen hin zur Leber. Die Gruppe der HDL besteht aus einer Vielzahl von in Größe, Dichte und Apolipoproteingehalt variierenden Untergruppen der HDL, die jeweils unterschiedliche Funktionen erfüllen. Lipidreiche HDL entstehen aus lipidarmen Partikeln oder sogar aus lipidfreien Apolipoproteinen (Barrans et al. 1996; Eisenberg 1984; Fielding & Fielding 1995a; von Eckardstein et al. 1994; Oram & Yokoyama 1996). Diese lipidarmen HDL-Vorläufer werden entweder als naszierende HDL in Hepatozyten (Castle et al. 1991; Forte et al. 1987; McCall et al. 1989; McCall et al. 1988; Thrift et al. 1986) sowie in der Mukosa des Dickdarms (Danielsen et al. 1993; Forester et al. 1983; Green et al. 1978) produziert oder entstehen durch Dissoziation während der Lipolyse von Chylomikronen und VLDL (Musliner et al. 1991; Tam & Breckenridge 1983; Schaefer et al. 1982). Wichtigstes Apolipoprotein dieser Partikel ist das Apo A-I (Schmitz et al. 1985). Lipidarme HDL und lipidfreies Apo A-I werden zu reifen, lipidreichen und sphärischen HDL durch die Aufnahme von Phospholipiden und unverestertem Cholesterin, die Veresterung des Cholesterins durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) und die Aufnahme weiterer Apolipoproteine (Clay & Barter 1996; Huang et al. 1995; Ishida et al. 1990; Liang et al. 1996; Miida et al. 1992; Neary et al. 1991).



#### Abbildung 1: Übersicht des Lipoproteinmetabolismus

Im Stoffwechsel der Lipoproteine des Plasmas wird zwischen einem exogenen Weg (grau unterlegt), einem endogenen Weg (weiß unterlegt) und dem reversen Cholesterintransport (blaue Pfeile) unterschieden. Über den exogenen Weg werden Lipide aus der Nahrung von Zellen der Darmmukosa zu triglyzeridreichen Chylomikronen assoziiert. Diese gelangen über die Lymphe in die Blutbahn, wo die LpL die Triglyzeride hydrolysiert und Fettsäuren freisetzt. Es entstehen cholesterinreiche Chylomikronen-Remnants, welche über spezifische Rezeptoren (LDL-R, LRP) aufgenommen werden. Über den endogenen Weg werden Lipide von der Leber zu VLDL assoziiert und sekretiert. Diese wandeln sich durch die LpL- und HL-vermittelte Hydrolyse der Triglyzeride zu cholesterinreiche LDL um. Die Aufnahme in die Leber und dem peripheren Gewebe erfolgt rezeptorvermittelt. Modifizierte LDL wird außerdem von Scavanger-Rezeptoren der Makrophagen endozytiert. Der reverse Cholesterintransport  $(\rightarrow)$ befördert Cholesterin von den peripheren Zellen zur Leber, welches als einziges Organ Cholesterin über Gallensäuren ausscheiden kann. Vorläufermoleküle der HDL ( 🗢 ) werden von der Darmmukosa und der Leber hergestellt. Durch Aufnahme und Veresterung von Cholesterin entstehen reife HDL, welche Cholesterin mit Beteiligung des ABCA1-Transporters aus Zellen aufnehmen und Lipide und Apolipoproteine mit anderen Lipoproteinklassen austauschen, bevor sie von der Leber über HDL-spezifische Rezeptoren (SR-BI) aufgenommen werden. Chylo: Chylomikronen. Chylo. Rem.: Chylomikronen-Remnants. LpL: Lipoprotein-Lipase. HL: hepatische Lipase, LDL-R: LDL-Rezeptor, LRP: LDL-Rezeptor-related Protein, HDL: Lipoprotein hoher Dichte, LDL: Lipoprotein geringer Dichte, IDL: Lipoprotein mittlerer Dichte, VLDL: Lipoprotein sehr geringer Dichte, LCAT: Leithin-Cholesterin-Acyl-Transferase, CD36 und SRA: "Scavenger"-Rezeptoren, ABCA1: "ATP-binding Cassette Transporter 1", SR-BI: Scavanger-Rezeptor Klasse B Typ I, PLTP: Phospholipid-Transferprotein

Bei diesem Prozess dienen vermutlich die Plasmamembranen peripherer Körperzellen als Lipidspender unter Beteiligung des "ATP-binding Cassette Transporter 1" (ABCA1) (Lawn et al. 1999; Rust et al. 1999). Weitere Komponenten werden über Austausch mit Apo B-haltigen Lipoproteinen erlangt (Takahashi & Smith 1999; Heeren et al. 1999), so dass ein Komplex von Phospholipiden, weiteren Apolipoproteinen (Apo A-I, A-II, A-IV und E) sowie der LCAT und dem CETP entsteht. In der HDL wird das Cholesterin durch die LCAT verestert, so dass der Gradient der Konzentration an freiem Cholesterin immer zugunsten der Diffusion in Richtung HDL bestehen bleibt.

Die Cholesterinabgabe der HDL verläuft auf verschiedenen Wegen. Zum einem wird lipidreiche HDL durch die Aktivitäten des CETP (Clay et al. 1992; Francone et al. 1996; Hennessy et al. 1993; Liang et al. 1994), des Phosphoplipid-Transferproteins (PLTP) (Koo et al. 1985; von Eckardstein et al. 1996), der endothelialen Lipase (EL) (Cohen 2003; Ishida et al. 2003) und der HL (Barrans et al. 1994) wieder in lipidarme HDL umgewandelt. Das HDL kann als ganzer Partikel Apo A-I- bzw. Apo E-rezeptorvermittelt in Hepatozyten aufgenommen werden (Tall et al. 2000; Curtiss 2000). Außerdem können hepatische oder extrahepatische Zellen Cholesterinester der HDL auch ohne gleichzeitige Endozytose selektiv aufnehmen. In diesem Mechanismus ist der Scavanger-Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI) involviert (Rinninger et al. 1994; Krieger 1999; Trigatti & Rigotti 2000).

## 1.1.3 Stoffwechsel der Leber

Die Leber ist das zentrale und größte Stoffwechselorgan des menschlichen und tierischen Körpers. Obwohl im Menschen nur etwa 1500-2000 g schwer (entsprechen 4 % des Körpergewichtes), wird die Leber von 28 % des Blutflusses durchströmt und verbraucht etwa 20 % des gesamten Körpersauerstoffes. Den Blutzustrom erhält sie einerseits von den Blutgefäßen, die nährstoffreiches Blut vom Darm transportieren, wodurch die Nahrungsbestandteile sofort weiterverarbeitet werden können. Zum anderen erhält sie sauerstoffreiches Blut aus den Arterien des großen Kreislaufs. Nach dem Durchströmen der Leber gelangt das Blut beider zuführender Systeme zurück in den großen Kreislauf, von wo es über das Herz verteilt wird.

Zu den wichtigsten Funktionen der Leber gehören der Abbau stoffwechseleigener und stoffwechselfremder Substanzen über Biotransformationsreaktionen, die Aufnahme und Verwertung von Nahrungsbestandteilen, die Bereitstellung lebenswichtiger Verbindungen (z. B. Serumalbumin, Gerinnungsfaktoren), die Speicherung von Vitaminen und Spurenelementen und die konstante Versorgung des Organismus mit energiereichen Metaboliten und Baustoffen. Die Leber ist essentiell an der Regulation des Glukose- und Fettstoffwechsels beteiligt: sie ist zentrales Speicherorgan von Energie in Form von Glukose und reguliert das Kohlenhydratgleichgewicht im Blut durch Glukogenese, Glykolyse und Glukoneogenese. Die Leber nimmt die Glukose aus dem Darmvenenblut auf und sorgt für eine geregelte Abgabe an den restlichen Körper. Die Leber kann überschüssige Glukose in Form von Glykogen speichern und als einziges Organ bei Bedarf abgeben. Im Zustand des Hungerns vermag sie Glukose aus anderen Nahrungsbestandteilen herzustellen um den Blutzuckerspiegel konstant zu halten. Sie kontrolliert außerdem den Cholesterin- bzw. Lipidstoffwechsel durch Lipidsynthese, Aufnahme und Sekretion der Plasmalipoproteine sowie Bildung und Ausscheidung der Galle. Einige dieser Leistungen, wie die Umwandlung des Cholesterins in Gallensäuren und die Ketonkörpersynthese sind leberspezifisch, die meisten Lipoproteine des Blutplasmas sind zudem Syntheseprodukte der Leber.

# 1.1.3.1 Lipidstoffwechsel der Leber

Die Versorgung der Zelle mit Lipiden erfolgt über die Aufnahme von Lipiden aus dem Blutkreislauf und über die Eigensynthese von Lipiden. Ein essentieller Aufnahmemechanismus von Lipiden in die Zelle ist die rezeptorvermittelte Endozytose von im Blut zirkulierenden Lipoproteinen. Die Aufnahme von LDL über den LDL-Rezeptor sowie einige Regulationsmechanismen des Cholesterinspiegels in der Zelle sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Nach Bindung des Lipoproteins an einen spezifischen Rezeptor, wie z. B. Apo E an den LDL-R, schnüren sich "Clathrin-coated pits" ab, aus denen nach Absinken des pH-Wertes und Verlust der Clathrinhülle Endosomen entstehen. Diese fusionieren mit einem Lysosom, welches lysosomale Enzyme enthält, die bei dem mit Hilfe von Protonenpumpen eingestellten pH-Wert von etwa 4,5 aktiv sind. Proteine, die dem Verdau durch die hydrolytischen Enzyme entgehen sollen, werden wie der LDL-R in sich vom Endosom abschnürenden Vesikel, den "compartments of uncoupling of receptor and ligand" (CURL), zurück zur Plasmamembran transportiert und auf diese Weise recycelt.



#### Abbildung 2: Der intrazelluläre Kreislauf des LDL-Rezeptors

LDL-Rezeptoren werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, über den Golgi-Apparat prozessiert und an die Plasmamembran transportiert. Dort bindet der Rezeptor LDL und reichert sich in spezialisierten Regionen der Zellmembran, den "coated pits" an. Diese werden internalisiert. Durch Absenken des pH-Wertes kommt es zur Dissoziation von Ligand und Rezeptor im "compartment of uncoupling of receptor and ligand" (CURL). Der Rezeptor wird wieder zur Membran recycelt. Durch Fusion mit einem primären Lysosom entstehen sekundäre Lysosomen, in denen der Proteinanteil der LDL (Apolipoprotein B) durch Proteasen abgebaut und die Lipide durch die LAL gespalten werden. Das freigesetzte Cholesterin bzw. dessen Oxysterolderivate löst eine Reihe regulatorischer Reaktionen aus. U. a. supprimiert es die Transkription der Gene für LDL-Rezeptoren, HMG-CoA-Reduktase und HMG-CoA-Synthase. Ferner beschleunigt es den Abbau bereits vorhandener HMG-CoA-Reduktase-Moleküle. Schließlich wird die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) aktiviert, die freies Cholesterin verestert und damit in seine Speicherform überführt. Abbildung nach (Kostner & März 2001).

Der Proteinanteil der im Lysosom verbleibenden Lipoproteine wird von Proteasen hydrolysiert und abgebaut, die Triglyzeride und Cholesterinester werden von der LAL hydrolisiert. Die freigesetzten freien Fettsäuren und das freie Cholesterin werden über Transportproteine aus dem Lysosom ausgeschleust und stehen dann der Zelle zur weiteren Verwendung zur Verfügung (Brown et al. 1976; Brown & Goldstein 1983b; Goldstein et al. 1975). Freies Cholesterin kann auch unabhängig vom endosomalen/lysosomalen Weg in die Zelle aufgenommern werden. Der HDL-Rezeptor SR-BI vermittelt diese selektive Aufnahme von Cholesterin in hepatische und steroidhormonproduzierende Zellen (Rigotti et al. 1997). Außerdem gelangt freies Cholesterin caveolinvermittelt in die Plasmamembran vieler Zelltypen (Fielding & Fielding 1995b; Huang et al. 1993).

Freie Fettsäuren werden zum einen LpL- und HL-vermittelt selektiv aus Lipoproteinen in die Zelle aufgenommen; zum anderen werden Fettsäuren an Albumin gebunden im Blut transportiert und gelangen dann über spezielle Fettsäuretranslokasen in Verbindung mit Albuminrezeptoren in die Zelle.

Die Leber kann Cholesterin in relativ großen Mengen synthetisieren: es wird mehr Cholesterin neu synthetisiert als über die Nahrung aufgenommen. Im Durchschnitt nimmt der Mensch täglich 300-500 mg mit der Nahrung auf (Maus: 0,4 mg bei normaler Haltungsdiät), während 600–900 mg täglich synthetisiert werden (Maus: 3,3 mg) (Repa & Mangelsdorf 2000). Die Leber ist als einziges Organ in der Lage, überschüssiges Cholesterin aus dem Körper zu entfernen, nämlich durch den Abbau zu Gallensäuren und Sekretion in die Galle (biliäre Sekretion). Cholesterin wird entweder als freies Cholesterin ausgeschieden oder zuvor in Gallensalze konvertiert. In der Galle bilden Phospholipide, Cholesterin und Gallensalze so genannte "mixed micelles", wodurch die Zellen, die die Gallengänge auskleiden, gegen die aggressive Wirkung der Gallensalze geschützt werden. Nach der Sekretion über die Galle werden Gallensalze effizient im Darm reabsorbiert und zur Leber zurücktransportiert. Diese so genannte enterohepatische Zirkulation hängt von spezifischen Transportproteinen ab, die für die Aufnahme in die Leber (natriumabhängiges Taurocholat-cotransportierendes Protein), die Sekretion in die Galle (Gallensalz-Exportpumpe) und die Reabsorption im Darm verantwortlich sind (apikaler natriumabhängiger Gallensalztransporter). Dieser Zyklus spielt in der Regulation der Cholesterinhomöostase eine wichtige Rolle (Agellon & Torchia 2000; Chiang 2003; Wolkoff & Cohen 2003).

Neben Cholesterin synthetisiert die Leber auch Fettsäuren und Tiglyzeride. Abhängig vom Energiestatus und Bedarf der Zelle kommt es entweder zur Erhöhung der Fettsäuresynthese oder der Fettsäureoxidation. So wird z. B. bei erhöhter exogener Cholesterinzufuhr die Synthese von Fettsäuren zur Veresterung des Cholesterins aktiviert. Bei positiver Energiebilanz kommt es zu einer verstärkten Fettsäureoxidation und zu einer verstärkten Triglyzeridsynthese, welche zum Teil gespeichert und zum Teil in die oben beschriebenen VLDL-Partikel verpackt und in den Blutkreislauf sekretiert werden. Neben Cholesterin(estern) liefern diese VLDL-Partikel energiereiche Substrate an periphere Gewebe. Mehrere Faktoren (z. B. Insulin, Cholesterinsynthese, Phospholipidsynthese) sind an der Regulation der VLDL-Sekretion beteiligt.

### 1.1.3.2 Intrazelluläre Lipidhomöostase

Die Konzentration an freiem Cholesterin sowie an freien Fettsäuren wird von der Zelle über komplexe Mechanismen reguliert, die in den folgenden zwei Kapiteln beschrieben werden.

#### 1.1.3.2.1 Freie Fettsäuren

Im wässrigen Milieu des Zytoplasmas binden freie Fettsäuren an zytosolische Fettsäure-bindende Proteine (cFABP), die sie zu ihrem Zielkompartiment transportieren. Sie werden je nach Zelle und Energiestatus über die β-Oxidation zur Energiegewinnung genutzt, an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) von der ACAT oder der Glyzerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) verestert und zur Speicherung von metabolischer Energie verwendet, zur Biogenese von Bestandteilen der Zellmembranen wie z. B. Phospholipide oder Spingolipide genutzt oder dienen als Ausgangsstoff bioaktiver Derivate wie z. B. Leukotriene, Thromboxane oder Prostaglandine. In Abbildung 3 sind schematisch die wichtigsten intrazellulären Wege von internalisierten Fettsäuren dargestellt. Die Zellantwort auf aufgenommene Fettsäuren ist abhängig von der Menge, der Qualität und der Dauer der Zufuhr exogener Fette, dem zellspezifischen Metabolismus und dem Vorkommen spezifischer Rezeptoren in der Zielzelle. Freie Fettsäuren modulieren über eine komplexe Signaltransduktion direkt oder indirekt die Aktivität vieler zellulären Prozesse, wie z. B. von Membranproteinen, Enzymen, Zelldifferenzierung und Zellaktivität über postranskriptionale Funktionen sowie über eine Veränderung der Expression von Genen (Jump 2002; Jump & Clarke 1999; Duplus & Forest 2002).

Diese Regulierung der Transkription geschieht über Transkriptionsfaktoren, welche z. T. direkt oder indirekt mit freien Fettsäuren interagieren. In der Abbildung 4 sind einige Transkriptionsfaktoren und ihre Zielgene dargestellt. Freie Fettsäuren induzieren die Transkription der Gene von Proteinen, die Fettsäuren transportieren und binden können, sowie Proteine zur Hydrolyse und Oxidation von Fettsäuren. Zudem wird die Transkription von Proteinen der Fettsäuresynthese sowie der Glukoneogenese inhibiert.



#### Abbildung 3: Intrazelluläre Stoffwechselwege von Cholesterin und Fettsäuren in der Leber

Cholesterin gelangt über rezeptorvermittelte Endozytose mit anschließender lysosomaler Hydrolyse oder über eine selektive, ebenfalls rezeptorvermittelte (SR-BI) Aufnahme in die Zelle. In der Zelle wird Cholesterin zur Einspeicherung, Lipoprotein- und Membransynthese verwendet. Je nach Zelltyp ist Cholesterin außerdem Ausgangsstoff für die Steroid- und Gallensäuresynthese sowie für die Herstellung bioaktiver Derivate. Fettsäuren gelangen zum einem über eine selektive Aufnahme aus triglyzeridreichen Lipoproteinen in die Zelle. Zum anderen werden Fettsäuren aus Fettzellen, welche im Blut an Albumin gebunden transportiert werden, ebenfalls selektiv aufgenommen. Durch Endozytose von cholesterinreichen Lipoproteinen gelangen weitere Fettsäuen in die Zelle. Dort dienen sie zum einem als Ausgangsstoff für die Synthese bioaktiver Moleküle; zum anderen können sie entweder dem katabolen Weg der  $\beta$ -Oxidation zur Energiegewinnung zugeführt werden oder dem anabolen Weg der Einspeicherung von Energie (Triglyzeride) sowie der VLDL- und Membransynthese (Phospholipide und Triglyzeride).

Eine Familie von Transkriptionsfaktoren sind die "peroxisomale Proliferatorenaktivierte Rezeptoren" (PPARs). Sie wurden zunächst in der Leber von Nagetieren entdeckt, wo sie eine Proliferation der Peroxisomen bewirken, was zur Namensgebung führte (Issemann & Green 1990; Reddy & Krishnakantha 1975). Es gibt drei verschiedene PPAR-Subtypen (PPARα, PPARβ/δ und PPARγ), welche von verschiedenen Genen codiert werden (Dreyer et al. 1992). Sie regulieren die Genexpression von Zielgenen durch die Bindung an so genannte PPAR-responsiven Elemente (PRE), wie ihn z. B. der Promotor der murinen ACO enthält (Lambe et al. 1999; Woodyatt et al. 1999). Sie dimerisieren mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und bei Bindung eines Agonisten interagieren sie mit Cofaktoren, so dass sich die Initiation der Transkription erhöht.



#### Abbildung 4: Regulation der Transkriptionsfaktoren durch freie Fettsäuren

Verschiedene Transkriptionsfaktoren vermitteln den Einfluß von freien Fettsäuren und deren aktivierter Form Fettsäure-Acyl-CoA-Thioester (FACoA) auf die Gentranskription: PPARα: peroxisomale Proliferatoren-aktivierter Rezeptor, LXR: Leber-X-Rezeptor, HNF4α: hepatischer nukleärer Faktor 4α und SREBP1c: sterolresponsives Element-bindendes Protein 1c. Die regulierten Gene sind an verschiedenen Prozessen des Lipidstoffwechsels beteiligt. ABCA1: ATP-binding Cassette Transporter A1; ACC: Acyl-CoA-Carboxylase; ACO: Acyl-CoA-Oxidase; ACD: Acyl-CoA-Dehydrogenase; ACS: Acyl-CoA-Synthase; ACL: ATP-Citrat-Lyase; CETP: Cholesterinester-Transferprotein; GPAT: Glyzerol-3-Phosphat-Acyltransferase; Cyp7A1: Cholesterin-7α-Hydroxylase A1; FABP: Fettsäure-bindende Proteine; FAS: Fettsäure-Synthase; G6Pase: Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase; LpL: Lipoprotein-Lipase; Oxyst.: Oxysterole; SCD1: Stearyl-CoA-Desaturase 1 (nach (Jump 2002)).

Die dominante Variante in der Leber ist PPAR $\alpha$  und wird von einer weiten Palette von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren aktiviert (Palmitinsäure, Linolsäure, Arachidonsäure) (Gottlicher et al. 1992). Weitere, mit Fettsäuren interagierende Transkriptionsfaktoren, sind der Leber-X-Rezeptor (LXR), der hepatische nukleäre Faktor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) und das sterolresponsives Element-bindendes Protein 1c

(SREBP1c). Über diese Faktoren ist der Metabolismus von Fettsäuren mit dem des Cholesterins verknüpft und beeinflusst über die Transkriptionsfaktoren LXR und SREBP1c u. a. Proteine der Gallensäuresynthese und des Cholesterintransports. Die verschiedenen Regulationswege variieren außerdem abhängig vom Sättigkeitsgrad der Fettsäuren (Berger & Moller 2002; Schultz et al. 2000; Kersten et al. 2000; Joseph et al. 2002; Osborne 2000; Hayhurst et al. 2001; Jump & Clarke 1999; Pawar et al. 2002).

#### 1.1.3.2.2 Cholesterin

Die Translokation aus dem Lysosom erfolgt über das Niemann-Pick C1 Protein (NPC1) (Neufeld et al. 1999; Strauss, III et al. 2002; Watari et al. 1999b; Watari et al. 1999a); weitere Proteine sind in den Transport des Cholesterins innerhalb der Zelle involviert wie z. B. das "Sterol-Carrier Protein 2" (SCP2), Caveolin oder das "Steroi-dogenic Acute Regulatory Protein" (StAR) (Hall & Almahbobi 1997; Arakane et al. 1998; Bose et al. 2002; Ikonen & Parton 2000; Pol et al. 2001; Frolov et al. 1996; Seedorf et al. 2000; Seedorf & Assmann 1991). Die Mehrheit des aus Lysosomen stammenden Cholesterins wird zur Plasmamembran und zum ER transportiert, wo eine Veresterung durch die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) stattfindet (Chang et al. 1997; Tabas 1995). Je nach Zelltyp wird ein Teil des Cholesterins zur Steroid-, Gallensäure- oder Lipoproteinsynthese verwendet. Die wichtigsten intrazel-lulären Stoffwechselwege des Cholesterins sind in Abbildung 3 schematisch zusammengefasst.

Die zelluläre Konzentration an Cholesterin wird präzise über Neusynthese, Influx, Efflux, Veresterung sowie in einigen spezialisierten Zellen über Synthese und Sekretion von Lipoproteinen, Steroidhormonen und Gallensäuren reguliert. Ein Überschuss an zellulärem Cholesterin führt zur transkriptionalen Repression einer Anzahl von Genen, involviert in die zelluläre Cholesterinhomöostase (LDL-R, HMG-CoA-Reduktase, HMG-CoA-Synthase, Farnesyldiphosphat-Synthase (FDPS) und Squalen-Synthase (SS)) (Brown & Goldstein 1997; Goldstein & Brown 1990; Ericsson et al. 1996; Guan et al. 1998), die Fettsäuresynthese (Fettsäure-Synthase (FAS), Actyl-CoA-Carboxylase (ACC) und Stearyl-CoA-Desaturase 1 (SCD1)) (Bennett et al. 1995; Lopez et al. 1996; Magana et al. 2000; Tabor et al. 1999), die Triglyzerid- und Phopholipidsynthese (GPAT) (Ericsson et al. 1997) und in unbekannte Funktionen (Acyl-CoA Binding Protein) (Swinnen et al. 1998).

Der ansteigende Spiegel an freiem Cholesterin stimuliert zudem die Aktivität der ACAT, Cholesterinester werden in zytosolischen Lipidtröpfchen gespeichert. Die Mobilisierung erfolgt über eine cAMP-aktivierte neutrale Cholesterinesterhydrolase (NCEH) (Brown et al. 1980; Bernard et al. 1991). Freigesetztes Cholesterin wird wiederum zur Zellmembran transferiert, von wo aus es zum ER transportiert und verestert werden kann. Der hieraus resultierende Zyklus wird durch extrazelluläre Cholesterinakzeptoren wie HDL oder die Eliminierung über Gallensäuren unterbrochen (Bernard et al. 1990). Im Gegensatz zur cholesterinregulierten Aufnahme über das LDL-R-System, wird die Aufnahme von modifizierter LDL, triglyzeridreicher Lipoproteine und ihrer Remnants durch den Scavanger-Rezeptor A, LRP und den VLDL-Rezeptor sowie die phagozytotische Aufnahme durch Makrophagen nicht durch die intrazelluläre Konzentration des Cholesterins reguliert (Krieger & Herz 1994; Brown & Goldstein 1983a).

Die Kontrolle der Genexpression erfolgt über spezielle Transkriptionsfaktoren. Die Promotoren von sterolregulierten Genen enthalten regulatorische Konsensussequenzen, welche als sterolresponsive Elemente (SRE) bezeichnet werden. Spezifische sterolsensitive Transkriptionsfaktoren binden an dieses Element und werden entsprechend SRE-bindende Proteine (SREBP's) bezeichnet (Wang et al. 1994). Bei einem intrazellulären Mangel an Sterolen werden die SREBP-Vorläufer, die in die Membranen des ER eingebettet sind, auseinander geschnitten (Proteolyse). Zunächst geschieht dies durch einen sterolsensitiven, proteolytischen Schritt, der durch die "Site-1 Protease" (S1P) ermöglicht wird (Sakai et al. 1998b). Durch diesen ersten Schnitt, der durch das so genannte "SREBP Cleavage-activating Protein" (SCAP) eingeleitet wird, werden die NH2- und COOH-terminalen Teile des SREBP-Vorläuferproteins voneinander getrennt (Brown & Goldstein 1997; Sakai et al. 1996; Sakai et al. 1998a). Der verbleibende, membrangebundene NH2-terminale Teil wird durch den zweiten, sterolunabhängigen proteolytischen Schritt durch die "Site-2 Protease" (S2P) vollständig von der Membran des ER abgelöst (Sakai et al. 1996; Rawson et al. 1997) und führt zu einer Freisetzung des reifen SREBP. Dieses kann nun in den Zellkern eindringen und an das SRE der Zielgene binden (Sudhof et al. 1987; Smith et al. 1990).

Drei verschiedene Isoformen (SREBP1a, 1c und 2) kontrollieren die Expression von Genen, welche für die Biosynthese von Cholesterin, Fettsäuren, Triglyzeriden und Phospholipiden benötigt werden. SREBP1a wird konstitutiv auf niedrigem Niveau

exprimiert und scheint für eine basale Cholesterin- und Fettsäuresynthese zuständig zu sein. SREBP1c und SREBP2 dagegen werden reguliert, wobei SREBP2 seine Aktivität auf die Regulierung der Cholesterinhomöostase beschränkt und SREBP1 Gene der Lipogenese reguliert (Horton 2002; Horton et al. 2002a; Pai et al. 1998). Weitere cholesterin- oder cholesterinderivatsensitive Transkriptionsfaktoren sind nukleäre Transkriptionsfaktoren wie LXR, der Pregnant-X-Rezeptor (PXR) und der Farnesyl-X-Rezeptor (FXR). Zielgene sind wie oben Gene des Cholesterin- und Fettsäurestoffwechsels (Edwards et al. 2002b; Edwards et al. 2002a).

Oxysterole sind oxygenierte Derivate des Cholesterins. Sie sind Zwischenprodukte der Umwandlung von Cholesterin zu Gallensäure, werden aber auch unabhängig davon hergestellt und können schnell durch Membranen und die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden. Sie spielen eine Rolle in der Regulation der Cholesterinhomöostase der Zelle. In Abbildung 5 sind die prominentesten cholesterinregulierten Transkriptionsfaktoren und ihre Zielgene zusammenfassend abgebildet.



#### Abbildung 5: Regulation von Transkriptionsfaktoren durch Cholesterin

Verschiedene Transkriptionsfaktoren vermitteln den Einfluß von Cholesterin und dessen Derivat Oxysterol auf die Transkription einiger Schlüssselgene des Cholesterin- und Fettsäurestoffwechsel. ABCA1: ATP-binding Casette Transporter A1; ACC: Acyl-CoA-Carboxylase; CETP: Cholesterinester-Transferprotein; Cyp7A1: Cholesterin-7α-Hydroxylase; FAS: Fettsäure-Synthase; FDPS: Farnesyldiphosphat-Synthase; GPAT: Glyzerol-3-Phosphat-Acyltransferase; HMG-CoA-R: 3-Hydroxy-3methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase; HMG-CoA-Synthase: 3-Hydroxy-3 methylglutaryl-Coenzym-A-Synthase; LDL-R: LDL-Rezeptor; LXR: Leber-X-Rezeptor; SCD1: Stearyl-CoA-Desaturase 1; SREBP: sterolresponsives Element-bindendes Protein 1c; SS: Squalen-Synthase

# 1.2 Lysosomale saure Lipase

# 1.2.1 Stoffwechsel lysosomaler Enzyme

Eukaryotische Zellen liefern ein hervorragendes Beispiel dafür, wie effiziente Wiederaufbereitung in der Natur funktioniert. Sie sind in der Lage, die meisten heterogenen Makromoleküle, die in der Zelle und in dem extrazellulären Raum entstehen (z. B. Proteine, komplexe Kohlenhydratverbindungen, Lipide, Nukleinsäuren), in ihre Bausteine zu zerlegen und daraus ohne Qualitätsverlust neue Produkte zu synthetisieren. Die wichtigsten für den intrazellulären Abbau spezialisierten Zellorganellen sind Lysosomen. Lysosomen sind membranumgebene Organellen, in denen eine Vielzahl verschiedener saurer Hydrolasen angereichert ist. Die Funktionen der lysosomalen Membran bestehen in der Aufrechterhaltung eines intralysosomalen sauren Milieus durch ATP-getriebene Protonenpumpen, dem selektiven Transport von Abbauprodukten in das Zytosol durch Transportproteine und dem Schutz zytoplasmatischer Strukturen vor hydrolytischem Abbau.

Lysosomale Enzyme werden als Vorstufenproteine zusammen mit den Plasmamembranproteinen und den sekretorischen Proteinen an den membrangebundenen Ribosomen des rauhen ER gebildet. Diese Proteine enthalten aminoterminal eine hydrophobe Signalsequenz, welche co-translational eine rezeptorvermittelte Aufnahme der Peptidkette in das Innere des rER vermittelt. Während der Synthese werden die lysosomalen Enzyme glykosyliert. Im ER beginnt die Prozessierung dieser Zuckerreste, gleichzeitig wird das Signalpeptid abgespalten. Anschließend findet ein Transport zum Golgi-Netzwerk statt, wo die Proteine nach ihrem Bestimmungsort sortiert werden und weiter posttranslational modifiziert werden. Die meisten Kohlenhydratreste werden durch den Einbau von Mannose-6-Phosphat-Gruppen als Liganden für den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor eingebaut. Über die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren gelangen die Hydrolasen aus dem Golgi in ein saures prälysosomales Kompartiment, in welchem Rezeptor und Ligand dissoziieren. Während der Rezeptor zum Golgi-Apparat zurückkehrt, reifen die Prälysosomen durch Verschmelzung mit Lysosomen und die bislang inaktiven Vorstufenenzyme werden durch limitierte Proteolyse zu reifen Enzymen prozessiert (von Figura & Hasilik 1986). Die biologische Rolle der Vorstufenenzyme könnte zum einem die Regulation der Aktivität bzw. die Konformationsbildung, die Stabilisierung oder Vermittlung von Transportsignalen sein (Kornfeld 1986). Offensichtliche Homologien in der Aminosäuresequenz lysosomaler Enzyme bestehen nicht; die Spezifität der Glykosylierungen lässt jedoch vermuten, dass alle lysosomalen Enzyme eine ähnliche Tertiärstruktur aufweisen (Lang et al. 1986; Baranski et al. 1992).

## 1.2.2 Lipasen

Lipasen (EC 3.1.1.3) sind Hydrolasen, die Triglyzeride an der Grenzfläche zwischen hydrophiler wässriger und hydrophober Lipidphase hydrolysieren (Abbildung 6). Eine Besonderheit von Lipasen ist die Aktivierung der Lipase bei der Anlagerung an die Interphase zwischen wasserunlöslichem Substrat und wässriger Lösung. Der Übergang von katalytisch inaktivem zu aktivem Enzym wird als Grenzflächenaktivierung bezeichnet. Diese Eigenschaft ermöglicht zum einen die Spaltung des nichtwasserlöslichen Substrates Fett und zum anderen ihre Löslichkeit in der wässrigen Phase. Neben dieser typischen Reaktion sind aber auch viele Lipasen in der Lage, andere Esterbindungen zu spalten. Ionen, welche die gebildeten freien Fettsäuren entfernen, z. B. Ca2<sup>+</sup> wirken als Aktivatoren, hohe Konzentrationen an freien Fettsäuren dagegen als Inhibitoren.



Abbildung 6: Reaktionsschema für eine lipasekatalysierte Hydrolyse eines Triglyzerids

Mehr als 50 Lipasen aus den verschiedensten Organismen wurden im Laufe der Jahre isoliert und die entsprechenden Gene identifiziert (Antonian 1988; Holmquist 2000; Wong & Schotz 2002). Die Molekulargewichte der bekannten Lipasen reichen von ca. 20 kDa (*Candida antarctica* Lipase B) bis zu ca. 60 kDa (*Candida rugosa* Lipase). Lipasen unterscheiden sich sowohl in ihrer Größe als auch in ihrer Proteinsequenz signifikant, es wurden jedoch strukturelle Gemeinsamkeiten festgestellt. Vergleiche der dreidimensionalen Strukturen offenbarten ein für Lipasen und Esterasen charakteristisches Faltungsmuster, die so genannten  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung (Ollis et al. 1992). Die  $\alpha/\beta$ -Falttblattstruktur besteht aus acht antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die durch  $\alpha$ -Helices miteinander verbunden sind.

Ein weiteres, in allen Lipasen konserviertes Strukturelement, ist die katalytische Triade. Die katalytische Triade stellt das aktive Zentrum der Lipase dar und besteht aus den drei Aminosäureresten Serin, Histidin und Aspartat bzw. Glutamat (Cygler et al. 1993). Die Aminosäureseguenz um das aktive Serin ist in einem Pentapeptid mit dem Motiv Gly-X-Ser-X-Gly hoch konserviert, wobei X entweder Histidin oder Tyrosin sein kann (Woolley & Petersen, 1994). In wässriger Lösung ist das aktive Zentrum der Lipase von dem so genannten Lid, das aus einer oder zwei  $\alpha$ -Helices besteht, verdeckt und somit für das Substrat nicht zugänglich (Brady et al. 1990; Winkler et al. 1990; Schrag & Cygler 1997). Diese Konformation wird als geschlossene Form bezeichnet. Bei der Aktivierung der Lipase an der Grenzfläche öffnet sich das Lid, wodurch das katalytische Zentrum für das Substrat zugänglich wird; die Lipase liegt dann in der offenen, aktiven Form vor (Brzozowski et al. 1991; Derewenda et al. 1992; Brzozowski et al. 2000). Dabei entsteht das "Oxyanion hole", das durch Wasserstoffbrückenbindungen mit zwei NH-Gruppen die Reaktion stabilisiert. Nur in diesem Zustand ist eine Interaktion zwischen Enzym und Substrat möglich (Roussel et al. 1999).

Die Lipasen höherer Wirbeltiere werden in neutrale und saure Lipasen eingeteilt, die jeweils einer Genfamilie angehören (Kirchgessner et al. 1989; Hide et al. 1992). Zu den neutralen Lipasen gehören die LPL, die HL, die EL und die pankreatische Lipase. Über den Verwandtschaftsgrad der Primärsequenzen innerhalb der sauren Lipasen lässt sich ein Dendrogramm erstellen (Abbildung 7 A). Hieraus wird ersichtlich, dass die LAL weniger Ähnlichkeit mit den übrigen sauren Lipasen hat als diese untereinander. Die Identität der Proteine bzw. der Nukleotidsequenz der cDNA liegt zwischen 55 und 80 % (Abbildung 7 B).



Β.

Ident (%)	hLAL	mLAL	rLAL	hGL	rLL	bPE
Protein	100	75	73,9	59,4	58,6	54,7
DNA	100	79,4	75,5	59,8	59,2	58,3

#### Abbildung 7: Genfamilie der sauren Lipasen

A. Dendrogramm der Genfamilie der sauren Lipasen. Zur Herstellung des Dendrogramms wurde ein Protfam tool verwendet (http://www.mips.biochem.mpg.de/htbin/qfam.com/fs=0504.0). rLL: linguale Lipase der Ratte; dGL: gastrische Lipase des Hundes; hGL: humane gastrische Lipase; sPGL: prägastrische Lipase des Schafes; bPE: bovine prägastrische Esterase; rLAL: lysosomale saure Lipase der Ratte; mLAL: lysosomale saure Lipase der Maus; hLAL: humane lysosomale saure Lipase. B. Homologien der sauren Lipasen: zugrunde gelegt wurden für den Proteinvergleich die Polypeptidsequenzen, für den DNA-Vergleich die längsten überlappenden cDNA-Sequenzen.

# 1.2.3 Funktion und Molekularbiologie der lysosomalen sauren Lipase

Die LAL (EC 3.1.1.13) ist ein zentrales Enzym des intrazellulären Lipidstoffwechsels. Sie hydrolisiert alle über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommenen Cholesterinester und Triglyzeride im sauren Milieu des Lysosoms. Hierbei werden freie Fettsäuren und freies Cholesterin freigesetzt, welche ins Zytoplasma transportiert werden und dort der Zelle zur weiteren Verwendung zur Verfügung stehen. Sie spielt damit eine Rolle in der zellulären Prozessierung von Plasmalipoproteinen und trägt zur homöostatischen Kontrolle der Lipidspiegel in Plasma und Zelle bei (Shio et al. 1979; Brown et al. 1981; Takano et al. 1974). Eine Relevanz für die Entstehung von atherosklerotischen Vorgängen scheint gegeben. Patienten mit vorzeitiger Atherosklerose haben eine erniedrigte LAL-Aktivität in mononukleären Zellen im Vergleich zu gesunden Patienten (Hagemenas et al. 1984; Coates et al. 1986). Dies trifft auch auf Zellen von Diabetikern zu, die anfällig für atherosklerotische Veränderungen sind (Henze & Chait 1981; Yatsu et al. 1980). Zudem haben Tierspezies mit geringerer Anfälligkeit für Atherosklerose wie Ratte und Hund eine deutlich geringere LAL-Aktivität als Tiere mit hoher Empfindlichkeit wie Kaninchen oder Schwein (de Duve 1974; Michowitz et al. 1977; Bonner et al. 1972). Ein weiterer Hinweis auf eine diesbezügliche Bedeutung der LAL ist das Auftreten vorzeitiger Atherosklerose bei CESD-Patienten.

Die Aktivität der LAL scheint über die Verfügbarkeit des Substrates reguliert zu werden, bei Induktion der LDL-Aufnahme (z. B. durch T3 und Insulingabe bzw. einer cholesterinreichen Diät) steigt die LAL-Aktivität um das zwei- bis dreifache (Brecher et al. 1977; Haley et al. 1980). Gleichzeitig scheint eine Produkthemmung vorzuliegen, in cholesterinüberladenen Schaumzellen ist die Aktivität der LAL verringert. Der endogene Promotor der humanen LAL wurde von Ries et al. in Monozyten charakterisiert (Ries et al. 1998). Er enthält keine klassische TATA-Box und ist GC-reich. Die Transkriptionsfaktoren Sp1 und AP-2 binden an eine 182 bp lange Sequenz und induzieren eine Steigerung der LAL-Expression während der Differenzierung vom Monozyt zum Makrophagen. Allerdings wird im Zuge der Differenzierung die Expression aller lysosomalen Enzyme induziert, da eine Vergrößerung des Kompartiments Lysosom zur Aufnahme der phagozytierten Materie stattfindet (Gabig & Babior 1981).

Von den Erythrozyten abgesehen, wird die LAL vermutlich in allen Körperzellen synthetisiert (Fowler & Brown 1984). Die LAL wurde aus humaner Leber (Warner et al. 1981), Rattenleber (Brown & Sgoutas 1980), Kaninchenleber (Imanaka et al. 1984), humaner Plazenta (Burton & Mueller 1980), Lunge (Brooks & Weinhold 1986) sowie aus dem Kulturmedium von Fibroblasten (Sando & Rosenbaum 1985) isoliert. Ausreichende Mengen für die Bestimmung der Peptidsequenz und eine Klonierung der cDNA des Enzyms wurden 1991 gewonnen (Anderson & Sando 1991). Anderson und Sando klärten die Aminosäuresequenz der LAL ausgehend von einer 2,6 kb großen cDNA auf und stellten eine 59 % Identität zur humanen gastrischen Lipase fest, welche in dem preduodenalen Abbau von Nahrungstriglyzeriden involviert ist.

Die LAL besteht aus 327 Aminosäuren inklusive einer Signalsequenz von 27 Aminosäuren an ihrem N-terminalen Ende, welche für den Transport des Enzyms vom Ribosomen zum rER sorgt. Das errechnete Molekulargewicht liegt bei 42,4 kDa. Bei der Reinigung der humanen LAL aus Lebergewebe wurde ein Molekulargewicht von 56 kDa in der SDS-PAGE registriert. Die Differenz wird auf die ausgeprägte N- Glykosylierung der Lipase zurückgeführt (Ameis et al 1994). Sie weist außerdem ein vermutetes Propeptid mit 49 Aminosäuren auf. Dies erklärt möglicherweise, dass nach einer Aufreinigung aus humaner Leber zwei aktive Formen der LAL von 56 kDa und 41 kDa erhalten werden (Ameis et al. 1994).

Die genomische Lokalisierung auf dem 10. Chromosom (10q23.2-q.23.3) der humanen LAL wurde von Anderson et al. (1993) beschrieben; Aslanidis et al. (1994) fassten 1994 die 10-Exon Struktur des Gens zusammen, welche über 45 kb verteilt ist (Aslanidis et al. 1994; Anderson & Sando 1991).

# 1.2.4 Wolman'sche Krankheit und Cholesterinester-Speicherkrankheit

Die lysosomalen Speicherkrankheiten stellen eine Gruppe von über 40 verschiedenen genetischen Erkrankungen dar, von denen jede einzelne das Ergebnis eines spezifischen lysosomalen Funktionsdefektes ist. Im Allgemeinen liegt ein autosomalrezessiver Erbgang vor. Diese Defekte führen in den Lysosomen zu einer Anhäufung von Substanzen, die normalerweise im Stoffwechsel abgebaut werden. Lysosomale Speicherkrankheiten werden nach der Art des Speichermaterials unterschieden (z. B. Lipid-Speicherkrankheiten, (Lipidosen) oder Zucker-Speicherkrankheiten (Mukopolysaccharidosen, Glykoproteinosen)). Die WD und die CESD gehören zur Familie der Lipidosen, die durch eine intrazelluläre Speicherung von Lipiden bedingt sind. Der Mangel an LAL führt zu einer intralysosomalen Akkumulation von neutralen Lipiden (Cholesterinester und Triglyzeride) in den meisten Geweben des Körpers. In Abbildung 8 sind schematisch eine normale und eine LAL-defiziente Zelle abgebildet. Die Wolman'sche Krankheit tritt beim Neugeborenen auf, Leitsymptome sind im frühen Lebensalter auftretendes Erbrechen, eine Hepatosplenomegalie und eine Steatorrhoe, abdominale Distension und andere gastrointestinale Symptome, welche zu Malabsorption und Malnutrition führen. Adrenale Kalzifizierung und Gedeihstörungen treten schon in den ersten Wochen auf. In der Regel liegt keine Beteiligung des zentralen Nervensystems vor, die neurologische Entwicklung ist jedoch gestört. Betroffene Kinder versterben in der Regel in den ersten 14 Lebensmonaten.

# A. Normale Zelle

#### B. LAL-defiziente Zelle (Wolman/CESD)



Abbildung 8: Schematische Darstellung einer normalen und einer LAL-defizienten Zelle

Lipoproteine gelangen über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle. Es folgt ein vesikulärer Transport zum Lysosom, wo eine Hydrolyse der neutralen Fette (Triglyzeride (TG) und Cholesterinester (CE)) stattfindet. Die freien Fettsäuren (FA) und das freie Cholesterin (FC) werden aus dem Lysosom transportiert und stehen der Zelle für den weiteren Stoffwechsel zur Verfügung. Überschüssige Lipide werden in Lipidtröpfchen eingespeichert, eine Mobilisierung erfolgt bei Bedarf (A). In einer LAL-defizienten Zelle findet in den Lysosomen keine Hydrolyse der Lipide statt, die somit dieses Kompartiment nicht verlassen können. Es bilden sich so genannte Lipopolysomen, aus denen keine Lipide mobilisiert werden können. Um ihren Bedarf an Lipiden zu decken, nimmt die Zelle weiterhin verstärkt Lipoproteine auf (B).

Morphologisch ist die Erkrankung durch eine massive Speicherung von Cholesterinestern und Triglyzeriden in allen Organen und Geweben gekennzeichnet. Die Gewebeverteilung der Lipideinspeicherung ist parallel zur LDL-Aufnahme (Faust et al. 1977; Goldstein et al. 1975; Brown et al. 1979; Brown & Goldstein 1983b) und erklärt die Kalzifizierung der Nebennieren sowie die Betroffenheit der Makrophagen. In der Leber findet sie sowohl in den Hepatozyten in stabiler Form als auch in den Kupferzellen statt, wo die Lipide durch Peroxidation und Polymerisation unlösliche Ceroide bilden (Lowden et al. 1970; Künnert et al. 1979). Die Konzentration von Cholesterin und Triglyzeriden im Plasma ist gewöhnlich normal (Assmann & Seedorf 2002). In der Literatur sind mittlerweile mehr als 50 Fälle beschrieben und z. T. molekularbiologisch untersucht. Es wurden sowohl Missense-, Nonsense-, Insertions sowie Deletionsmutanten gefunden (Mayatepek et al. 1999; Anderson et al. 1994; Anderson et al. 1999; Zschenker et al. 2001).

CESD verläuft gutartiger und wird meist erst im Erwachsenenalter detektiert. Lipidablagerungen finden im ganzen Körper statt, meist fällt zunächst eine Hepatomegalie, welche seit der Kindheit besteht, klinisch auf. CESD ist mit hepatischer Fibrose und frühzeitiger Atherosklerose assoziiert. Weitere Komplikationen können Leberversagen und abdominale Schmerzen sein. Es treten keine Gallensteine, keine Malabsorption oder -nutrition, keine Kalzifizierung der Nebennieren sowie selten neurologische Veränderungen auf. Gewöhnlich liegt eine leichte Hyperbetalipoproteinemia vor. Während Wolman-Patienten keine Aktivität der LAL haben, weisen CESD-Patienten eine Restaktivität bis 5 % auf. Inzwischen sind etwa 70 Fälle molekular untersucht. Wie bei Wolman-Patienten fanden sich verschiedene Mutationen im Gen der LAL (Ameis et al. 1995; Pagani et al. 1996; Redonnet-Vernhet et al. 1998; Du et al. 1998b). Die analysierten Mutationen lassen bisher keine Schlussfolgerung über die molekulare Grundlage des Unterschieds zwischen der Wolman´schen Krankheit und der Cholesterinester-Speicherkrankheit zu, eine Restaktivität der LAL in Zellen von CESD-Patienten wird als biochemischer Unterschied diskutiert (Aslanidis et al. 1996). Die wichtigsten klinischen und biochemischen Merkmale beider Erkrankungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Therapie besteht zur Zeit in der Gabe von HMGCoA-Reduktase-Hemmern, um die endogene Cholesterinsynthese zurückzuhalten sowie in der Einnahme von Cholestyramin, einem Anionenaustauscher, der Gallensäuren bindet (Gasche et al. 1997; Rassoul et al. 2001; Yokoyama & McCoy 1992; McCoy & Yokoyama 1991). Dies wird kombiniert mit einer triglyzerid- und cholesterinarmen Diät. Wolman-Patienten werden zur Zeit außerdem mit einer Knochenmarktransplantation therapiert (Krivit et al. 1992), ein Patient erreichte so das Alter von fünf Jahren (Krivit et al. 2000).

	Wolman'sche Krankheit	Cholesterinester-		
		Speicherkrankheit		
Symptomatik	Erbrechen, Gedeihstörung, massive	Hypercholesterinämie, asymp- toma-		
	Hepatomegalie	tische Hepatomegalie		
Verdachtsdiagnose	beidseits verkalkte Nebennieren	Hepatomegalie, Hypercholesterinä-		
		mie		
Diagnosezeitpunkt	Säuglingsalter	Jugend, Adoleszenz		
Enyzmaktivität	in allen Zellen < 5 %	Fibroblasten 1-10, Leber bis 30 %		
Speichermaterial	Cholesterinester, Triglyzeride	Cholesterinester		
Organverteilung	Leber, Nebenniere, Darm, andere	Leber, geringfügig Darm		
Vererbung	autosomal-rezessiv	autosomal-rezessiv		
Prognose	Tod nach 6-14 Monaten	Vorzeitige Atherosklerose		
		bei Therapie gut		

Tabelle 1: Vergleich von klinischen und biochemischen Merkmalen der Wolman'schen Krankheit und der Cholesterinester-Speicherkrankheit

## 1.2.5 Tiermodelle der Defizienz der lysosomalen sauren Lipase

Yoshida and Kuriyama beschrieben 1990 einen Stamm von Donryo-Ratten mit einigen Symptomen der Wolman'schen Krankheit. Als Ursache wurde eine autosomalrezessiv vererbte partielle Defizienz der LAL, verursacht durch eine C-terminale Deletion von 29 Aminosäuren, festgestellt (Nakagawa et al. 1995). Pathologische Eigenschaften dieser Ratten waren neben einer Hepatosplenomegalie und Infertilität, eine Vergrößerung der Lymphknoten, eine Hypertrophie des Dünndarms sowie progressive Entwicklungsstörungen bis zum frühzeitigen Tod durch Kachexie. Histologische Untersuchungen zeigten eine starke Vakuolisierung der Leber durch Akkumulation von Triglyzeriden und Cholesterinestern in der Leber sowie von Cholesterinestern in der Milz. Es fanden bis zum Tod der Tiere im Alter von 120 Tagen weder eine adrenale Kalzifizierung, noch atheromatöse Veränderungen der Gefäßwand statt. Der Phänotyp ist intermediär zur humanen WD und CESD, der gutartige Verlauf ist erklärbar durch eine Restaktivität der LAL zwischen 8 und 10 % in Leber und Milz (Kuriwaki & Yoshida 1999; Kuriyama et al. 1990; Yoshida & Kuriyama 1990).

Du et al. etablierten 1998 ein Mausmodell der Defizienz der LAL durch gezielten Austausch (homologe Rekombination) des murinen Genes gegen eine Nullmutation. Die Homozygote "Knock-out"-Mäuse produzierten weder mRNA oder Protein noch konnte eine lipolytische Aktivität im sauren Milieu gemessen werden. Die LALdefizienten Mäuse hatten einen normalen Phänotyp bei der Geburt, eine normale Entwicklung zur erwachsenen Maus, waren fertil und in der Lage, Nachkommen zu produzieren. Allerdings entwickelte sich in den Tieren eine massive Speicherung an Triglyzeriden und Cholesterinestern in Leber, Nebennieren sowie Dünndarm. Die Tiere verstarben im Alter von sechs bis acht Monaten und verloren bis dahin das weiße und braune Fettgewebe. Die Einspeicherung an Lipiden in der Leber erfolgte zunächst in den Hepatozyten und verschob sich im Laufe der Monate zugunsten der Kupfferzellen. Die Tiere entwickelten zudem eine Insulinresistenz nach Glukosegabe und einen erhöhten Spiegel der freien Fettsäuren im Plasma. Dieses Tiermodell ist ein phänotypisches Modell der humanen CESD und ein biochemisches und histologisches der WD (Du et al. 1998a; Du et al. 2001a).

Die Arbeitsgruppe um Du konnte in diesem Tiermodell therapeutische Ansätze zur Korrektur der Enzymdefizienz testen. Sie verfolgten einen konservativen Ansatz der Enzymsubstitution durch regelmäßige Injektion von rekombinanthergestellter LAL in die Schwanzvene (Du et al. 2001b). Die Aufnahme aus der Blutversorgung erfolgte

Einleitung

über den plasmamembranständigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Sando & Henke 1982; Sando et al. 1990; Neufeld et al. 1977). Es wurde zudem ein gentherapeutischer Ansatz durch eine einmalige Injektion eines LAL-transduzierenden Adenovirus verfolgt. In diesen Mäusen wurde die LAL transient *in vivo* substituiert (Du et al. 2002). In beiden Ansätzen fand eine massive Entspeicherung in Hepatozyten und Makrophagen statt, so dass eine Therapie der humanen WD und CESD zumindest durch Substitution mit rekombinantem Enzym möglich scheint, wie sie für andere Iysosomale Speicherkrankheiten schon erfolgreich praktiziert wird (Desnick & Schuchman 2002; Desnick 2001).

# 1.3 Transgene Mausmodelle

Höhere Lebewesen zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus einer Vielzahl verschiedenster Zelltypen bestehen, alle mit definierten unterschiedlichen Funktionen, welche miteinander interagieren, sich gegenseitig beeinflussen und kontrollieren. Will man die molekularen Hintergründe der Regulation und Funktion von einzelnen Genen eines Organismus und deren Versagen in pathologischen Vorgängen verstehen, so ist man darauf angewiesen, eine Fragestellung im Kontext des gesamten Lebewesens anzugehen. Die transgene Technologie bietet die Möglichkeit dazu und hat neue Aspekte in den Bereich der Grundlagenforschung, der Medizin und der Pharmakologie gebracht (Ge 1999; Muller 1999; Craigen 2001). Die transgenen Tiermodelle bieten den Vorteil, dass sich der induzierte Phänotyp weitervererbt und sich dadurch nicht nur in einem Individuum in verschiedensten Altersstufen, sondern auch über Generationen in beliebig vielen verschiedenen Individuen verfolgen lässt.

Genetische Veränderungen bei Mäusen können durch eine ungerichtete oder gerichtete Integration exogener DNA (Transgen) in das Genom erzeugt werden. Es können zielgerichtet Mutationen in einem spezifischen Gen generiert werden, die je nach Mutationtyp als Knock-out (Funktionsverlust des Gens) oder Knock-in (Funktionsgewinn/-veränderung des Gens) bezeichnet werden. Hierzu wird das Genom embryonaler Stammzellen *in vitro* durch homologe Rekombination verändert. Anschließend werden diese Stammzellen in Blastozysten injiziert, die nach Reimplantation in scheinträchtige Weibchen chimäre Mäuse hervorbringen. Wenn auch die Keimzellen der chimären Mäuse das veränderte Gen tragen, wird es heterozygot an die Folgegeneration weitergegeben. Homozygote Knock-out-Mäuse, in denen beide Allele des Zielgens verändert sind, werden durch Kreuzung heterozygoter Mäuse generiert. Die Analyse des Phänotyps (z. B. der Fehlfunktionen) von genmanipulierten Mäusen ermöglichen Rückschlüsse auf die normale Funktion des ausgeschalteten/veränderten Gens. Man verfügt heute über Knock-out-Modelle einer großen Anzahl von monogenetischen Krankheiten u. a. der Duchenne Muskeldystrophie (Dystrophin-Gen auf X-Chromosom), der cystische Fibrose (epithelialen Cl-Kanal), Morbus Gaucher (Glukocerebrosidase-Gen), des Lesh-Nyhan Syndroms (X-Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen) chromosomales und der WD/CESD (LAL-Gens). Durch diese Modelle lassen sich kausale Zusammenhänge von Gendefekt und Krankheitsbild direkt nachweisen und es können therapeutische Ansätze zur Behebung des Gendefektes untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wird eine transgenüberexprimierende Mauslinie analysiert. Solche transgenen Mäuse werden durch Vorkerninjektion von linearen DNA-Konstrukten in befruchtete Eizellen erzeugt, die aus dem Eileiter einer seit wenigen Stunden schwangeren Maus isoliert werden. Die injizierte DNA enthält zum einen die kodierende Sequenz des Transgens sowie die zur Expression notwendigen regulatorischen Elemente, die endogen oder exogen sein können. Das transgentragende DNA-Fragment wird mit einer Glaskapillare in den Vorkern befruchteter Eizellen injiziert. Das Transgen integriert zufällig und ungerichtet an einer Stelle im Genom, meist mit mehreren Kopien. 75 % der Embryonen überleben diese Prozedur und werden scheinschwangeren Ammentieren eingesetzt, welche man erhält, wenn man Weibchen mit sterilisierten Männchen verpaart. Nach einer Tragezeit von 20 Tagen werden die Nachkommen geboren, von denen bis zu 30 % das Transgen in ihrem Genom integriert haben. In jedem transgenpositiven Tier hat mindestens eine unabhängige Integration stattgefunden, jedes dieser Tiere ist jedoch genetisch unterschiedlich und damit Gründer (Founder) einer neuen Mauslinie.

Durch die gezielte Überfunktion spezifischer Gene können ebenfalls Phänotypen induziert werden, welche menschlichen Krankheiten sehr ähnlich sind. In diese Rubrik gehören die Modelle für Bluthochdruck (Angiotensin-, Renin-Gene), diverse Krebsarten (Onkogene), AIDS (HIV-Genom oder Teile davon), Alzheimer Krankheit (Amyloid-Gen), Osteopetrose (c-fos Gen) oder Typ-1 Diabetes (Influenza-Haemagglutinin-Gen).

# 1.4 Ziel der Arbeit

Die LAL spielt eine zentrale Rolle im Katabolismus von Lipiden. Sie katalysiert die lysosomale Hydrolyse der von der Zelle durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommenen Cholesterinester und Triglyzeride und setzt hierbei Cholesterin und Fettsäuren frei.

In dieser Promotionsarbeit sollte die physiologische Bedeutung der LAL durch Überexpression des Enzyms in transgenen Mäusen untersucht werden. Hierzu sollte zunächst die cDNA der LAL hinter den Teil des Apolipoproteine A-I-Promotors kloniert werden, der für eine leberspezifische Expression verantwortlich ist. Der resultierende Vektor sollte in Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Breslow zur Generierung einer Mauslinie durch Mikroinjektion verwendet werden. Durch Integration des Transgens sollte ein Mausmodell entstehen, welche die LAL leberspezifisch überexprimiert. Die genomische Integration der LAL sollte durch PCR nachgewiesen werden. Nach Züchtung durch Rückkreuzung der transgenen Tiere mit C57BI/6J Mäusen sollte eine homozygot transgene Mauslinie etabliert werden. Die Funktionalität der Integration des Transgens sollte durch Messung der Transkription des Transgens (Echtzeit-PCR) sowie der Aktivität der LAL überprüft werden.

Der Schwerpunkt der Arbeit sollte dann in der Analyse der Lipide im Plasma und in der Leber sowie in der Analyse einiger am Lipidstoffwechsel beteiligter Proteine liegen. Hierfür sollte eine normale Haltungsdiät sowie eine fett- und cholesterinreiche Diät eingesetzt werden. Mittels enzymatischen bzw. chromatographischen Bestimmungen von Lipiden sowie Analysen der Expression einiger Gene des Lipoproteinund Fettsäurestoffwechsels in der SDS-PAGE mit anschließender Westernbloanalyse sollten die Mäuse charakterisiert werden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit im Vergleich zu den bisher bekannten Modellen der Defizienz der LAL könnten sich weitere Erkenntnisse zur Bedeutung der LAL ergeben. Im Besonderen soll die physiologische Relevanz der LAL-Aktivität im Rahmen einer westlichen Diät, wie sie in industrialisierten Ländern weit verbreitet ist, diskutiert werden.

# 2 Material und Methoden

# 2.1 Material

# 2.1.1 Geräte

- Blottingkammer und Zubehör (Biorad)
- DNA-Sequenzer (Perkin Elmer)
- Elektrophoresekammer Desaphor VA, Glasplatten und Zubehör (Desaga)
- Elektrophoresekammer f
  ür Minigele und Zubeh
  ör (BioRad)
- Elisareader MRX (Dynatech)
- Fluorometer FluoroCount (Packard)
- FPLC-Anlage für Gelfiltration (Pharmacia)
- Gaschromatograph Hewlett Packard 5890 Series II (Palo Alto, USA) mit Säule HP-5MS, 30 m Länge, 0,25 mm innerer Durchmesser, 0,25 µm Filmdicke, Flammenionisations-Detektor und verarbeitende Software
- Glashomogenisator (Potter)
- Kryotom Cryo-Star HM 560M (Microm International)
- Laborzentrifuge Minifuge T (Heraeus)
- Lichtmikroskop Labovert FS
- LightCycler (Roche), verarbeitende Software (Roche)
- Mikroskop Axiovert 100 mit Fluoreszenzeinrichtung, Objektiv Ph3 Plan-Apochromat 63x/1,40, Kamera Axio Cam und Software Axio Vision Viewer (Zeiss)
- pH-Meter (Mettler Toledo)
- Powersupply (LKB, Biorad)
- Rollenmischgerät RM5 (Assistent Deutschland)
- Sonifier 450 (Branson)
- Spektralphotometer 150-20 (Hitachi), SmartSpec 3000 (BioRad)
- Szintillationszähler Betacounter (Packard)
- T3Thermocycler (Biometra)
- Thermomixer compact (Eppendorf)
- Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus), 1-15K (Sigma)
- Ultratischzentrifuge (Beckman) mit Festwinkelrotor TLA-100.2
- Ultraturrax T25 (Jahnke & Kunkel)

- Untertischzentrifuge (Heraeus)
- Zellkultur: Werkbank (BDK), Brutschrank (Heraeus) und Wasserbad (GFL)

# 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Von der Aufzählung ausgenommen sind Verbrauchsmaterialien, die zur Standardausrüstung eines Labors gehören wie z. B. Glaswaren, Reaktionsgefäße und Petrischalen.

- Alle Plastikwaren f
  ür die Zellkultur von Nunc oder Falcon
- Blotmembran aus Nitrocellulose Porengröße 0,45 µm (Portran)
- Gelblotting-Papier (Schleicher & Schuell)
- Hämatokritkapillare
- Kapillaren f
  ür den Light Cycler (Amersham)
- Multiwellplatten (Packard) und Einmalküvetten (Brand)
- Objektträger und Präparationsbesteck (Roth)
- Photokassette (rego)
- Röntgenfilme Scientific Imaging Film Biomax MR (Kodak)
- Sterilfilter 0,45 μm und 0,2 μm (Schleicher & Schuell)
- Superose®6 HR 10/30 (Pharmacia LKB Biotech)
- Zentrifugenröhrchen Polyallomer 14 x 89 mm (Beckmann)

# 2.1.3 Chemikalien, Proteine und Enzyme

Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien, Enzyme und Proteine wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), oder Sigma Chemie (Steinheim) in analytischer (p. A.) bzw. in HPLC-Reinheit bezogen.

radioaktives Triolein, radioaktives Cholesterylolein, Rainbow-Marker RPN 756 und 800 (alles Amersham Pharmacia); steriles H<sub>2</sub>O, Histoacryl Gewebekleber (beides Braun); Fettrotlösung (Chroma-Gesellschaft); Proteinase K (Fluka); alkalische Posphatase, DNase, Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV-RT), RNase Inhibitor, Taq DNA Polymerase, TriZol, (alles Gibco); Albumin-Standardlösung (Pierce); Disdesoxynukleotide, FuGene 6 Reagenz, Klenow-Fragment DNA Polymerase, Molekulargewichtsstandard III und VI, Precipath, Precinorm, Restriktionsendonukleasen (alles Roche); Pfu DNA Polymerase (Stratagene); rekombinante LAL aus Insektenzellen (von Dr. Zschenker, UKE, Hamburg)

# 2.1.4 Kits

- Amplex<sup>™</sup> Red Cholesterin Assay Kit (Molecular Probes)
- Enzymatischer Farbtest f
  ür Cholesterin nach CHOD-PAP (Roche)
- Enzymatischer Farbtest f
  ür freies Cholesterin (Wako)
- Enzymatischer Farbtest f
  ür Phospholipide (Roche)
- Enzymatischer Farbtest f
  ür Triglyzeride nach GPO-PAP (Roche)
- Prism Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- Proteinassay (Biorad)
- QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)
- QIAGEN Plasmid Mini und Maxi Kit (Qiagen)
- SYBR® Green PCR Master Mix (Roche)

# 2.1.5 Primer

Oligonukleotide zur DNA-Amplifikation und Sequenzierung wurden von der Firma Invitogen/Gibco oder von der Arbeitsgruppe Richter (UKE; Hamburg) bezogen.

18S F:	5′-TGA AGA CGA TCA GAT ACC GTC G-3′			
18S R:	5'-CGT GCA GCC CCG GAC ATC TAA GG-3'			
ApoAl F:	5'-GTC GAC CCC GGG AGA CCT GCA AGC-3'			
ApoAl MF:	5'-GAC ATA AAT AGG CCC TGC AAG AG-3'			
ApoAl R:	5'-AAG CTT CCT TGA ACC TTG AGC TGG GGA-3'			
hLAL R2:	5'-TGG CCA TAG GGC TAG TAC AG-3'			
hLAL RS1:	5'-GAA TGC AGG GTC CAG AGA AC-3			
hLAL RS3:	5'-AGT TAA TGG AAG CAG GTA GGT CAT AT-3'			
mhLAL F:	5′-TGA TGA GAT GGC AAA ATA TGA-3′			
mLAL R1:	5'-GAA GTA GCG GGC CTG AAG CA-3'			
PBDG F:	5'-CAA GGT TTT TCA GCA TCG CTA CCA-3'			
PBDG R:	5'-ATG TCC CGG TAA CGG CGG C-3'			
T7:	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'			
Pandom Primer (Hevamere, Cibco)				

Random Primer (Hexamere, Gibco)
# 2.1.6 Antikörper

Antikörper	Spezies	Тур	Hersteller	Verdünnungen
anti ACO	Kaninchen	polyklonal	Stefan Alexsson,	1:2000
			Finnland	
anti Apo A-I	Maus	monoklonal	Biodesign	1:1000
			international	
anti Apo B	Kaninchen	polyklonal	Calbiochem	1:1000
anti Apo E	Kaninchen	polyklonal	DAKO	1:2000
anti β-Galaktosidase	Kaninchen	polyklonal	Sigma	1:500
anti Cathepsin D	Kaninchen	polyklonal	Thomas Braulke,	1:2000
			UKE, Hamburg	
anti FAS	Maus	monoklonal	BD Transduction	1:8000
			Laboratories	
anti LAL (?)	Kaninchen	polyklonal	Biotrend	siehe Angaben im
				Text
anti LDL-R	Huhn	polyklonal	Progen	1:250
		lgY		
anti LRP (377/4)	Kaninchen	polyklonal	Joachim Herz,	1:10000
			USA	
anti RAP	Kaninchen	polyklonal	Jørgen Gliemann,	1:2500
			Dänemark	
anti SR-BI	Kaninchen	polyklonal	Jean-Charles	1:30000
			Fruchard, Frank-	
			reich	
anti SREBP1	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz Bio-	1 :500
			technology	
anti Maus PO	Ziege	lgG	Jackson	1:2500
anti Huhn PO	Kaninchen	lgY	Jackson	1:2500
anti Kaninchen PO	Ziege	lgG	Jackson	1:2500
anti Kaninchen Cy2	Ziege	lgG	Jackson	1:250

Tabelle 2: verwendete Antikörper

# 2.1.7 Adenoviren, Bakterienstämme, Mäuse, Plasmide, und Zelllinien

Adenoviren (von Prof. Dr. Ameis, UKE, Hamburg, zur Verfügung gestellt)

Ad-CMV-hLAL

 $\mathsf{Ad}\text{-}\mathsf{CMV}\text{-}\beta\mathsf{GAL}$ 

BakterienE.coli Stamm DH-5alpha, kompetente Zellen (Stratagene)MäuseC57BI/J6 (Tierhaltung, UKE, Hamburg)C57BI/6J-TgN(ApoAI-hLAL)21SHC57BI/6J-TgN(ApoAI-hLAL)24SHbeide Linien in den USA generiert, dann Tierhaltung UKE, HamburgPlasmidepcDNA3-CMV-hLAL (von Prof. Dr. Ameis, UKE, Hamburg)pcDNA3-CMV-ApoAI-hLALpcDNA3-CMV-ApoAI-hLALpcDNA3-CMV-ApoAI-hLALpcDNA3-CMV-ApoAI-hLALpcDNA1-ApoAI-LpL (von Dr. Merkel, UKE, Hamburg)ZelllinienHuH7: humane Hepatomazellen, UKE, HamburgMEF: murine embryonale Fibroblasten, UKE, Hamburg

# 2.1.8 Zellkulturmedien

Dulbeccos modified eagle medium (DMEM mit 1 mmol/L L-Glutamin) (Gibco); FBS (Gibco); Penicillin/Streptomycin (Gibco), Trypsin-EDTA (Gibco), LPDS (lipoproteinde-fizientes Serum, Abteilung Molekulare Zellbiologie)

# 2.2 Methoden

# 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die folgende Klonierung des Plasmids zur Generierung von transgenen Mäusen wurde nach Standardmethoden nach "Molecular Cloning" (Sambrook et al. 1989) und "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel et al. 1994) durchgeführt:

# 2.2.1.1 Standardmethoden

# 2.2.1.1.1 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

## <u>Puffer</u>

- 3 M Natriumacetat
- Ethanol
- TE-Puffer (90 mM Tris-HCl, pH 8; 20 mM EDTA)

# <u>Methode</u>

In TE oder H<sub>2</sub>O gelöste Nukleinsäure wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt, gemischt, mindestens 20 min bei –20 °C inkubiert und 15 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur (RT) in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Sediment mit 70% igem Ethanol gewaschen und ca. 5 min bei RT oder bei 37 °C getrocknet. Abschließend wurde das Sediment in TE aufgenommen.

# 2.2.1.1.2 Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholextraktion

# <u>Puffer</u>

• PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1)

# <u>Methode</u>

Mit PCI wurden Proteine aus Nukleinsäurelösungen extrahiert. Nukleinsäurelösungen wurden mit einem Volumen PCI versetzt und gevortext, bis sich eine einheitliche Emulsion bildete. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch 5 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Proteine wurden unter dem Einfluss des Phenols denaturiert und befanden sich nach der Zentrifugation in der Interphase. Isoamylalkohol bewirkte eine bessere Phasentrennung. Die DNA in der oberen, wässrigen Phase wurde ohne Kontamination durch die Interphase abgenommen.

# 2.2.1.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 1/50- bis 1/200-Verdünnungen in  $H_2O$  hergestellt und in Quarzküvetten bei 260 nm gegen  $H_2O$  gemessen. Die Konzentration errechnete sich wie folgt (Verd. = Verdünnungsfaktor):

C doppelsträngige DNA	= OD260 x 50 / Verd g/ml
C einzelsträngige DNA oder RNA	= OD260 x 40 / Verd g/ml
C Oligonukleotide	= OD260 x 33 / Verd g/ml

Die Verunreinigung mit Proteinen wurde durch Messung der OD bei 280 nm erfasst. Die Relation OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> sollte optimal bei 1,8 bis 2,0 liegen.

# 2.2.1.1.4 Agarosegelelektrophorese

# <u>Puffer</u>

- 1%iges Agarosegel (1 % Agarose (w/v) in TBE, 50 ng/ml Ethidiumbromid)
- Ethidiumbromid
- Probenpuffer (180 mM Tris-HCl, pH 8, 180 mM Borsäure, 40 mM EDTA, 10 % Glyzerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau)
- TBE (90 mM Tris-HCl, pH 8; 90 mM Borsäure; 20 mM EDTA)

## Methode (Aaij & Borst 1972)

Nukleinsäuren sind negativ geladen; die Laufstrecke im Agarosegel stellt sich als logarithmische Funktion ihres Molekulargewichts dar. Agarosegele erlauben eine Auftrennung von DNA-Fragmenten einer Länge von 70 bp bis zu einer Größe von 50 kbp, wobei die Auflösung je nach Agarosekonzentration etwa 0,5 % der Fragmentgröße betragen kann. Die Elektrophorese erfolgt in waagerechten Kammern mit TBE als Laufpuffer. Zum Nachweis der DNA wurde der Gelmatrix Ethidiumbromid zugegeben. Es interkaliert in die Doppelhelix der DNA und macht sie durch Fluoreszenz bei Anregung durch UV-Licht sichtbar.

1/10 der PCR-Produkte wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt, auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 80 V aufgetrennt. Die DNA wurde bei 280 nm detektiert. Die Reinigung und Isolierung von DNA aus einem Agarosegel wurde mit Hilfe des Gel Extraktions Kits (Qiaex, Qiagen) durchgeführt.

# 2.2.1.2 Klonierung des Plasmids pcDNA3-CMV-ApoAl-hLAL

## <u>Puffer</u>

- alkalischen Phosphatase (Gibco)
- DH5α kompetente E.coli (Stratagene)
- Klenow-Fragment DNA Polymerase (Roche)
- LB/Amp-Medium und LB/Amp Agar-Platten (10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 60 mg/l Ampicilin mit oder ohne 15 g/l Agar, pH 7,5)
- Plasmid pcDNA1-ApoAI-LpL
- Plasmid pcDNA3-CMV-hLAL
- Primer ApoAl F und ApoAl R
- QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)
- QIAGEN Plasmid Mini oder Maxi Kit (Qiagen)
- Restriktionsendonukleasen HindIII, KpnI und Smal (Roche)
- T4 DNA Ligase (Gibco)

## <u>Methode</u>

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Nukleotidsequenzen (4-8 bp) und spalten sie endonukleolytisch. Der Vektor pcDNA3-CMV-hLAL wurde mit HindIII

linearisiert. Anschließend wurde der Vektor mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert, um eine Religation ohne Insert zu verhindern und mittels Gelextraktion aus einem ethidiumbromidgefärbten Agarosegel nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Sequenz des Promotors wurde von dem Plasmid pcDNA1-ApoAl-LpL mittels PCR (siehe 2.2.4.2) mit den Primern ApoAl F und ApoAl R amplifiziert und das Produkt ebenfalls über eine Gelelektrophorese gereinigt. Bei der Restriktion und der PCR sind jeweils 5'-Überhänge der linearen DNA entstanden, welche unter Ausnutzung der 5'-3'-Polymerase- und 3'-5'-Exonukleasefunktion der DNA-Polymerase Klenow geglättet werden. In Gegenwart eines Überschusses an dNTPs werden 5'-Überhänge aufgefüllt.

Die Ligation des Vektors mit dem Insert wurde mit 200 ng Vektor und 50 ng Insert bei 16 °C für 18 h mit 1 U T4 Ligase durchgeführt. Die Transformation in DH5α-E.coli erfolgte nach Standardprotokollen. Nach erfolgter Transformation wurden die Bakterien auf LB/Amp-Agar-Platten ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Einzelne Klone wurden gepickt, in LB/Amp-Medium üN bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln amplifiziert und die Plasmide mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Mini Kits (Qiagen) oder des QIAGEN Plasmid Maxi Kits (Qiagen) präpariert. Es wurde nach der Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Zur Identifizierung positiver Klone wurden die Plasmide einer Restriktionsanalyse mit dem Restriktionsendonukleasen KpnI und SmaI unterzogen. Nach Auftrennung und Visualisierung im Agarosegel konnten Plasmide mit einer korrekten Insertion identifiziert werden. Durch einen Restriktionsverdau der Plasmide pcDNA3-CMV-ApoAI-hLAL und pcDNA3-CMV-hLAL mit SmaI wurden die DNA-Fragmente ApoAI-hLAL und hLAL isoliert und über eine präparative Gelelektrophorese gereinigt.

#### 2.2.1.3 DNA-Sequenzierung

<u>Puffer</u>

- 0.3 M Natriumacetat
- 75%iger und 100%iger Ethanol
- Prism Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- Resuspensionspuffer (50 mM EDTA pH 8,0 in Formamid)
- spezifische Primer (T7 und hLAL RS1)

#### <u>Methode</u>

Von drei Klonen der pcDNA3-CMV-ApoAI-hLAL-Klonierung wurde das ApoAI-Promotorfragment mit Hilfe der Primer T7 und hLAL RS1 zur Überprüfung der Sequenz sequenziert.

Die Sequenzierung erfolgte nach der Methode der "Fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing" (Zimmermann et al. 1988; Ansorge et al. 1986; Ansorge et al. 1987; Sanger et al. 1977). Hierbei wurde von einem Primer aus der Gegenstrang zu einzelsträngiger DNA synthetisiert. In dem Ansatz befanden sich zusätzlich zu den Desoxynukleotiden vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP`s: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), die so genannten Dye-Terminatoren. Durch zufälligen Einbau der ddNTP`s an den jeweiligen Positionen der Sequenz, kam es zum Syntheseabbruch und damit zur Entstehung verschieden langer DNA-Fragmente. Die Amplifikation der zu untersuchenden DNA-Teilstücke wurde mit Hilfe eines Kits der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über das Kapillarsystem 310 und einem Laserdetektor. Die DNA-Sequenz wurde rechnervermittelt aus dem Fluoreszenzsignal ermittelt.

Die Ansätze durchliefen im T3Thermocycler (Biometra) folgendes Temperaturprogramm: 95 °C 5 min (1 Zyklus); 96 °C 10 sec; 50 °C 15 sec; 60 °C 4 min (35 Zyklen). Nach dem Durchlauf der PCR-Reaktion wurde den Ansätzen 80 µL 0.3 M Natriumacetat und 300 µL 100%igem Ethanol zugegeben, 10 min bei RT inkubiert und dann über 30 min bei 1400 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µL 75% igem Ethanol gewaschen, über 10 min bei 1400 rpm bei 4 °C zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Die Proben wurden in 4 µL Resuspensionspuffer aufgenommen.

## 2.2.2 Zellkultur

<u>Puffer</u>

- Trypanblau (0,5 % in isotonischer Kochsalzlösung)
- Zellkulturmedium (10 % fötales bovines Serum (FBS) (v/v) in DMEM mit 2 mmol/L L-Glutamin, 5 % Penicillin/Streptomycin (v/v))
- Trysin-EDTA

#### <u>Methode</u>

Alle Arbeiten wurden steril unter der Werkbank durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank im Kulturmedium. Die verwendeten Medien und Lösungen waren im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Die Zellen

wurden je nach Zelldichte alle drei bis fünf Tage gesplittet. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und kurz mit Trypsin-EDTA inkubiert. Durch Klopfen lösten sich die Zellen von der Zellkulturflasche und konnten im Zellkulturmedium resuspendiert und wieder ausgesetzt werden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch nach Anfärbung der abgestorbenen Zellen mit Trypanblau (0,5 % in isotonischer Kochsalzlösung) in einer Neubauer-Zählkammer.

## 2.2.2.1 Transfektion von Säugerzellen

#### <u>Puffer</u>

- FuGene 6 Reagenz (Roche)
- Lysispuffer (50 mM Tris, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 80 mM NaCl, 1 % Triton X-100, pH 8,0)
- PBS (2,7 mM KCl, 8,1 mM KH2PO4, 137 mM NaCl, 1,5 mM Na2 HPO<sub>4</sub>, pH 7,4)
- Plasmid pcDNA3-CMV-βGAL
- Plasmid-DNA
- Zellkulturmedium s. o.

#### Methode

Durch Transfektion von Zellen mit DNA, welche in der Regel ein Promotor und ein Gen enthält, wird diese in die Zelle eingeschleusst. Die Zellen exprimieren dann transient das promotorregulierte Gen. Die Liposomen-Methode wurde mit dem Fu-Gene 6 Reagenz von Roche nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Aus negativ geladenen Nukleinsäuren und synthetisch hergestellten, positiv geladenen Liposomen bildete sich ein Komplex, der auf die Zellen gebracht wurde und mit der Zellmembran fusionierte, so dass sein Inhalt durch Endozytose in das Zellinnere gelangte.

Hierzu wurden 6x 10<sup>6</sup> Zellen in Kulturmedium in Zellkulturplatten (ø 10 cm) angezüchtet. Bei einer Konfluenz von 50-60 % wurden 5  $\mu$ g (2  $\mu$ g/ml) DNA mit dem Transfektionsreagenz FuGene6 (Roche) transfiziert. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Nach einer Inkubation von 48 h im Brutschrank wurden die Zellen nach gründlichem Waschen mit gekühltem PBS auf Eis in 2 mL PBS abgekratzt. Die Zellen wurden entweder zur RNA-Isolierung (2.2.6.1) verwendet oder nach Zentrifugation (5 min bei 5000 rpm und 4 °C) in 150-300  $\mu$ L Lysispuffer resuspendiert. Die Suspension stand 20 min auf Eis, bevor sie 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Danach befanden sich im Überstand alle zytosolischen und in Triton X-100 löslichen Proteine. Der Proteingehalt und die LAL-Aktivität wurden bestimmt.

#### 2.2.2.2 Adenovirale Infektion von Säugerzellen

#### <u>Puffer</u>

- 1. Antikörper: α hLAL aus Kaninchen, Peptidaffinitäts-gereinigt; α β-Galaktosidase
- 2. Antikörper:Cy2-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen IgG des Kaninchens (Jackson Immuno Research)
- Adenoviren: Ad-CMV-hLAL und Ad-CMV-βGAL je 10<sup>11</sup> PFU/mI
- Blocklösung (1 % BSA und 10 % Ziegenserum in PBS-Glyzin-Saponin)
- DMEM
- Eindeckelmedium (0,1 % PPD in Mowiol)
- Filipin (50 µg/ml PBS)
- Fixierlösung (4 % Paraformaldehyd in PBS)
- Glyzin-Saponin-PBS-Lösung (5 % Glyzin, 0,5 % Saponin in PBS)
- Lipoproteingemisch (LDL (10 μg Protein/ml LPDS/DMEM) + Chylomikronen (10 μg Proteingehalt /ml LPDS/DMEM))
- LPDS/DMEM-Medium (DMEM + 10 % LPDS)
- Zellkulturmedium s. o.

#### <u>Methode</u>

HuH7-Zellen wurden mit dem LAL-transduzierenden Adenovirus Ad-CMV-hLAL oder Ameis zur Verfügung gestellt) infiziert. Hierzu wurden 1,5x 10<sup>6</sup> Zellen in Sechslochplatten, die je 2-3 Coverslips enthielten, angezüchtet. Bei einer Konfluenz von 50-60 % wurden die Zellen erneut gezählt und mit einer MOI (Multiplicity of Infection) von 100 mit dem Adenovirus in 1 ml DMEM infiziert. Nach einer fünfstündigen Inkubation im Brutschrank wurde der Überstand abgenommen und durch Zellkulturmedium ersetzt. 48 h nach Infektion wurden die Zellen entweder geerntet oder mit 4 % PFA 30 min lang auf die Coverslips fixiert. Anschließend wurden die Zellen 5x 5 min mit PBS, dann 1x 5 min mit PBS-Glyzin-Saponin gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine 30minütige Inkubation in Blocklösung abgesättigt. Anschließend erfolgte für 1 h die Inkubation bei 37 °C mit dem in Blocklösung verdünnten 1. Antikörper (Verdünnung siehe 2.1.6). Nach mehrfachem Waschen mit PBS-Glyzin-Saponin folgte die Inkubation von 45 min mit dem sekundären Antikörper. Hierfür wurde ein Cy2-gekoppelter Antikörper aus der Ziege gegen die IgGs des Kaninchens verwendet, welcher 1:250 in Blocklösung verwendet wurde. Abschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, das Cholesterin mit Filipin in 20 min gefärbt, wieder mit PBS gewaschen. Danach konnten die Coverslips eingedeckelt werden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Zellen, welche geerntet werden sollten, wurden nach 24 Stunden in zwei Gruppen geteilt: Gruppe 1 wurde mit LPDS-Medium inkubiert, während Gruppe 2 mit einem

Lipoproteingemisch in LPDS/DMEM-Medium inkubiert wurde. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit Lysispuffer wie unter 2.2.2.1 behandelt und der Proteingehalt bestimmt. Die Bestimmung der Lipide erfolgte direkt in den Lysaten mit den unter 2.2.8.1 aufgeführten enzymatischen Kits, die Bestimmung der LAL-Aktivität wurde wie unter 2.2.7 beschrieben durchgeführt.

# 2.2.3 Tiere und Tierhaltung

Für alle Versuche wurden Mäuse verwendet, die unter kontrollierten Bedingungen gehalten wurden: 20 °C, 50 % Luftfeuchtigkeit, 14/10 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus, Futter und Wasser *ad libitum*. Die Mäuse wurden von der Tierpflegeabteilung des UKE betreut. Die Tierversuche wurden mit der Genehmigung der Gesundheitsbehörde Hamburg durchgeführt. Zur Untersuchung der Auswirkung einer lipidreichen Diät, wurde spezielles Futter bei der Firma Ssniff, Soest bezogen.

# 2.2.4 Genotypisierung von Mäusen

#### 2.2.4.1 Präparation genomischer Maus-DNA aus Schwanzbiopsien

<u>Puffer</u>

- Histoacryl-Gewebekleber (Braun)
- Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8; 5 mM EDTA; 400 mM NaCl; 1 % SDS)
- PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1)
- Proteinase K (20 mg/ml, Fluka)
- TE Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA)

#### <u>Methode</u>

Zur Bestimmung des Genotypes einer Maus wurde dieser unter einer Inhalationsnarkose mit Diethylether eine Gewebeprobe entnommen und die daraus isolierte DNA analysiert. Dazu wurde von drei bis acht Wochen alten Mäusen 2 bis 5 mm Schwanzspitze abgeschnitten. Die Wunde wurde mit Histoacryl-Gewebekleber verschlossen. Das Gewebe wurde in 500 µl Lysispuffer aufgenommen, 20 µl Proteinase K zugegeben und 5 Stunden bis über Nacht bei 55 °C auf einem Schüttler oder im Wärmeschrank lysiert. Die genomische DNA wurde anschließend mit PCI extrahiert, gefällt und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. 1 µl wurde für eine PCR mit den Primern ApoAl F und hLAL RS3 eingesetzt. Zur Detektion eventueller Tierverwechslungen wurde der Genotyp mit der hepatischen LAL-Aktivität verglichen.

# 2.2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

# <u>Puffer</u>

- 20 mM dNTPS (jeweils, Roche)
- Matrix DNA
- MgCl (50 mM, Gibco)
- spezifische Primer (je 2 mM)
- Taq Polymerase (Gibco) sowie der mitgelieferter 10x Reaktionspuffer

#### Methode (Saiki et al. 1988)

Die exponentielle Vervielfältigung einer DNA-Matrize erfolgt in drei Schritten, die zyklisch wiederholt werden. Zuerst wird die DNA bei hoher Temperatur denaturiert. Durch anschließende Kühlung können die Primer an die einzelsträngige DNA binden (Annealing). Bei geeigneter Reaktionstemperatur werden dann die von den Primern stromabwärts gelegenen Regionen polymerisiert. Bei der Wiederholung dient die neu synthetisierte DNA ebenfalls als Matrize. 30 bis 40 Zyklen werden benötigt, um die DNA effizient zu vervielfältigen. Bei jeder PCR müssen folgende Parameter optimiert werden: die Konzentration an eingesetzten DNA, Primern, freien Nukleotiden sowie an Mg<sup>2+-</sup>Ionen und das Temperaturprofil (White et al. 1989).

Ein PCR-Ansatz von 20–100 µl Volumen setzt sich folgendermaßen zusammen: 100 ng Matrix DNA; 0,2 µM je Primer; 0,75 mM je dNTP; 5 mM MgCl, 1x Taq Polymerase Puffer; 2,5 U Taq Polymerase. Das Standardprogramm (Genotypisierung der Mäuse, Amplfikation des ApoAI-Promotors, Etablierung RT-PCR) sah folgendermaßen aus.

Segment	Zyklen	T in °C	T in min	Reaktion
1	1	94	5	Denaturierung
2	35	94	1	Denaturierung
		53	1	Primer Annealing
		72	0,5	Primer Extension
3	1	72	10	Primer Extension

Tabelle 3:	Temperaturprofil	der PCR zur	Genotypisieruna

# 2.2.5 Gewinnung von murinen Blut- und Gewebeproben

# 2.2.5.1 Blutentnahme

Puffer und Materialien

- 0,5 M EDTA-Lösung
- Diethylether
- Hämatokritkapillare
- Isopentan

#### <u>Methode</u>

Die Blutentnahme bei Mäusen erfolgte nach sechsstündigem Fasten unter einer Inhalationsnarkose mit Diethylether. Mit einer Hämatokritkapillare wurden maximal 250 µl Blut aus dem retroorbitalen Venenkomplexes entnommen und zur Verhinderung der Gerinnung sofort mit 1/100 Volumen einer 0,5 M EDTA-Lösung vermischt. Das Blut wurde in einer Tischzentrifuge bei 4 °C 3 min mit 13000 rpm zentrifugiert, das Plasma abgenommen und bei 4 °C gelagert. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei –20 °C.

## 2.2.5.2 Organentnahme

<u>Puffer</u>

- Narkoselösung (12 mg/ml S-Ketaminhydrochlorid (Ketanest S); 1,6 mg/ml Xylazinhydrochlorid (Rompun) in PBS)
- PBS

## <u>Methode</u>

Die Mäuse wurden mit 100 µl Narkoselösung je 10 g Körpergewicht betäubt. Die Blutentnahme erfolgte wie oben beschrieben. Zur Organentnahme wurden Bauch und Brusthöhle geöffnet, das rechte Atrium aufgeschnitten und die Organe der Maus durch Injektion von 2-5 ml PBS in den linken Ventrikel perfundiert, bis die Leber blutfrei erschien. Die entnommenen Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert. Gewebe, das für Gefrierschnitte vorgesehen war, wurde zunächst in stickstoffgekühltem Isopentan eingefroren und anschließend ebenfalls bei –80 °C gelagert.

# 2.2.6 Quantifizierung von mRNA

# 2.2.6.1 Präparation von Gesamt RNA

#### <u>Puffer</u>

- Lösungsmittel: Chloroform, Ethanol, Isopropanol
- Steriles H<sub>2</sub>O (Braun)
- TriZol (Gibco)

#### <u>Methode</u>

Es wurde sowohl aus Darm- und Lebergewebe sowie aus Zellen RNA isoliert. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C bis zur Aufarbeitung gelagert. Aus etwa 100 mg eingewogenes Gewebe bzw. aus geernteten Zellen wurde mit TriZol nach Herstellerangaben die RNA extrahiert. Hierfür wurden die Proben mit 1 ml TriZol versetzt und mit dem Ultraturrax homogenisiert. Die Reaktionsgefäße wurden auf Eis inkubiert, bis alle Proben homogenisiert waren. Dem Homogenat wurde 300 µl Chloroform zugegeben, für 15 min geschüttelt und 10 min bei 12000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die Oberphase wurde abgenommen, 0.5 ml Isopropanol zugesetzt, 10 min bei RT inkubiert und 10 min bei 12000 g bei 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit je 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Der Niederschlag wurde kurz bei RT getrocknet und in 50 bis 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die RNA wurde für mindestens 15 min bei 56 °C gelöst, die Konzentration gemessen und bei -80 °C gelagert.

# 2.2.6.2 Amplifikation und Quantifizierung der mRNA durch Reverse Transkription und Echtzeit-PCR

## <u>Puffer</u>

- 100 mM Dithiothreitol (DTT) (Gibco),
- 1 U/µl DNase, 10x Reaktionspuffer (Gibco)
- je 20 mM dNTP's (Roche)
- 50 mM MgCl (Gibco)
- 200 U/µI M-MLV-RT (Gibco)
- 50 ng/µl Random Primer (Gibco)
- 1 U/µl RNase Inhibitor (Gibco)
- spezifische Primer (siehe 2.1.5)
- SYBR® Green PCR Master Mix (Roche; enthält AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTP's)

#### <u>Methode</u>

Die reverse Transkription mit anschließender PCR dient dem Nachweis der Transkription eines Gens. Zu diesem Zweck wird RNA aus dem Gewebe isoliert. Nur von aktiven Genen liegt dann mRNA vor. DNA, welche auch nichttranskribierte Gene enthält, wird mit DNase verdaut. Mit Hilfe einer reversen Transkriptase und eines Primers wird dann die RNA in Erststrang-cDNA übersetzt. Der Primer ist entweder komplementär zum 3`-Ende des nachzuweisenden Gens, komplementär zum Polyadeninschwanz am Ende einer jeden mRNA oder besteht aus einem Gemisch aus Hexameren. In den beiden letzten Fällen wird die Spezifität für ein bestimmtes Gen erst bei der PCR eingeführt. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion können dann diese DNA-Fragmente im zellfreien System exponentiell amplifiziert werden (siehe auch Kapitel 2.2.4.2.).

#### DNase-Verdau

Der Reaktionsansatz enthielt 1  $\mu$ g RNA, 1 U RNase Inhibitor, 1 x DNase Puffer und 1 U RNase freie DNase und wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitze-deaktivierung der DNase durch Inkubation der Ansätze für 15 min bei 65 °C.

#### **Reverse Transkription**

Für die reverse Transkription der Darm und Leberproben wurden 0,5  $\mu$ g RNA eingesetzt. Für eine relative Standardisierung der Primerpaare (mhLAL F/MLAL R1 + mhLAL F/hLAL R2 + PBDG F/PBDGR) wurde eine Verdünnungsreihe mit 5 verschiedenen Konzentrationen (8; 2; 0,5; 0,125 und 0,03125  $\mu$ g RNA) der Gesamt-RNA einer transgenen Maus erstellt. Diese wurden alle gleichermaßen mit Hilfe der M-MLV und zufälligen Hexameren als Primer ("Random Primer") revers transkribiert. Die reverse Transkription begann mit einem Annealing der Primer an die RNA mit 10  $\mu$ l RNA und 100 ng "Random Primer" in insgesamt 12  $\mu$ l durch Inkubation bei 70 °C für 10 min. Anschließend wurde ein Reaktionsgemisch von 8  $\mu$ l hinzupipettiert, so dass der Ansatz dann 1 U RNase Inhibitor, 10 mM DTT, 0,75 mM je dNTP und 200 U M-MLV-RT enthielt. Die cDNA-Synthese erfolgte für 10 min bei RT und 1 h bei 37 °C. Inaktivierung der Transkriptase erfolgte bei 90 °C für 6 min. Der Ansatz wurde bis zur PCR auf Eis gehalten oder bei -20 °C gelagert.

#### Echtzeit PCR

Bei der Echtzeit-PCR wird die exponentielle Vervielfältigung des PCR-Produktes direkt durch Messung der Fluoreszenz eines in die doppelsträngigen DNA inter-

kalierenden Fluorochroms (SYBR Green) verfolgt. Das Flureszenzsignal ist proportional zur Menge an amplifizierter DNA und wird nach jedem Zyklus bei einer Temperatur von 80 °C gemessen. Charakteristisches Merkmal dieses Verlaufes und direkt proportional zur ursprünglichen Menge an cDNA (und damit an RNA) ist der Zeitpunkt (Anzahl der Zyklen), bei welcher das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrundrauschen tritt und in die lineare Phase übergeht. Dieser Punkt wird der "Treshold Cycle" (Ct) genannt und zur Quantifizierung der PCR herangezogen. Je höher die Menge an Ausgangsmaterial ist, desto kleiner ist der Ct- Wert.

Die PCR-Ansätze wurden mit einem kommerziellen Mix von Roche nach Herstellerangaben zusammenpipettiert und enthielten neben 8 µl Reaktionsmix, welches Taq-Polymerase, dNTP's und SYBR Green enthielt, 3 mM MgCl, 400 nM je Primer sowie 5 µl einer 1:5 verdünnten cDNA-Lösung aus der reversen Transkription in insgesamt 15 µl. Das gewählte Temperaturprofil ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Segment	Zyklen	T in °C	T in sec	T-Anstieg in °C/sec	Reaktion	
1	1	95	30		Denaturierung	
2	55	95	0		Denaturierung	
		58	5	20	Primer Annealing	
		72	13		Primer Extension	
		80	0		Fluoreszenz Messung	
3	1	95	0		Denaturierung	
4		65	15	0,1	Erstellung	einer
		95	0		Schmelzkurve	

Tabelle 4: Temperaturprofil der PCR nach der cDNA-Synthese

Die Bestimmung und Auswertung der Ct-Werte erfolgte rechnervermittelt. Ein charakteristischer Parameter eines PCR-Produktes ist seine Schmelztemperatur. Am Ende der Zyklen wurde eine Schmelzkurve erstellt, die Rückschlüsse auf die Spezifität des Produktes oder eine mögliche Kontaminierung zuließ. Zusätzlich konnten die Endprodukte durch eine analytische Auftrennung im Agarosegel überprüft werden.

# 2.2.7 Messung der enzymatischen Aktivität der lysosomalen sauren Lipase

Zur Charakterisierung der LAL wurde in Leberpräparationen und Zelllysaten (2.2.2.1) die lipolytische Aktivität im sauren Milieu gegenüber Triolein und gegenüber Cho-

lesterylolein gemessen. Da die spezifische Aktivität der LAL im Vergleich zu anderen Lipasen sehr gering ist, wurde die lipolytische Aktivität mit Hilfe radioaktiv-markierter Substrate gemessen. Da es keine standardisierte Methode zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der LAL gibt, wurden die Assays individuell optimiert.

## 2.2.7.1 Proteinextraktion

#### <u>Puffer</u>

- Homogenisierungspuffer (10 mM Natriumacetat pH 5; 0,1M DTT)
- PIC (10 mM Antipain; 10 mM Chymostatin; 10 mM Leupeptin; 1 mM Pepstatin; 1 mM PMSF; 50 % DMSO)
- Resuspensionspuffer (10 mM Natriumacetat pH 5; 0,1M DTT; 1 % (v/v) Triton-X-100)

#### **Methode**

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt; direkt vor Verwendung des Homogenisierungs- und des Resuspensionspuffers wurden beide 1:1000 mit PIC versetzt. Es wurden 50-100 mg Leber mit 1 ml Homogenisierungspuffer versetzt und mit einem Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde zweimal 15 min mit 800 g (4000 rpm) zentrifugiert und jeweils der Überstand weiterverwendet. Der Überstand wurde mit einer Beckman TL-100 Ultrazentrifuge in einem TLA-100.2 Festwinkelrotor 1 h bei 4 °C bei 55000 rpm (100000 g) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und erneut im Glashomogenisator homogenisiert und, wie oben beschrieben, 30 min in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Durch das im Resuspensionspuffer enthaltene Triton-X-100 wurden die Membranen lysiert. Im Überstand befanden sich zum einem Membranproteine sowie Proteine aus membranumhüllten Kompartimenten (Peroxisomen, Lysosomen, ER). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration, wurde der Überstand aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

## 2.2.7.2 Proteinbestimmung

#### <u>Puffer</u>

- 0,1 M Natriumhydroxidlösung (NaOH)
- Albumin-Standardlösung (Pierce)
- Proteinassay (BioRad)

#### Methode (Bradford 1976)

Die Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode basiert auf einer spezifischen Farbreaktion, bei der Coomassie-Brilliantblau G250 verwendet wird. Dieser Farbstoff reagiert mit Proteinen zu einem Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 595 nm aufweist, wobei der ungebundene Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm zeigt.

Für die Bestimmung wurden 5-10 µL der Probe auf 100 µL mit 0,1 M NaOH aufgefüllt, dann 700 µL Aqua bidest und 200 µL Bradford-Reagenz (BioRad) zugegeben. Nach gründlichem Mischen im Vortex wurde 10 min bei RT inkubiert. Als Standard diente bovines Serumalbumin. Die Proben wurden anschließend in einem Photometer bei 595 nm gemessen. Als Referenz zur Berechnung der OD-Werte diente ein substratfreier Ansatz.

# 2.2.7.3 Trioleinhydrolyse

<u>Puffer</u>

- 0,109 M Natriumazetat pH 5
- Assaypuffer (0,1 M Natriumazetat pH 5; 0,5 % (w/v) Triton-X-100)
- Extraktionslösung (Chloroform: Methanol: Heptan 1,25:1,41:1, v/v/v)
- Radioaktives Triolein (Amersham CFA 258; spezifische Aktivität 52 mCi/mmol))
- Stopplösung (0,1 M Borat; 0,1 M Carbonat, pH 10,5)
- Triolein

## Methode (Messieh et al. 1983)

Als Substratemulsion für 20 Proben wurden 40 µl radioaktives Triolein mit 70 mg kaltem Triolein gemischt, unter Stickstoff abgedampft und in 3 ml Assaypuffer aufgenommen. Der Ansatz wurde dreimal für 1 min bei 60 W sonifiziert, um eine Emulsion aus Lipidmizellen herzustellen.

Die Reaktionsmischung bestand in einem Gesamtvolumen von 200 µl aus 25 µl der Probe, 75 µl 0,109 M Natriumazetat pH 5 sowie 100 µl der Substratemulsion. Hieraus ergab sich eine Lösung mit den Endkonzentrationen von 0,27 mM Triolein (spezifische Aktivität von 99 cpm/nmol); 0,1 M Natriumazetat, pH 5; 0,25 % Triton-X-100. Sie wurde 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch alkalische Verseifung durch Zugabe von 1 ml der Stopplösung gestoppt. Das nichtumgesetzte Substrat sowie die wasserunlöslichen Di- und Monoglyzeride wurden mit 3,14 ml Extraktionslösung extrahiert (Belfrage & Vaughan 1969). Aus der wässrigen Phase wurde nach Zentrifugation bei 3000 rpm (Untertischzentrifuge) die Menge an freigesetzter und verseifter Ölsäure durch Messung der radioaktiven Strahlung im  $\beta$ -Counter bestimmt und die enzymatische Aktivität der LAL berechnet.

# 2.2.7.4 Cholesteryloleinhydrolyse

## <u>Puffer</u>

- 0,109 M Natriumazetat pH 5
- 25 mM EDTA pH 7,4
- Assaypuffer (0,1 M Natriumazetat pH 5; 0,5 % (w/v) Triton-X-100)
- Cholesterylolein
- Extraktionslösung (Benzol:Chloroform:Methanol 1:0,5:1,2 (v/v/v) und 0,1 M Ölsäure)
- Phosphatidylcholin
- Radioaktives Cholesterylolein (Amersham CFA, spezifische Aktivität von 56 mCi/mmol)
- Stopplösung (0,3 M Natriumhydroxidlösung)

## <u>Methode</u>

Es wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Haley und Mitarbeitern gearbeitet (Haley et al. 1980). Als Substratemulsion für 20 Proben wurden 50 µl radioaktives Cholesterylolein mit 570 µg kaltem Cholesterylolein und 2,5 mg Phosphatidylcholin gemischt. Nach dem Abdampfen wurde der Niederschlag in 2 ml 25 mM EDTA pH 7,4 aufgenommen und dreimal für 1 min bei 60 W sonifiziert, um eine Emulsion aus Lipidmizellen herzustellen. Die Reaktionsmischung bestand in einem Gesamtvolumen von 300 µl: 25 µl Probe, 175 µl 0,109 M Natriumazetat pH 5 sowie 100 µl der Substratemulsion. Endkonzentrationen waren die folgenden: 53,8 µM Cholesterylolein (spezifische Aktivität: 1554 cpm/nmol), 0,42 mM Phosphatidylcholin; 64 mM Natriumacetat pH 5 und 8,3 mM EDTA. Die Reaktion lief 60 min bei 37 °C. Sie wurde durch die Zugabe von 3 ml der organischen Extraktionslösung und 0,6 ml Stopplösung beendet (Pittman et al. 1975). Aus der wässrigen Phase wurde nach Zentrifugation bei 3000 rpm (Untertischzentrifuge) die Menge an freigesetzten und verseiften Fettsäuren durch Messung der radioaktiven Strahlung im  $\beta$ -Counter bestimmt und die enzymatische Aktivität der LAL berechnet.

# 2.2.8 Bestimmung von Lipiden

## 2.2.8.1 Enzymatische Bestimmung von Lipiden

## <u>Puffer</u>

- Amplex Red Cholesterin Assay Kit (Molecular Probes)
- Chloroform
- Enzymatischer Farbtest für Cholesterin nach CHOD-PAP (Roche)
- Enzymatischer Farbtest für freie Fettsäuren NEFA (Wako)
- Enzymatischer Farbtest für freies Cholesterin (Wako)
- Enzymatischer Farbtest für Phospholipide (Roche)
- Enzymatischer Farbtest für Triglyzeride nach GPO-PAP (Roche)

- Extraktionspuffer (Chloroform/Methanol/Essigsäure (2:4:1))
- Precipath, Precinorm (Roche)
- Resuspensionspuffer (10 mM Natriumacetat pH 5; 0,1 M DTT; 1 % (v/v) Triton-X-100
- Triton-X-100-Lösung (1 % in Chloroform)

#### Methode (Carr et al. 1993)

Im Plasma in Zellen und in Gewebeproben wurden die Lipide mit enzymatischen Kits gemessen und photometrisch ausgewertet. Plasma (siehe unter 2.2.5.1) und Zelllysate (2.2.2.2) wurden direkt für die Bestimmungen eingesetzt. Zur Vorbereitung der Leberproben wurden ungefähr 50 mg Leber in 1 ml Resuspensionspuffer mit dem Ultraturrax homogenisiert und mit einer Beckman TL-100 Ultrazentrifuge in einem TLA-100.2 Festwinkelrotor 1 h bei 4 °C bei 55000 rpm (100000 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde homogenisiert und abgenommen. Anschließend wurde das Pellet sowie das Röhrchen zweimal mit 100 µl Resuspensionspuffer gewaschen und die Waschlösung mit dem Überstand vereinigt. Dieser wurde für die Proteinbestimmung eingesetzt, aliguotiert und bei -20 °C gelagert. Zur Bestimmung der Lipide wurden diese zunächst aus dem Überstand extrahiert, mit Triton-X-100-Lösung solubilisiert und die Lipide enzymatisch bestimmt (modifiziert nach Carr et al 1993). Vom Überstand wurde ein Volumen mit 500 µg Protein abgenommen und dieses auf 300 µl mit PBS aufgefüllt. Zur Standardisierung wurde parallel hierzu eine Standardreihe mit Precipath angesetzt und ebenfalls auf 300 µl mit PBS aufgefüllt. Proben und Standards wurden mit 800 µl Extraktionspuffer versetzt, gevortext und für 1 h bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wurden sie mit je 200 µl Chloroform und Wasser versetzt und 15 min bei RT geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 12000 g für 15 min in der Tischzentrifuge. Die untere Chloroformphase enthielt die Lipde und wurde abgenommen. Die wässrige Phase wurde nach Zugabe von 400 µl Chloroform noch zweimal wie oben beschrieben reextrahiert, die Chloroformphasen gepoolt und anschließend unter Stickstoff abgedampft. Die Probe wurde in 75 µl 1% igem Triton-X-100, gelöst in Chloroform, resuspendiert und erneut unter Stickstoff abgedampft. Die erneute Resuspendierung erfolgte mit 150 µl H<sub>2</sub>O durch Inkubation bei 60 °C für 30 min unter Schütteln. Die Bestimmung der Lipide wurde dann mit den oben genannten kommerziellen enzymatischen Farbtests durchgeführt.

In der Regel wurden die Proben- und Reagenzmengen auf kleine Volumina skaliert, so dass in Mikrotiterplatten (96 Lochplatten) gemessen werden konnte. In diesem Fall wurde von allen Substanzen 1/5 der Herstellerangaben verwendet. Als Kontrollen dienten ein Precinormwert (TG von 90–140 mg/dL) und ein Precipathwert (TG von 300-400 mg/dL) der Firma Roche, sowie Stammlösungen, welche zum Teil mitgeliefert oder von Sigma oder Roche extra bezogen wurden.

#### 2.2.8.2 Gelfiltration

<u>Puffer</u>

- Amplex<sup>™</sup> Red Cholesterin Assay Kit (Molecular Probes)
- Enzymatischer Farbtest für Cholesterin nach CHOD-PAP (Roche)
- Enzymatischer Farbtest für Triglyzeride nach GPO-PAP (Roche)
- FPLC-Puffer (1 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0)
- Precinorm, Precipath (Roche)

Methode (Rudel et al. 1986)

Um die Lipoproteine entsprechend der Größe aufzutrennen, wurde die Gelfiltration eingesetzt. Dazu wurde eine FPLC®-Anlage (Pharmacia) mit einer Superose®-6-Säule verwendet, die einen für Plasmalipoproteine optimalen Trennbereich von 5-5000 kD besitzt. 75-200 µL Plasma wurden auf die Säule gegeben und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in FPLC-Puffer aufgetrennt. Das Eluat wurde in 0,5-mL-Fraktionen gesammelt. In den Fraktionen wurde Cholesterin und Triglyzeride photometrisch mit den oben genannten Farbtests gemessen, die Standardisierung erfolgte mit Precipath oder Precinorm.

## 2.2.8.3 Bestimmung des Fettsäuremusters mittels Gaschromatographie

#### <u>Puffer</u>

- BHT-Lösung (Butyliertes Hydroxytoluen; 200 mM)
- BSTFA (bis(Trimethyl-silyl)trifluoro-acetamid)
- DMF (Dimethylformamid)
- Heptadekansäure (5 µg/µl)
- Lösungsmittel: Chloroform, Ethanol, Hexan, Methanol, Toluol
- Natriummethoxid
- α-Cholestan (0,1 µg/µl)

## Methode (Lepage & Roy 1986)

Die zu messenden Fettsäuren wurden aus der Leber isoliert. Hierfür wurden 25-50 mg Leber eingewogen und 300  $\mu$ l PBS zugegeben. Weiterhin wurden 500  $\mu$ L Standardlösung mit 50  $\mu$ g  $\alpha$ -Cholestan und 20  $\mu$ l Standardlösung mit 100  $\mu$ g Heptadekansäure (C 17:0) als interne Standards und 100  $\mu$ L BHT als Antioxidanz sowie 1 ml Methanol zugesetzt. Dieser Ansatz wurde mit dem Ultraturrax homogenisiert und nach Zugabe von 2 ml Chloroform und 900  $\mu$ l PBS für 1 h geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 3000 rpm (Untertischzentrifuge) wurde von der unteren Chloroformphase 2 ml abgenommen. Anschließend wurde die Extraktion durch erneute Homogenisierung mit dem Ultraturrax, Zugabe von 1,2 ml Chloroform, einstündigem Schütteln und abschließender Zentrifugation wiederholt. Die Chloroformphase wurde mit der ersten gepoolt und unter Stickstoff abgedampft.

Zur Hydrolyse der Triglyzeride und zur Methylierung (zur Stabilisierung) der Fettsäuren wurde der Rückstand in 250  $\mu$ L Toluol aufgenommen, in Eppendorfgefäße überführt, mit 500  $\mu$ L Natriummethoxid 10 min bei 56 °C erhitzt und mit 100  $\mu$ L 25%iger Essigsäure neutralisiert. Cholesterin und die methylierten Fettsäuren wurden durch Zugabe von 250  $\mu$ L Hexan extrahiert, nach Mischen und Zentrifugieren (3 min 12000 rpm) die organische Phase abgenommen und unter Stickstoff abgedampft. Im letzten Schritt wurde das Cholesterin zur Stabilisierung silyliert, indem die Probe mit 100  $\mu$ L DMF und 100  $\mu$ L BSTFA 30 min bei RT unter einer Stickstoffatmosphäre inkubiert und dann das Lösungsmittel abgedampft wurde. Der Rückstand wurde in 10  $\mu$ I Toluol aufgenommen.

Zur Messung der Fettsäuren und des Cholesterins wurden Proben 1:120 verdünnt und in den Gaschromatograph Hewlett Packard 5890 Series II (Palo Alto, USA) mit der Säule HP-5MS eingespritzt. Die Verbindungen wurden im Flammenionisations-Detektor registriert und mit der vorhandenen Software identifiziert. Anhand der internen Standards wurde aus der Fläche der Peaks die Konzentration der einzelnen Fettsäuren quantifiziert.

# 2.2.9 Histologie

<u>Puffer</u>

- Entellan®
- Eosinlösung (0,5%iges Eosin)
- Fettrotlösung (0,3 g Fettrot (Chroma-Gesellschaft) ad 100 mL 70 % Ethanol)
- Kaiser's Gelatine
- Methanol
- Methanol, Ethanol
- Meyers Hämalaun
- Rotihistol®
- Tissue Tek®

#### <u>Methode</u>

Ein Teil der Leber wurde mit Tissue Tek auf einer Korkplatte fixiert, in stickstoffgekühltem Isopentan gefroren und anschließend bei –80 °C gelagert. Mit dem Kryotom Cryo-Star HM 560M wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen und bei -20 °C bis zur Anfärbung gelagert.

# Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung in Gewebeschnitten färbt Hämatoxylin das Chromatin der Zellkerne blau und Eosin das Zytoplasma und die Interzellulärsubstanz rosa bis rot. Die Fixierung der Schnitte erfolgte 5 min in absolutem auf –20 °C vorgekühltem Methanol. Alle folgenden Schritte erfolgten bei RT. Nach wiederholtem Waschen mit H<sub>2</sub>O, wurden die Schnitte 5 min in Meyers Hämalaun gefärbt, 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und anschließend in einer 0,5%igen Eosinlösung gefärbt und mit H<sub>2</sub>O gespült. Nach der Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %) wurden die Präparate je 5 min in 100%igem Ethanol und Rotihistol® gestellt und dann mit Entellan® eingedeckelt.

#### <u>Fettrotfärbung</u>

Um intrazelluläre Triglyzeride und Cholesterinester sichtbar zu machen, wurden die Gefrierschnitte mit Fettrot gefärbt. Dafür wurden die Schnitte 5 min mit auf –20 °C gekühltem 50% igen Ethanol fixiert und die Neutralfette 10 min mit Fettrotlösung gefärbt. Es folgte mehrfaches Waschen mit 50% igem Ethanol und PBS sowie einer Kernfärbung mit Meyers Hämalaun. Die Schnitte wurden mit Kaiser's Gelatine eingedeckelt.

## 2.2.10 Westernblotanalyse

## 2.2.10.1 Proteinextraktion aus der Leber

<u>Puffer</u>

- Homogenisierungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25 M Sucrose)
- PIC (10 mM Antipain; 10 mM Chymostatin; 10 mM Leupeptin; 1 mM Pepstatin; 50 % DMSO)
- Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 % (v/v) Triton-X-100)

#### <u>Methode</u>

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt; direkt vor Verwendung des Homogenisierungs- und des Resuspensionspuffers wurden beide mit 1:1000 mit PIC versetzt. Es wurden 50-100 mg Leber mit 1 ml Homogenisierungspuffer versetzt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Das Homogenat wurde zweimal 15 min mit 800 g (4000 rpm, Untertischzentrifuge) zentrifugiert und jeweils der Überstand weiterverwendet. Der Überstand wurde mit einer Beckman TL-100 Ultrazentrifuge in einem TLA-100.2 Festwinkelrotor 1 h bei 4 °C bei 55000 rpm (100000 g) zentrifugiert. Der Überstand enthielt die zytosolischen Proteine und wurde bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen, erneut im Ultraturrax homogenisiert und wie oben beschrieben 30 min in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Durch das im Resuspensionspuffer enthaltene Triton-X-100 werden die Membranen lysiert, das heißt im Überstand befinden sich zum einem Membranproteine zum anderen Proteine aus membranumhüllten Kompartimenten (Peroxisomen, Lysosomen, ER). Nach Bestimmung des Proteingehalts wurden beide Überstände aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

## 2.2.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### <u>Puffer</u>

- Elektroden-Oberpuffer (0,04 M Borsäure; 0,04 M Tris-HCl 0,1 % SDS; pH 8,6)
- Elektroden-Unterpuffer (0,42 M Tris-HCl pH 9,5)
- Probenpuffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 2 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 8 % Glyzerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % β-Mercaptoethanol)
- Proteinstandard Rainbow Marker RPN 756 oder RPN 800 (Amersham)
- Sammelgel (3 %) (3 % Acrylamidlösung; 50 mM Tris-HCl, pH 6,15; 0,1 % TEMED; 0,5 % APS)
- Trenngel (10 %) (10 % Acrylamidlösung (N,N'-Methylenbisacrylamid); 425 mM Tris-HCl, pH 9,18; 0,125 % TEMED (Tetramethylethylendiamin); 0,05 % APS (Ammoniumpersulfat ))

## <u>Methode</u>

Das Trenn- und das Sammelgel mit oben beschriebener Zusammensetzung wurden nacheinander gegossen. Es wurden jeweils 10 bis 50 µg Protein in die SDS-PAGE eingesetzt und auf 8-12%igen Gelen untersucht. Es wurden jeweils drei Teile Probe mit 2 Teilen Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden 10 min bei 95 °C und 1400 rpm im Thermomixer reduziert. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Marker (Rainbow Marker) mit Proteinen definierter Größe und eine BSA-Kontrolle (Molekulargewicht 69 kDa) aufgetragen. Die Proben liefen im Gel bei 30 mA (großes Gel) bzw. 10 mA (Minigel) und konstanter Spannung. Da alle Proteine negativ geladen sind (SDS), wurden sie auf dem Weg von der Kathode zur Anode ihrer Größe nach aufgetrennt.

## 2.2.10.3 Westernblot

<u>Puffer</u>

 Blocklösung (10 % Milchpulver Blotting Grade Non-Fat Dry Milk (BioRad), 5 % BSA Fraction V (PAA Laboratories) in Waschpuffer A)

- Blotting-Puffer (150 mM Glyzin; 20 mM Tris, 20 % Methanol)
- Entwicklungslösung I (Cumarinsäure 1:200; Luminol 1:100 in 5 mL 0,1 M Tris mit pH 8,5)
- Entwicklungslösung II (3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 5 mL 0,1 M Tris mit pH 8,5)
- Ponceau-Färbelösung (0,2 % in 3 % Trichloressigsäure)
- primäre und sekundäre Antikörper siehe Tabelle 2
- Waschpuffer A (154 mM NaCl; 20 mM Tris; 0,1 % Tween 20, pH 7,4)
- Waschpuffer B (154 mM NaCl; 20 mM Tris; 0,1 % Tween 20; 0,25 % Natriumdesoxycholat; 0,1 % SDS, pH 7,4)

#### <u>Methode</u>

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden im Elektroblot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (bei 4 °C und konstanter Spannung: 4 h bei 400 mA oder 20 h bei 200 mA). Zur Lade- und Transferkontrolle wurde die Membran nach dem Blotvorgang mit Ponceau-Lösung gefärbt und für die Inkubation mit den unterschiedlichen Antikörpern zurecht geschnitten. Die Streifen wurden in PBS entfärbt und 2 h in Blocklösung behandelt. Die Blocklösung wurde mit Waschpuffer A abgespült und die Membran mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es wurde gewaschen (1 min in Waschpuffer A, 2 x je 10 min in Waschpuffer B, 1 min in Waschpuffer A) und der entsprechende, Peroxidase gekoppelte zweite Antikörper für 2 h bei RT aufgegeben. Die Verdünnungen der einzelnen Antikörper ist unter 2.1.6 angegeben. Es wurde erneut, wie oben beschrieben, gewaschen und die Membran in PBS gespült. Für die Entwicklung wurden beide frisch angesetzten Entwicklungslösungen vereint, der Blot 60 sec mit dem ECL-Substrat inkubiert, das Substrat anschließend entfernt, mehrere Röntgenfilme mit unterschiedlich langen Expositionszeiten auf den Blot aufgelegt und entwickelt. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase reagiert mit dem Luminol der Entwicklungslösung und der als Enhancer fungierenden Cumarinsäure unter Bildung eines Chemilumineszenzsignals (ECL=Enhanced Chemoluminescence), das die markierten Proteine als dunkle Banden auf hellem Röntgenfilm sichtbar werden lässt.

# 2.2.11 Messung der enzymatischen Aktivität der Katalase und der sauren Phosphatase

#### <u>Puffer</u>

- Katalase, Phosphatase (Gibco)
- Probenpuffer Katalase (13 mM Tris-HCL pH 7; 0,1 % (w/v) BSA, 0,66 % Triton-X-100)
- Stoplösung Katalase (0,225 % (w/v) Titanium Oxysulfat)
- Stoplösung Phosphatase (0,25 M NaOH)
- Substratlösung Katalase (2,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 20 mM Tris-HCL pH 7; 0,1 % (w/v) BSA)

 Substratlösung Phosphatase (8 mM p-Nitrophenyl Phosphat in 90 mM Natriumacetat pH 5)

#### <u>Methode</u>

Zur Messung der sauren Phosphatase und der Katalase wurden die Proteine der Leberpräparation (2.2.10.1) verwendet. Die Protokolle sind dem Applikations-/Begleitheft der Firma Axis-Shield zum Produkt OptiPrep<sup>™</sup> (Density Gradient Media) entnommen.

Das Prinzip der Aktivitätsmessung der sauren Phosphatase ist eine Dephosphorylierung des Substrats p-Nitrophenyl-Phosphat durch die Phosphatase. Nach der Reaktionszeit wird das Produkt photometrisch bestimmt. Zur Messung der Aktivität wurden 10 µl der Probe mit 200 µl der Substratlösung gemischt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600 µl Stoplösung beendet. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 410 nm gemessen. Die Standardisierung erfolgte mit einer Standardreihe der alkalischen Phosphatase mit definierter Aktivität.

Das Prinzip der Aktivitätsmesuung der Katalase ist eine Umsetzung des Substrats  $H_2O_2$  durch die Katalase. Nach der Reaktionszeit wird nichtumgesetztes Peroxid durch Titanium Oxysulfat komplexiert und kann photometrisch bestimmt werden.

Alle Schritte dieser Aktivitätsmessung wurden auf Eis ausgeführt. 10 µl Probe wurden mit 30 µl Probenpuffer gemischt. Es wurden 500 µl der Substratlösung zugegeben und die Reaktion genau nach 60 sec durch Zugabe der Stoplösung beendet. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Standardisierung erfolgte durch Erstellung einer Standardreihe mit einer kommerziell erhältlichen Katalase.

# 2.2.12 Sicherheitsvorkehrungen und Entsorgung

Bei allen Chemikalien wurden die R- und S-Sätze beachtet. Organische Lösungsmittel wurden, getrennt nach halogenhaltig und -frei, in die entsprechenden Sammelbehälter entsorgt. Mit Ethidiumbromid kontaminierte Lösungen, Gele und Verbrauchsmaterialen wurden gesondert entsorgt. Biologisches Material (Bakterienkulturen etc.) und die mit diesem kontaminierten Gebrauchsartikel (Pipettenspitzen, Agarplatten etc.) wurden autoklaviert und anschließend entsorgt.

Bei dem Umgang mit Radioaktivität wurden die Sicherheitsauflagen (Strahlenschutzverordnung) eingehalten. Anfallende kontaminierte Verbrauchsmaterialen wurden in den entsprechenden Abfalltonnen gesammelt und von der Firma Amersham entsorgt.

# 2.2.13 Statistik

Die Auswertung und Darstellung von Messdaten erfolgte mit der Software Microsoft Excel. Es sind jeweils die Mittelwerte, sowie die Standardfehler der Fehler ( $\pm$  SEM) dargestellt. Mit Hilfe des Student's t-test für unabhängige Stichproben wurden die Signifikanzen zweier Gruppen überprüft. Als statistisch signifikant wurde angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p<0,05 betrug.

# 3 Ergebnisse

Um die funktionelle Rolle der LAL für den Organismus besser verstehen zu lernen, wurde ein Mausmodell generiert, welches das Enzym in der Leber verstärkt synthetisiert. Ziel der Arbeit ist die biochemische und physiologische Charakterisierung einer LAL-überexprimierenden Mauslinie. Vorversuche zur transienten Überexpression der LAL wurden mit einem LAL-transduzierenden Adenovirus in der Zellkultur durchgeführt.

# 3.1 Transiente Überexpression der lysosomalen sauren Lipase im Zellkultursystem

Zunächst sollte eine adenovirusvermittelte transiente Überexpression der LAL Hinweise auf die Auswirkung einer Steigerung der lipolytischen Aktivität in der Zelle ergeben. Humane Hepatomazellen wurden mit einem hLAL-transduzierenden Adenovirus (Ad-CMV-hLAL) oder zur Kontrolle mit einem β-Galaktosidasetransduzierenden Adenovirus (Ad-CMV-βGAL) infiziert und nach 48 Stunden geerntet. Ein Teil der Zellen wurde zudem während der letzten 24 Stunden mit Lipoproteinen inkubiert. Anschließend wurde der intrazelluläre Lipidgehalt (Abbildung 10) sowie die LAL-Aktivität (Abbildung 9) bei normaler und erhöhter Lipidaufnahme gemessen.



#### Abbildung 9: LAL-Aktivität von Ad-hLAL und Ad-βGAL infizierten HuH7-Zellen

Humane Hepatomazellen HuH7 wurden mit dem Adenovirus Ad-CMV-hLAL (Ad-hLAL) oder dem Adenovirus Ad-CMV-βGAL (Ad-βGAL) infiziert. Ein Teil der Zellen wurde nach 24 Stunden mit Lipoproteinen (LDL: 100 µg Proteingehalt/ml LPDS/DMEM und Chylomikronen: 10 µg Proteingehalt/ml LPDS/DMEM) im Medium inkubiert, (+ Lipoprt.), während der andere Teil der Zellen in LDPS/DMEM inkubiert wurde. Die Zellen wurden nach 48 Stunden lysiert und der Proteingehalt bestimmt. Es wurde die Aktivität der hLAL mit radioaktiv-markiertem Triolein in Doppelbestimmungen gemessen und auf den Proteingehalt bezogen.



#### Abbildung 10: Lipidgehalt von Ad-hLAL und Ad-βGAL infizierten HuH7-Zellen

Humane Hepatomazellen HuH7 wurden mit dem Adenovirus Ad-CMV-hLAL (Ad-hLAL) oder dem Adenovirus Ad-CMV-βGAL (Ad-βGAL) infiziert. Ein Teil der Zellen wurde nach 24 Stunden mit Lipoproteinen (LDL: 100 µg Proteingehalt/ml LPDS/DMEM und Chylomikronen: 10 µg Proteingehalt/ml LPDS/DMEM) im Medium inkubiert, (+ Lipoprt.), während der andere Teil der Zellen in LDPS/DMEM inkubiert wurde. Die Zellen wurden nach 48 Stunden lysiert und der Proteingehalt bestimmt. Die Lipide wurden enzymatisch in Doppelbestimmungen gemessen und auf den Proteingehalt bezogen.

Trotz einer deutlichen Steigerung der LAL-Aktiviät, blieb der Lipidgehalt der Zellen unverändert. Bei Inkubation mit Lipoproteinen kam es zu einer verstärkten Lipideinspeicherung, unabhängig von der lypolytischen Aktivität.

## 3.2 Etablierung einer LAL-überexprimierenden Mauslinie

#### 3.2.1 Klonierung des Expressionsplasmids pc-DNA3-CMV-ApoAI-hLAL

Um eine leberspezifische Überexpression der LAL zu erreichen, wurde der humane Promotor des Apo A-I ausgewählt. Syntheseort des Proteins ist die Leber und der Darm (Higuchi et al. 1988). Nach Deletionsanalysen des Apo A-I-Promotors haben Walsh et al. eine 256 bp lange Sequenz identifiziert, welche eine ausschließliche Expression in der Leber steuert. Die Sequenz beinhaltet u. a. drei verschiedene Erkennungssequenzen (A, B und C), welche mit leberspezifischen Transkriptionsfaktoren, im Speziellen HNF3 und 4, interagieren (Walsh et al. 1989).

	~~~~~~~~~~	Smal	Schnittstelle	Apo	<u>AIF</u>			
GACGGATCGG	GAGATCTCCC	GATCCCCTAT	GGTCGACCCC	GGGAGACCTG	CAAGCCTGCA	GCACTCCCCT	CCCGCCCCCA	80
CTGAACCCTT	GACCCCTGCC	CTGCAGCCCC	CGCAGCTTGC	TGTTTGCCCA	CTCTATTTGC	CCAGCCCCAG	GGACAGAGCT	160
GATCCTTGAA	CTCTTAAGTT	CCACATTGCC	AGGACCAGTG F	AGCAGCAACA	GGGCCGGGGC	TGGGCTTATC	AGCCTCCCAG	240
CCCAGACCCT	GGCTGCAGAC	ATAAATAGGC	CCTGCAAGAG	CTGGCTGCTT	AGAGACTGCG	AGAAGGAGGT	GCGTCCTGCT	320
GCCTGCCCCG	GTCACTCTGG	CTCCCCAGCT	CAAGGTTCAG	GAAGCTTGGT	ACCGAGCTCG	GATCTAGACA	GCGGCCCGGC	400
AGGACAGCTC	Start CAGAATGAAA	ATGCGGTTCT	TGGGGTTGGT	GGTCTGTTTG	<u>IILAL</u> GTTCTCTGGA	CCCTGCATTC	TGAGGGGTCT	480
Bam	HI Schnittstell	e 🗸			4			
GGAGGGAAAC	TGACAGCTGT	GGATCCTGAA	ACAAACATGA	ATGTGAGTGA	AATTATCTCT	TACTGGGGAT	TCCCTAGTGA	560
GGAATACCTA	GTTGAGACAG	AAGATGGATA	TATTCTGTGC	CTTAACCGAA	TTCCTCATGG	GAGGAAGAAC	CATTCTGACA	640
AGGTCCCAAx	ACCAGTTGTC	TTCCTGCAAC	ATGGCTTGCT	GGCAGATTCT	AGTAACTGGG	TCACAAACCT	TGCCAACAGC	720
AGCCTGGGCT	TCATTCTTGC	TGATGCTGGT	TTTGACGTGT	GGATGGGCAA	CAGCAGAGGA	AATACCTGGT hLAI	CTCGGAAACA	800
TAAGACACTC	TCAGTTTCTC	AGGATGAATT	CTGGGCTTTC	AGTTATGATG	AGATGGCAAA	ATATGACCTA	CCAGCTTCCA	880
TTAACTTCAT	TCTGAATAAA	ACTGGCCAAG	AACAAGTGTA	TTATGTGGGT	CATTCTCAAG	GCACCACTAT	AGGTTTTATA	960
GCATTTTCAC	AGATCCCTGA	GCTGGCTAAA	AGGATTAAAA	TGTTTTTTGC	CCTGGGTCCT	GTGGCTTCCG	TCGCCTTCTG	1040
TACTAGCCCT	ATGGCCAAAT	TAGGACGATT	ACCAGATCAT	CTCATTAAGG	ACTTATTTGG	AGACAAAGAA	TTTCTTCCCC	1120
AGAGTGCGTT	TTTGAAGTGG	CTGGGTACCC	ACGTTTGCAC	TCATGTCATA	CTGAAGGAGC	TCTGTGGAAA	TCTCTGTTTT	1200
CTTCTGTGTG	GATTTAATGA	GAGAAATTTA	AATATGTCTA	GAGTGGATGT	ATATACAACA	CATTCTCCTG	CTGGAACTTC	1280
TGTGCAAAAC	ATGTTACACT	GGAGCCAGGC	TGTTAAATTC	CAAAAGTTTC	AAGCCTTTGA	CTGGGGAAGC	AGTGCCAAGA	1360
ATTATTTTCA	TTACAACCAG	AGTTATCCTC	CCACATACAA	TGTGAAGGAC	ATGCTTGTGC	CGACTGCAGT	CTGGAGCGGG	1440
GGTCACGACT	GGCTTGCAGA	TGTCTACGAC	GTCAATATCT	TACTGACTCA	GATCACCAAC	TTGGTGTTCC	ATGAGAGCAT	1520
TCCGGAATGG	GAGCATCTTG	ACTTCATTTG	GGGCCTGGAT	GCCCCTTGGA	GGCTTTATAA	TAAAATTATT	AATCTAATGA	1600
GGAAATATCA	Stop g <mark>tgå</mark> aagctg	GACTTGAGCT	GTGTACCACC	AAGTCAATGA	TTATGTCAAT	GCAGCGGCCG	CTCGAGCATG	1620

#### Abbildung 11: Nukleotidsequenz des verwendeten ApoAI-Promotorfragmentes und der hLAL

Die Sequenz des Promotors ist in grün, die der hLAL in rot dargestellt. Eingezeichnet sind die für die Klonierung (ApoAl F, ApoAl R) und Analyse (ApoAl MF, hLAL RS1, hLAL RS1) der Klonierung verwendeten Primer sowie relevante Schnittstellen. "Start" bezeichnet das Startcodon für die Proteinsynthese und "Stop" das Signalcodon für das Ende der zu transkribierenden Sequenz.

In Abbildung 11 ist die Sequenz des verwendeten ApoAI-Promotorfragmentes und der hLAL dargestellt; zudem sind einige in der Arbeit verwendete Primer eingezeichnet. Die Promotorsequenz wurde mit spezifischen Primern durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und in den Vektor pcDNA3-CMV-hLAL kloniert. Dieser enthielt neben dem kompletten Leserahmen der hLAL, ein Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons (BGH) sowie die Gene für eine Ampicilin- und Neomycinresistenz. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym HindIII linearisiert und die überhängenden Enden mit Hilfe der Klenow-Polymerase aufgefüllt. Die Enden des ApoAI-PCR-Produktes (Insert) wurden gleichfalls mit der Polymerase geglättet. Sowohl Vektor als auch Insert wurden über ein Agarosegel analysiert (Abbildung 12) und präparativ gereinigt.



#### Abbildung 12: Analytisches Agarosegel von Vektor und Insert für die Herstellung des Expres-

#### sionsplasmids pcDNA3-CMV-ApoAI-hLAL

Der Vektor pcDNA3-CMV-hLAL (V) wurde mit HindIII linearisiert. 5'-Überhänge wurden durch die Klenow-Polymerase aufgefüllt und die DNA-Enden mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Das ApoAl-Promotorinsert (I) wurde durch PCR von dem Plasmid pcDNA1-ApoAl-LpL amplifiziert und die 5'-Überhänge ebenfalls aufgefüllt. Beide DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch über ein 1% iges Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Das Photo ist invertiert dargestellt. Der linearisierte Vektor pcDNA3-CMVhLAL hat eine Größe von 6674 bp, das mit den Primern ApoAI F und ApoAI R amplifizierte ApoAI-Promotor-PCR-Produkt 295 bp. M1 und M2: Molekulargewichtsstandard III und VI von Roche. Um die Religierung des Vektors zu verhindern, wurde die Vektor-DNA mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert, mit dem Insert-PCR-Produkt ligiert und dann in kompetente DH5 $\alpha$  E.coli-Zellen transformiert.



#### Abbildung 13: Restriktionsanalyse (Smal/Kpnl) der Klone nach Ligation

Plasmid-DNA der nach der Ligation und Transformation entstandenen Klone wurden mit den Restriktionsenzymen Kpnl und Smal verdaut und die entstandenen Fragmente über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert. Das Photo ist invertiert dargestellt. Bei richtiger Insertion des Promotors entsteht ein 1069 bp großes Fragment (781 bp bei falscher Orientierung). Die Nummern der positiven Klone sind in rot abgebildet. M: Molekulargewichtsstandard III und VI von Roche. Die Plasmid-DNA der hieraus resultierenden E.coli-Klone wurden auf die Orientierung der integrierten DNA hin mit Hilfe einer Restriktionsanalyse mit Smal und Kpnl überprüft (Abbildung 13).

Das fertige Konstrukt ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt. Die korrekte Integration und Vollständigkeit des Promotorfragmentes wurde durch Sequenzierung überprüft. Die exakte Nukleotidsequenz ist im Anhang (Abbildung 41) angegeben. Es wurden drei Klone ausgewählt und durch Transfektion ihrer DNA in einer humanen Hepatomazelllinie (HuH7) auf Funktionalität überprüft.



Abbildung 14: Vektorkarte des Plasmids pcDNA3-CMV-ApoAl-hLAL

Schematisch dargestellt sind einige Restriktionendonukleasen, der offene Leserahmen der hLAL und der Resistenzgene von Ampicilin und Neomycin sowie essentielle DNA-Strukturen für die Transkription. pCMV: Promotor des Cytomegalovirus; pApoAI: Promoter des Apolipoproteins A-I; BGH polyA: Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons; pSV40; Promotor des Simianvirus 40; SV40 polyA: Polyadenylierungssignal des Simianvirus 40; ColEI: minimalisiertes E.coli Origin

# 3.2.2 Charakterisierung des Transgens ApoAI-hLAL in Zellkultur

Das Plasmid pcDNA3-CMV-ApoAI-hLAL wurde mit dem Restriktionsenzym Smal verdaut und das Fragment ApoAI-hLAL über ein präparatives Agarosegel gereinigt und isoliert. Anschließend wurde das Fragment transient in humane Hepatoma-(HuH-7)-Zellen transfiziert, um die vom Promotor Apo A-I induzierte Expression zu

überprüfen. Als Kontrolle wurde das Fragment hLAL ohne Promotor verwendet, welches aus dem Ausgangsvektor pcDNA3-CMV-hLAL mit einem Smal-Verdau isoliert wurde sowie ein β-Galaktosidase-exprimierendes Plasmid (pcDAN3-CMV-βGAL). 48 Stunden nach Transfektion wurden die transfizierten Zellen lysiert und die LAL-Aktivität bezogen auf den Proteingehalt der Zelle gemessen (Abbildung 15).



#### Abbildung 15: Expression des Transgens in HuH7-Zellen

HuH7-Zellen wurden mit 5 µg des Smal geschnittenen ApoAl-hLAL-Fragmentes (ApoAl-hLAL), des hLAL-Fragmentes (hLAL) oder des  $\beta$ -Galaktosidase-Plasmids ( $\beta$ GAL) für eine 10 cm Petrischale subkonfluenter Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 Stunden lysiert und der Proteingehalt bestimmt. Es wurden drei parallele unabhängige Transfektionen durchgeführt und die Aktivität der hLAL mit radioaktiv-markiertem Triolein in Doppelbestimmungen gemessen. Klon 2 wurde zur weiteren Verarbeitung ausgewählt.

Es gab keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei ausgewählten Klonen, sie induzierten alle eine sechs- bis siebenfache Überexpression der LAL im Vergleich zu  $\beta$ -Galaktosidase-transfizierten Zellen und eine dreifache Überexpression im Vergleich zum promotorfreien Konstrukt. Es wurde Klon 2 ausgewählt, im größeren Maßstab Plasmid-DNA präpariert und mit Smal geschnitten. Die verdaute Plasmid-DNA wurde zweimal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) und Chloroform extrahiert und danach mit Ethanol präzipitiert.

## 3.2.3 Generierung und Identifikation von transgenen Mäusen

Die geschnittene Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und in die USA an die Rockefeller Universität, New York, verschickt. Die Generierung der transgenen Mäuse wurde in Kooperation mit Dr. Merkel im Labor von Dr. Breslow durchgeführt. Linearisiertes, aufgereinigtes ApoAI-hLAL-Fragment wurde in befruchtete Eizellen von C57BI/J6-Mäusen mikroinjiziert und die Eizellen in ein Empfängertier transferiert. Insgesamt wurden nach Mikroinjektion 29 Mäuse geboren. Es wurden den drei Wochen alten Mäusen Schwanzspitzenbiopsien (3-5 mm) entnommen, aus den Geweben die genomische DNA isoliert und diese nach Hamburg geschickt. Bei zweien von ihnen wurde eine Integration des Transgens ApoAI-hLAL nachgewiesen. Die Mäuse wurden als Founder bezeichnet (Abbildung 16). Die Genotypisierung, also der Nachweis der Genintegration, wurde mittels PCR durchgeführt. Es wurden Oligonukleotide verwendet, die im Promotor (ApoAI MF) und in der humanen LAL (hLAL RS3) liegen, so dass ein 630 bp langes PCR-Produkt amplifiziert wurde.



#### Abbildung 16: Genotypisierung der Founder

Nach Mikroinjektion der ApoAI-hLAL-DNA in befruchtete Eizellen entstanden 29 potentielle Founder-Mäuse. Zur Genotypisierung wurde mittels PCR mit den Primern ApoAI MF und hLAL RS3 ein 630 bp großes Fragment amplifiziert. Die Fragmente wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert. Das Photo ist invertiert dargestellt. Von links nach rechts: M: Molekulargewichtsstandard VI von Roche; Mäuse 1-29; K-: Negativkontrolle ohne DNA; K+: Positivkontrolle: Plasmid pcDNA3-CMV-ApoAI-hLAL; M. Die Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.



#### Abbildung 17: Überprüfung des PCR-Produktes ApoAI-hLAL der Mäuse 21 und 24

Die Restriktionsendonuklease BamHI schneidet spezifisch in der Sequenz der hLAL. Aus den in Abbildung 16 dargestellten PCR-Produkten entstanden nach Verdau zwei Fragmente mit 398 bp und 241 bp. Auftrennung und Darstellung dieser Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid gefärbten 1%igen Agarosegel. Das Photo ist invertiert dargestellt.

Um die Spezifität des PCR-Produktes zu überprüfen, wurde eine Restiktionsanalyse mit BamHI durchgeführt, welches spezifisch in dem hLAL-Fragment schneidet, wie in Abbildung 17 zu erkennen ist.

#### 3.2.4 Etablierung homozygot transgener Mauslinien

Die weiblichen Founder (Mäuse 21 und 24) wurden in den USA mit männlichen C57BI/J6-Mäusen verpaart und Nachkommen (F1-Generation) nach Hamburg geschickt. Die genaue Bezeichnung der Linien ist C57BI/6J-TgN(ApoAI-hLAL)21SH sowie C57BI/6J-TgN(ApoAI-hLAL)24SH. Sie werden im Folgenden mit Linie 21 und 24 abgekürzt. Nach Genotypisierung dieser Mäuse wurden transgene Männchen für die Weiterzucht ausgewählt und mit C57BI/J6-Weibchen verpaart. Über Embryotransfer in pseudoträchtige Weibchen wurde die F2-Generation in die kontrollierte, sterile Tierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE) übernommen. Für die folgende Zucht wurde weiterhin ein transgenes Männchen mit zwei bis drei nichttransgenen C57BI/J6-Weibchen in einem Käfig gehalten und die Nachkommen im Alter von drei Wochen genotypisiert. Vorversuche wurden mit Mäusen der F2-Generation durchgeführt. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Daten unter normaler Diät wurden Mäuse der F3-Generation, für die Diät-Studie Mäuse der vierten Generation (F4) verwendet. Als Kontrolltiere dienten immer Geschwister der transgenen Mäuse aus den gleichen Würfen, so dass alle analysierten Tiere den gleichen genetischen Hintergrund aufwiesen. Die Kontrollmäuse werden im Folgenden mit "wildtyp Mäuse" bezeichnet.

Die Mäuse waren in der Tierhaltung des UKE untergebracht. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen mit 20 °C, 50 % Luftfeuchtigkeit, einem Lichtzyklus von 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit sowie Futter und Wasser *ad libitum* (ssniff ® R/M-H, keimfrei; ssniff, Soest).

## 3.2.5 Generierung eines LAL-spezifischen Antikörpers

Im Rahmen der Arbeit wurde versucht, einen LAL-spezifischen Antikörper zu generieren, um die Expression und die Lokalisierung des Transgens in der Zelle zu analysieren.

Zu diesem Zweck wurde ein Peptid des C-Terminus der hLAL ausgewählt und eine Peptidimmunisierung mit einem Kaninchen bei der Firma Biotrend in Auftrag gegeben (N-WRLYNKIINLMRKYQ). Dort wurde nach Synthese und Kopplung des Peptids an KLH ein Kaninchen mit 50–300 µg Antigen immunisiert. Nach drei weiteren Immunisierungen nach ein, zwei und vier Wochen wurde das Serum des Tieres sowie ein durch Affinitätschromatographie aus einem Teil des Serums gereinigter Antikörper geliefert und ausgetestet. Die Affinitätsaufreinigung erfolgte mit dem Cterminalen Peptid, welches zur Immunisierung eingesetzt wurde.



#### A. Polyklonales Serum

**B.** Gereinigter Antikörper

Abbildung 18: Westernblotanalyse mit einem hLAL-spezifischen Antikörper

Es wurden jeweils 50 µg Zellproteine bzw. 2,5 µg gereinigte, mit einem His-Tag versehene hLAL pro Bahn über eine 10%ige SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulose Membran, wurden mit A. dem polyklonalen Serum (1:1000) und B. mit dem affinitätsgereinigten Antikörper (1:1000) detektiert. Die Affinitätsaufreinigung erfolgte mit dem C-terminalen Peptid, welches zur Immunisierung eingesetzt wurde. MEF: murine embryonale Fibroblasten; hF: humane Fibroblasten; WDF: Fibroblasten eines Wolman Patienten; TDF: Fibroblasten eines Tangier Patienten; hLe: humane Leber; tg: transgen; wt: wildtyp

Die LAL besteht aus 327 Aminosäuren, das errechnete Molekulargewicht liegt bei 42,4 kDa. Bei der Reinigung der humanen LAL aus Lebergewebe wurde ein Molekulargewicht von 56 kDa in der SDS-PAGE registriert (Ameis et al 1994). Das polyklonale Serum erkannte (Abbildung 18 A) die gereinigte, in Insektenzellen synthetisierte rekombinante humane LAL, sowie eine etwas größere Bande (ca. 56 kDa) in den embryonalen Mausfibroblasten und in der transgenen Leber. Eine etwas schwächere Bande fand sich in der wildtyp murinen und humanen Leber. In der Westernblotanalyse mit dem affinitätsgereinigten Antikörper (Abbildung 18 B) wurde die gereingte rekombinante LAL nicht mehr detektiert, allerdings zeigte sich eine dominante Bande in den Leberproben, wobei wie zu erwarten das Signal in der LALüberexprimierenden Maus stärker war, als in der Kontrollmaus.

Der Antikörper wurde dann in der Immunfluoreszenz eingesetzt und ausgetestet. Hierfür wurden humane Hepatomazellen mit einem hLAL-transduzierenden Adenovirus (Ad-CMV-hLAL) oder zur Kontrolle mit einem β-Galaktosidase-transduzierenden Adenovirus (Ad-CMV-βGAL) infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenz mit dem affinitätsgereinigten Antikörper durchgeführt.

In Abbildung 19 ist eine einzelne Zelle mit dem LAL-Antikörper punktuell angefärbt, andere, nichtinfizierte Zellen, nicht. Dies spricht bei einer niedrigen Infektionsrate für eine spezifische Detektion der LAL in den Lysosomen. In Zellen, die mit einem  $\beta$ -Galaktosidase-transduzierenden Adenovirus (Ad-CMV- $\beta$ Gal) infiziert waren, wurde kein Signal des LAL-spezifischen Antikörpers detektiert (nicht gezeigt). In Ad-CMV- $\beta$ GAL-infizierten Zellen befindet sich das exprimierte Protein im Kern und wurde dort durch einen spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase Antikörper detektiert (Abbildung 19 rechts).



grün: LAL-spezifischer Antikörper Cy2 gekoppelter 2. Antikörper blau: Filipin-Färbung

β-Galaktosidase-spezifischer Antikörper Cy2 gekoppelter 2. Antikörper Filipin-Färbung

#### Abbildung 19: Immunfluoreszenz von Ad-CMV-hLAL und Ad-CMV-βGAL infizierten HuH7-Zellen

Humane Hepatomazellen HuH7 wurden mit dem Adenovirus Ad-CMV-hLAL (links) oder dem Adenovirus Ad-CMV-βGAL (rechts) infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenz mit dem affinitätsgereingten LAL-Antikörper (1:50) oder dem polyklonalen βGAL-Antikörper (1:250) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit einem Cy2-konjugierten Antikörper gegen IgG des Kaninchens. Das Cholesterin der Zelle wurde mit dem Farbstoff Filipin angefärbt.

# 3.3 Physiologische Charakterisierung der *in vivo* Überexpresssion der lysosomalen sauren Lipase

Die Integration des Transgens in das Genom erfolgt zufällig. Es muss zunächst also ausgeschlossen werden, dass die Integration weder eine physiologische Störung (z. B. durch Integration in ein anderes Gens) verursacht hat, noch, dass die Integration an einer "stillen Stelle" erfolgte, d. h., dass es trotz der Integration nicht zu einer Expression des Transgens kommt.

Phänotypisch unterschieden sich die transgenen Mäuse beider Linien nicht von ihren nichttransgenen Geschwistern: Größe, Körpergewicht, Entwicklung des Gewichts mit dem Alter und Fortpflanzungsverhalten waren unverändert. Bei makroskopischer Betrachtung der inneren Organe fielen einschließlich der Fettverteilung keine Unterschiede auf. Bei Kreuzung mit dem Wildtyp entstanden nach der Mendel'schen Regel etwa 50 % transgene Tiere, das Transgen hat somit keinen toxischen Einfluss auf die Embryonalentwicklung. Um weiterhin ausschließen zu können, dass mögliche Unterschiede zwischen transgenen und Kontrolltieren nur auf die Genomintegration zurückzuführen sind, wurde für einen Teil der Experimente (LAL-Aktivität; Plasmalipoproteinprofil) mit beiden Linien weitergearbeitet, alle anderen Experimente wurden nur mit der Line 24 durchgeführt.

## 3.3.1 mRNA-Expression der humanen und murinen LAL

Es wurde die Transkription des Transgens mittels Echtzeit-PCR untersucht. Es sollte zum einen geklärt werden, ob eine Expression des humanen Transgens stattfindet und zum anderen, ob die Expression des Transgens die murine LAL beeinflusst.

## 3.3.1.1 Etablierung der reversen Transkription und der PCR

Um zwischen der endogenen murinen und der humanen transgenen mRNA unterscheiden zu können, wurden Primer ausgewählt und getestet, die trotz der großen Sequenzidentität von 75 % (95 % Ähnlichkeit) zwischen Maus und Mensch unterscheiden können (Du et al. 1996). Es wurde ein "Forwardprimer" (mLAL/hLAL F) gewählt, welcher homolog zur Sequenz beider Spezies ist, während der "Reverseprimer" nur eine Spezies erkennt und für die Spezifität verantwortlich ist (mLAL R1 und hLAL R2).

Die Etablierung der RT-PCR und Überprüfung der Primer wurden zunächst in einem Zellkultursystem durchgeführt. Hierfür wurden embryonale Mausfibroblasten MEF1 mit dem Plasmid pcDNA3-CMV-ApoAI-hLAL (hLAL) transfiziert und nach 24 Stunden die RNA aus diesen Zellen isoliert. Als Kontrolle wurde mit einem  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden Plasmid transfiziert ( $\beta$ GAL).
Α.



#### Abbildung 20: Spezifität der Primer für die murine LAL

Transfektion mit 5 μg pcDNA3-CMV-ApoAI-hLAL (hLAL) bzw. pcDNA3-CMV-βGAL (βGAL) für 10 cm Petrischalen subkonfluenter MEF1-Zellen. Die Zellen wurden nach 24 Stunden lysiert und die RNA isoliert. Es wurden 2 μg RNA revers transkribiert und 1/30 der gewonnenen cDNA für die PCR mit spezifischen Primern eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde RNA vor der reversen Transkription sowie nur Wasser als Matrize (Template) für die PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Photos sind invertiert dargestellt. A.: Kontroll RT-PCR mit spezifischen Primern der 18S ribosomalen RNA zur Überprüfung der Qualität der cDNA. Hierfür wurden die Primer18S F und 18S R verwendet, Produkt: 615 bp. B.: RT-PCR der hLAL und mLAL. Hierfür wurden Primerpaare verwendet, die spezifische die murine LAL (mhLAL F/mLAL R1) oder die humane LAL (mhLAL F/mLAL R2). Beide Produkte sind 212 bp groß.

Die Isolierung der RNA sowie die nachfolgende reverse Transkription in cDNA und die abschließende PCR wurden wie beschrieben durchgeführt. Es wurde immer die entstandene cDNA durch Amplifikation eines "Housekeeping"-Genes überprüft. Hierfür wurde die 18S ribosomale RNA oder das Gen der Porphobilinogen Deaminase (PBGD) (Fink et al. 1998) ausgewählt. Sowohl in transfizierten als auch in nichttransfizierten Zellen konnte das Kontrollgen amplifiziert werden, nicht jedoch wenn nur RNA oder Wasser als Matrize (Template) vorlag. Eine Kontamination mit genomischer oder sonstiger Fremd-DNA konnte somit ausgeschlossen werden (Abbildung 20 A).

Das mausspezifische Primerpaar amplifiziert sowohl in hLAL-transfizierten Zellen, wie auch in nichttransfizierten MEF-Zellen ein Produkt (Abbildung 20 B, linke Hälfte), während das humanspezifische Primerpaar nur in transient transgenen Zellen ein Produkt erkennt (Abbildung 20 B, rechte Hälfte). Somit konnte auf eine Spezifität ohne Kreuzreaktivität der murinen Primer geschlossen werden. Um eine Kreuzreaktivität des murinen Primerpaars mit der humanen cDNA auszuschließen, wurde außerdem, wie in Abbildung 21 dargestellt, eine PCR mit dem pcDNA3-CMV-ApoAl-hLAL-Plasmid als Matrix durchgeführt. Wie erwartet wurden durch die humanen Primer nur die hLAL amplifiziert.



#### Abbildung 21: Spezifität der Primer für die humane LAL

Als Matrix für die PCR diente das Plasmid pcDNA3-CMV-hLAL. Als Positivkontrolle wurden mit dem Primerpaar ApoAIM F/hLAL-RS3 ein 620 bp Produkt amplifiziert. Die maus- umd humanspezifische Amplifikation erfolgte mit den Primern mhLAL F/mLAL R1 und mhLAL F/hLAL R2. Die PCR-Produkte wurden über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Das Photo ist invertiert dargestellt.

#### 3.3.1.2 RNA-Isolierung aus Darm und Leber

Die mRNA-Expression des Transgens wurde in der Leber von je drei Männchen und drei Weibchen analysiert. Um die Leberspezifizät zu überprüfen, wurde in den transgenen Tieren außerdem die Expression der hLAL im Darm gemessen. Die zur cDNA-Synthese verwendete RNA ist in Abbildung 22 nach gelelektrophoretischer Trennung dargestellt. Während die RNA-Präparation aus der Leber keine Schwierigkeiten machte (Abbildung 22 A), war die Isolierung aus dem Darm (Abbildung 22 B) problematischer, da RNasen in diesem Gewebe sehr konzentriert vorliegen und oft nicht vollständig inhibiert werden können. Da bei der Messung der mRNA-Expression immer auf einen internen Standard (PBGD) normiert wird, werden Konzentrationsunterschiede der RNA zwischen den Proben normalisiert und spielen keine Rolle.

# A. Leber

B. Darm





Maus- M 9 11 13 14 17 18 19 20 21 22 30 32 nummer



#### Abbildung 22: Gereinigte RNA aus Leber und Darm

Die RNA wurde aus dem Gewebe (A.: Leber; B.: Darm) nach der in Material und Methoden beschriebenen Methode aufgereinigt und photometrisch die Konzentration bestimmt. Zur Darstellung wurden 5 µg über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Photos sind invertiert dargestellt.

#### 3.3.1.3 Standardisierung der Echtzeit-PCR

Bei der Echtzeit-PCR wird die exponentielle Vervielfältigung des PCR-Produktes direkt durch Messung der Fluoreszenz eines in die doppelsträngigen DNA interkalierenden Fluorochroms verfolgt und quantifiziert. Charakteristisches Merkmal dieses Verlaufes und direkt proportional zur ursprünglichen Menge an cDNA (und damit an RNA) ist der Zeitpunkt (Anzahl der Zyklen), bei welcher das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrundrauschen tritt und in die lineare Phase übergeht. Dieser Punkt wird der "Treshold Cycle" (Ct) genannt und zur Auswertung der PCR herangezogen. Je höher die Menge an Ausgangsmaterial ist, desto kleiner ist der Ct-Wert.

Es wurde die Methode der relativen Quantifizierung nach Johnson et al angewandt (Johnson et al. 2000). Es gibt drei verschiedene Arten der Standardisierung und Evaluierung von Echtzeit-PCR-Daten: die Methode der absoluten Standardkurve, der relativen Standardkurve und der komparativen Ct-Werte. Bei der Validierung mit einer absoluten Standardkurve kann auf die Anzahl der mRNA-Transkripte zurückge-

rechnet werden; sie setzt eine in vitro Transkription mit anschließender Quantifizierung der mRNA-Transkripte, welche für die Standardkurve eingesetzt werden, voraus. Bei der Methode der relativen Standardisierung wird eine Standardkurve mit definierten Mengen an Gesamt-RNA erstellt, die relative Menge an einer spezifischen RNA verschiedener Proben kann verglichen werden, es kann aber nicht auf die Anzahl der mRNA-Transkripte zurückgerechnet werden. Bei der vergleichenden Ct-Methode entfällt die Erstellung einer Standardkurve, die Ct-Werte werden über eine Gleichung, welche die exponentielle Amplifikation einer PCR und die Anzahl der Zyklen berücksichtigt, in eine Anzahl an Zielmolekülen zurückgerechnet. Diese Methode berücksichtigt nicht, wie die der relativen Standardisierung, die Effizienz der PCR-Reaktion, die je Primerpaar sehr divergieren kann. In dieser Arbeit wurde eine relative Standardisierung mit einer Verdünnungsreihe Gesamt-RNA einer transgenen Maus durchgeführt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit fünf verschiedenen Konzentrationen (8; 2; 0,5; 0,125 und 0,03125 µg RNA) Gesamt-RNA Menge hergestellt. Diese wurden alle gleichermaßen mit Hilfe der M-MLV und zufälligen Hexameren als Primer ("Random Primer") revers transkribiert. Die daraus gewonnene cDNA wurde zur Standardisierung der drei Primerpaare (hLAL; mLAL und PBGD) genutzt.



#### Abbildung 23: Standardisierung der Echtzeit-PCR für die mLAL, hLAL und PBGD

Es wurde eine Standardreihe mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen (8; 2; 0,5; 0,125 und 0,03125 µg) Gesamt-RNA für die reverse Transkription erstellt. Nach der cDNA-Synthese wurde 1/30 der gewonnenen cDNA für eine PCR mit einem der drei zu standardisierenden Primerpaaren mLAL (mhLAL F/mLAL R1), hLAL mhLAL F/hLAL R2) und PBGD (PBGD F/PBGD R) eingesetzt und der Ct- (Treshhold Cycle) Wert rechnervermittelt bestimmt. Da die PCR eine exponentielle Reaktion ist, wird zur Erstellung einer linearen Standardkurve der Ct- Wert in Abhängigkeit des Logarithmus der eingesetzten RNA-Menge berechnet und dargestellt.

Die hieraus entstandenen Standardgeraden sind charakteristische für die Effizienz und Empfindlichkeit der Amplifizierung der spezifischen PCR-Produkte und sind in Abbildung 23 dargestellt. Der R<sup>2</sup>-Koeffizient nahe eins zeigt eine hohe Linearität und Genauigkeit der Standardisierung für alle drei Primer-Paare.

# 3.3.1.4 mRNA-Expression der humanen transgenen und endogenen murinen lysosomalen sauren Lipase

Die Standardisierung erlaubte das Messen der Leber- und Darmproben der transgenen und der Kontrolltiere. Sowohl die DNA-Synthese wie auch die PCR aller direkt zu vergleichenden Proben wurden mit einem Reaktionsansatz durchgeführt. Eine Rückrechnung der Ct-Werte der einzelnen Proben auf eine relative mRNA-Menge erfolgt durch lineare Extrapolation mit Hilfe der Gleichungen der in Abbildung 23 dargestellten Standardkurven. Nach einer Normalisierung auf das PBDG-Signal ist ein relativer Vergleich der Proben untereinander möglich. Wie in Abbildung 24 dargestellt, wurde die Expression der wildtyp Weibchen auf eins gesetzt.

Abbildung 24 A zeigt, dass die Expression der murinen LAL von der Expression des Transgens unbeeinflusst war. In den männlichen Tieren war die Expression um 50 % höher als in den weiblichen, allerdings waren die Abweichungen zwischen den Tieren so groß, dass eine Signifikanz nicht ermittelt werden konnte. In Abbildung 24 B ist die Expression des Tansgens in der Leber und im Darm dargestellt. Auffällig ist die signifikant, etwa fünffache höhere Expression in der Leber der Männchen im Vergleich zur weiblichen Leber. Des Weiteren ist die Leberspezifität des gewählten Promotorfragmentes dargestellt; eine Expression im Darm, sonst wichtiges Synthesegewebe des Apo A-I, ist kaum bis gar nicht nachweisbar.





# B. Expression humaner transgener LAL in Leber und Darm



#### Abbildung 24: Relative Expression der endogenen murinen und der humanen transgenen LAL

Es wurden 0,5 µg Gesamt-RNA mit Hilfe der M-MLV, Random Primer und dNTP's in cDNA umgeschrieben und mit 1/30 der gewonnen cDNA eine Echtzeit-PCR mit den spezifischen Primern für mLAL, hLAL und PBDG durchgeführt. Eine Rückrechnung der Ct-Werte der einzelnen Proben auf eine relative mRNA-Menge erfolgt durch lineare Extrapolation mit Hilfe der in Abbildung 23 dargestellten Standardkurven. Es wurde gegen die RNA-Menge von PBGD normalisiert und die relative Expression der wildtyp Weibchen auf eins gesetzt. Je Gruppe wurden drei Mäuse der Linie 24 analysiert. \*\*\*p < 0,005

# 3.3.2 Aktivität der lysosomalen sauren Lipase in der Leber

Den Mäusen wurde im Alter von 9-12 Wochen nach sechsstündigem Futterentzug und nach *in vivo* Perfusion mit PBS die Organe entnommen.

Um die Expression des Transgens zu messen, wurde die LAL-Aktivität in Leberhomogenaten gemessen. Die natürlichen Substrate der LAL sind Triglyzeride und Cholsterinester, welche mit unterschiedlicher Affinität hydrolisiert werden. Gemessen



wurde der Umsatz von radioaktiv-markiertem Triolein und Cholesterylolein (Abbildung 25).

#### Abbildung 25: Aktivität der humanen LAL in der murinen Leber

Nach Homogenisierung und Lyse von Lebergewebe wurde in den Homogenaten der Proteingehalt bestimmt und mit den radioaktiv-markierten Substraten Triolein und Cholesterylolein die Aktivität der LAL gemessen. Diese wurde auf die Proteinmenge bezogen und ist als mMol freigesetzte Fettsäuren pro Stunde und mg Protein angegeben (mUnits/mg Protein). Für jede Gruppe wurden zwischen fünf und acht Mäuse analysiert. A.: Linie 21: wildtyp Weibchen n=5; transgene Weibchen n=5, wildtyp Männchen n=5; transgene Männchen n=7; B.: Linie 24: wildtyp Weibchen n=8; transgene Weibchen n=5, wildtyp Männchen n=6; transgene Männchen n=5; \*p<0,05; \*\*p<0,005; \*\*\*p<0,001 (wildtyp Mäuse vs. transgene Mäuse).

Es zeigte sich in der Leber der transgenen Mäuse eine deutliche Erhöhung der Enzymaktivität (Abbildung 25). Die Überexpression war bei männlichen Tieren mit einer sieben- bis achtfachen Steigerung doppelt so hoch wie bei den weiblichen Tieren. Im Vergleich zu der mRNA-Transkription des Transgens ist der Unterschied nicht so ausgeprägt (Kapitel 3.3.1.4), aber noch deutlich vorhanden. Es liegt also eine geschlechtsspezifische Regulation des Apo A-I-Promotorfragmentes und somit des Transgens vor.

### 3.3.3 Immunhistologischer Nachweis der lysosomalen sauren Lipase

Für die Charakterisierung der transgenen Mäuse sollte der in 3.2.5 beschriebene Antikörper für die Analyse der Leberproteine eingesetzt werden. Da eine mRNA-Expression des Transgens sowie eine deutlich höhere Aktivität der LAL in Leberhomogenaten nachgewiesen waren, konnte man von einer erhöhten Proteinmenge in der Leber ausgehen. Dies war, wie aus Abbildung 26 ersichtlich, nicht der Fall: der Antikörper markierte eine Bande von etwa 56 kDa, welche in allen Mäusen gleich stark war, unabhängig von der Transkription oder Aktivität der LAL. Gleiches war auch für das polyklonale Serum sowie für beide Linien der Fall (nicht gezeigt).





Wildtyp und transgene Mäuse wurden im Alter von 22 Wochen die Organe nach *in vivo* Perfusion mit PBS entnommen und die Proteine der Leber präpariert. Es wurden jeweils 25 µg Leberproteine pro Bahn und Maus über eine 10% ige SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran, wurden die hLAL mit dem affinitätsgereinigten Antikörper (1:1000) detektiert. Die Affinitätsaufreinigung erfolgte mit dem C-terminalen Peptid, welches zur Immunisierung eingesetzt wurde. Abgebildet ist ein exemplarisches Gel mit jeweils vier Leberproben von vier verschiedenen Mäusen je Gruppe. Die Detektion von Cathepsin D diente der Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Geles.

Da die Proteinexpression der LAL nur nach Überexpression im zellulären System und nicht eindeutig im transgenen Tier detektiert werden konnte, wurde auf die Verwendung des Antikörper zur Charakterisierung der Mäuse verzichtet, insbesondere, da sich die Bestimmung der Proteinaktivität als sehr zuverlässige Methode zur Bestimmung der Transgenaktivität erwies.

# 3.3.4 Fettsäurenzusammensetzung der Leber

Die LAL hydrolysiert Triglyzeride und Cholesterinester und setzt Cholesterin und Fettsäuren frei, welche der Zelle dann für diverse Zwecke (Speicherung, Oxidation, Membranbildung usw.) zur Verfügung stehen. Die Substratspezifität ist je nach veresterter Fettsäure unterschiedlich. Es werden Triglyzeride mit gesättigten Fettsäuren mit höherer Affinität hydrolysiert als Triglyzeride mit ungesättigten Fettsäuren. Außerdem sind Substratunterschiede zwischen der murinen und humanen LAL beschrieben (Groener et al. 2000). Es erschien also möglich, dass es zu einer Verschiebung des Fettsäurenmusters in der Leber kommt.



### B. Männchen



#### Abbildung 27: Fettsäuremuster der Leber in transgenen und wildtyp Mäusen

20-30 mg Leber wurden homogenisiert und nach Zugabe des internen Standards Heptadekansäure die Lipide zweimal nach "Folch" extrahiert (Methanol: Chloroform 2:1). Nach Hydrolyse und Methylierung wurden die Fettsäuren gaschromatographisch aufgetrennt. Die Verbindungen wurden im Flammenionisations-Detektor registriert und mit der vorhandenen Software identifiziert und quantifiziert. Es wurden je Gruppe fünf Mäuse der Linie 24 analysiert und in Doppelbestimmungen gemessen. A.: hepatisches Fettsäuremuster in weiblichen Mäusen, B.: hepatisches Fettsäuremuster in männlichen Mäusen

Um Unterschiede im Fettsäuremuster untersuchen zu können, wurden diese gaschromatographisch analysiert. Nach Transesterifizierung wurden die Fettsäuren mittels Methanolyse in ihre Methylester überführt (Lepage & Roy 1986). Aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen mit der stationären Phase konnten die Fettsäuren anhand ihrer Retentionszeit identifiziert und quantifiziert werden. In Abbildung 27 ist das Fettsäuremuster der Mauslebern nach Geschlecht getrennt dargestellt.

Palmitin-, Linol- und Ölsäure machen den Hauptanteil der Fettsäuren einer Mausleber aus. Stearin und Arachidonsäure machen zusammen etwa 20 % der Fettsäuren aus, während die Vaccen- und die Palmitoleinsäure nur in kleineren Mengen vorkommen. Bei den transgenen Weibchen nahm der Anteil einiger Fettsäuren signifikant ab, (Linol- und Ölsäure um je etwa 20 %). Interessanterweise wurde bei den Männchen ein gegenteiliger Effekt beobachtet, der Gehalt an Fettsäuren der transgenen Leber war leicht erhöht, der deutlichste Anstieg war wiederum bei der Palmitinsäure zu verzeichnen. Insgesamt war der Fettsäuregehalt der weiblichen Leber höher als der der männlichen Leber (Abbildung 28).



Abbildung 28: Gesamt-Fettsäuregehalt der Leber in transgenen und wildtyp Mäusen Die in Abbildung 27 einzeln abgebildeten Fettsäuren wurden zu einer Gesamtmenge summiert.

#### 3.3.5 Plasmalipide und Plamalipoproteinprofil

Den Mäusen wurde im Alter von 9-12 Wochen nüchtern (nach sechsstündigem Futterentzug) Blut aus dem retroorbitalen Venenkomplex entnommen und zur Verhinderung der Gerinnung 1/100 Volumen 0,5 M EDTA hinzugegeben. Die Proben wurden bei 13000 rpm zentrifugiert, um das Fibrinogen zu sedimentieren und mit dem gewonnenen Serum gearbeitet. Die Plasmalipide wurden alle enzymatisch mit Kits von Roche oder Wako nach Herstellerangaben bestimmt. Cholesterin, Freies Cholesterin, Triglyzeride und Phopholipide lagen in transgenen und nichttransgenen Tieren in gleichen Mengen vor (siehe Anhang, Tabelle 6).

Um eine mögliche Verschiebung der Lipoproteinverteilung zu untersuchen, wurde ein Lipoproteinprofil der Plasmalipoproteine nach Rudel et al. (Rudel et al. 1986) erstellt.

VLDL, LDL und HDL wurden durch Gelfiltration an Superose-6 mit einer "Fast Protein Liquid Chromatography" (FPLC) getrennt und über ihren Gehalt an Cholesterin und Triglyzeriden identifiziert und quantifiziert.



Abbildung 29: Plasmalipoproteinprofil von transgenen und wildtyp Mäusen

Zur Auftrennung der Lipoproteine im Serum der Mäuse wurde eine FPLC Superose 6 Säule von Pharmacia verwendet und über eine FPLC betrieben. Es wurden 100 µl Plasma je Maus über die Säule gegeben und in 500 µl Fraktionen eluiert. In diesen wurde Cholesterin (A) und Triglyzeride (B) in Doppelbestimmungen enzymatisch mit Kits von Roche gemessen. Die Standardisierung erfolgte mit Precinorm von Roche. Je Gruppe wurden fünf Mäuse einzeln analysiert und der Mittelwert gebildet.

Das überwiegende Lipoprotein bei der Maus ist das HDL (über 85 % des Plasmacholesterins), die in den Fraktionen 29-33 eluierte. Die VLDL konzentrierte sich in den Fraktionen 15-17, die LDL in den Fraktionen 23-27. Wie in Abbildung 29 deutlich wird, hatte die Überexpression der humanen LAL keinen Einfluss auf die Zusammensetzung an Lipoproteinen im Plasma. Dies galt auch für die Linie 21 (Anhang, Tabelle 6).

# 3.4 Physiologische Charakterisierung der *in vivo* Überexpression der lysosomalen sauren Lipase unter einer westlichen Diät

Die transgenen Mäuse zeigten trotz verstärkter LAL-Aktivität in der Leber (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) keine Veränderung der Plasmalipide (Kapitel 3.3.5). Es zeigte sich eine leichte Verschiebung des Fettsäuremusters in der Leber dieser Tiere (Kapitel 3.3.4) ohne dass sich der Gesamtgehalt an Triglyzeriden, freien oder veresterten Cholesterin in der Leber veränderte (nicht gezeigt).

Für den folgenden Teil der Arbeit wurden deshalb die Auswirkungen der beschriebenen Überexpression der LAL im Kontext einer erhöhten Fett- und Cholesterinzufuhr untersucht. Eine Diät, welche sowohl reich an Triglyzeriden und Cholesterin ist, wird in der englischsprachigen Literatur eine "westerntype diet" genannt. Im Folgenden wird für die hier eingesetzte Diät der Begriff einer westlichen Diät verwendet.

In der Atheroskleroseforschung mit Mäusen wird einer cholesterinreichen Diät zusätzlich 0,5 % des Gallensalzes Natriumcholat zugesetzt. Dieses erhöht zwar nicht die Cholesterinabsorption im Darm, inhibiert jedoch die Aktivität der Cyp7A1, dem ersten und limitierenden Enzym der Gallensäuresynthese (Ikemoto et al. 1997; Reihner & Stahlberg 1996). Die Cholesterinabgabe aus der Zelle über die Galle ist ein wichtiger Regulationsmechanismus der Cholesterinhomöostase und wird durch Cholat in unphysiologischer Weise gestört. Nach Diäten von 10-18 Wochen dieser Diät akkumulieren diese Mäuse in der Leber eine größere Menge als das hier gemessene Cholesterin (Nishina et al. 1993a; Nishina et al. 1993b; Nishina et al. 1990). Es wurde auf die Zugabe von Cholat zur fettreichen Diät verzichtet, um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen und eine lipidreiche Ernährung, wie sie in industrialisierten Ländern weit verbreitet ist, zu imitieren.

Aus zuchttechnischen Gründen wurden für diesen Versuch weibliche Tiere verwendet. Diese wurden im Alter von zwölf Wochen für zehn Wochen mit einer fettreichen Diät gefüttert. Das Futter hatte die in Tabelle 5 dargestellte Zusammensetzung und war den Tieren zu jeder Zeit frei zugänglich.

Bestandteil	Anteil in %	
Sucrose:	39,896	
Casein:	20	
Kornstärke:	10	
Zellulose:	6	
Mineral- und Vitaminmix:	6 (5+1)	
DL-Methionin:	0,2	
Calcium Carbonat:	0,4	
Ethoxyquin (Antioxidanz):	0,004	normale Diät
Kornöl:	1 ]	3 % Fettanteil
Kakaobutter:	15 🖯	
Cholesterin:	1,5	kein Cholesterin

#### Tabelle 5: Zusammensetzung der westlichen Diät

Die hauptsächliche Fettquelle war Kakaobutter, deren Fettsäuren zu 77 % ungesättigt, 6 % einfach und 15 % mehrfach ungesättigt sind (Schaefer 2002). Außerdem wurde dem Futter 1,5 % Cholesterin zugefügt. Die normale Haltungsdiät besteht aus einem 3%igem Fettanteil und wird ohne Cholesterin hergestellt.

Direkt vor der zehnwöchigen Diät wurde den Mäusen im Alter von zwölf Wochen nach sechsstündigem Futterentzug unter Ethernarkose Blut aus dem retroorbitalen Venenkomplex entnommen. Anschließend erfolgte die Aufteilung in Gruppen und die Versorgung mit dem entsprechenden Futter. Die Mäuse wurden einmal wöchentlich gewogen. Nach den zehn Wochen Diät wurde den Mäusen erneut das Futter entzogen und nach sechs Stunden Blut und Organe entnommen. Wie in anderen Studien beobachtet, zeigten die Tiere während der zehnwöchigen Diät die gleiche Entwicklung (Abbildung 30) des Körpergewichts, unabhängig von der Ernährung (DeLamatre et al. 1996).



#### Abbildung 30: Gewichtskinetik der Mäuse zwischen 12 und 22 Wochen

Im Alter von 12 Wochen wurde ein Kollektiv an weiblichen Mäusen in vier Gruppen eingeteilt. In jeder Gruppe befanden sich zwischen fünf und acht Mäuse: Gruppe 1: wildtyp Mäuse normale Diät n=6; Gruppe 2: transgene Mäuse normale Diät n=8; Gruppe 3: wildtyp Mäuse westliche Diät n=9; Gruppe 4: transgene Mäuse westliche Diät n=7. Die Mäuse wurden wöchentlich gewogen. Dargestellt ist das Körpergewicht in g in Abhängigkeit des Alters in Tagen sowie eine durch lineare Regression ermittelte Trendlinie.

#### 3.4.1 Plasmalipide und Plasmalipoproteinprofil

Dem ausgewählten Kollektiv an Tieren wurde vor und nach der Diät Blut entnommen. Vor der Diät sind schon, wie unter 3.3.5 beschrieben, keine Unterschiede der Plasmalipide festgestellt worden. Nach einer zehnwöchigen fett- und cholesterinreichen Diät stieg der Cholesterinspiegel im Plasma um etwa 20 % von 79,9  $\pm$  8,3 auf 98,6  $\pm$  9,1 mg/dl. Gleiches galt für das freie Cholesterin (13,3  $\pm$  1,9 auf 17,1  $\pm$  2,1 mg/dl) sowie die Cholesterinester, (66,5  $\pm$  7,3 auf 81,5  $\pm$  5 mg/dl) während die Triglyzeride um 25 % sanken (40,3  $\pm$  11,3 auf 27,3  $\pm$  3). Diese Werte entsprechen der Literatur (Nishina et al. 1993a; Nishina et al. 1993b; Nishina et al. 1990; Ishida et al. 1991). Dies war in wildtyp (Abbildung 31 A) und in transgenen Mäusen der Fall (nicht gezeigt, siehe Anhang Tabelle 7).



# A. Wildtyp Mäuse vor und nach westlicher Diät





#### Abbildung 31: Plasmalipide von wildtyp Mäusen vor und nach einer westlichen Diät

Die Blutentnahme sowie die Lipidbestimmung erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Je Gruppe wurden zwischen fünf und neun weibliche Mäuse analysiert: wildtyp Mäuse normale Diät n=5; transgene Mäuse normale Diät n=8; wildtyp Mäuse westliche Diät n= 9; transgene Mäuse westliche Diät n=7. A.: Plasmalipide von wildtyp Mäusen vor und nach Diät; B.: Plasmalipide in wildtyp und transgenen Mäusen nach zehnwöchiger westlicher Diät; \*\*p<0,005 (wildtyp Mäuse normale Diät vs. transgene Mäuse westliche Diät).

Der diätinduzierte Anstieg des Cholesterinsspiegels und das Absinken des Triglyzeridspiegels war in den transgenen Tieren leicht verstärkt, wie bei einem direkten Vergleich beider Gruppen deutlich wird (Abbildung 31 B). Bei der Analyse der Lipoproteinen in der Gelfiltration fand sich diese Erhöhung des Cholesterins in der VLDL wieder. Abbildung 32 A zeigt ein Lipoproteinprofil, bei dem Plasma von jeweils fünf Mäusen gepoolt und über die FPLC aufgetrennt wurde.



#### Abbildung 32: Plasmalipoproteinprofil von wildtyp und transgenen Mäusen nach westlicher Diät

Zur Auftrennung der Lipoproteine im Plasma der Mäuse wurde eine Superose 6 Säule von Pharmacia verwendet und mit einer FPLC betrieben. Hierfür wurde Plasma über die Säule gegeben und in 500 µl Fraktionen eluiert. In diesen wurde Cholesterin in Doppelbestimmungen gemessen. A: Gepooltes Plasma. Es wurde Plasma von fünf Mäusen zu gleichen Teilen gepoolt, 200 µl über die Säule gegeben und in den Fraktionen Cholesterin in Doppelbestimmungen gemessen. B: Einzelne Plasmen. Um die VLDL-Fraktion genauer charakterisieren und statistisch auswerten zu können, wurden je Gruppe 75µl von je fünf Mäusen einzeln vermessen und anschließend die Mittelwerte gebildet. Das Cholesterin wurde mit einer auf Fluoreszenz basierenden Methode gemessen (Amplex Red Cjolesterin Assay Kit der Firma Molecular Probes), welche deutlich empfindlicher als der in A verwendete Cholesterin Kit (Roche) ist. Zur Standardisierung wurden Precinorm der Firma Roche verwendet.

Der VLDL-Peak (Fraktion 16-18) war im Vergleich zu den normal gefütterten Mäusen deutlich angestiegen. Zusätzlich stieg die HDL ebenfalls leicht an (Fraktionen 26-30). Während der Anstieg der HDL für beide Tiergruppen gleich war, fand in den transgenen Tieren eine Steigerung des Cholesteringehalts in der VLDL statt. Um die

VLDL-Fraktionen genauer charakterisieren und statistisch auswerten zu können, wurden für fünf Mäuse je Gruppe einzelne Lipoproteinprofile mit 75 µl Serum erstellt und das Cholesterin der Fraktionen mit einer sensitiveren, auf Fluoreszenz basierende Methode gemessen. Sie ist deutlich empfindlicher als die für die gepoolten Plasmen angewandte Methode. Hier zeigte sich, dass der Anstieg der VLDL im Plasma von transgenen Mäusen signifikant höher als in den Kontrolltieren war (Abbildung 32 B).

### 3.4.2 Auswirkungen der westlichen Diät auf die Leber

#### 3.4.2.1 Lipide

Von den Lebern wurden 5 µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Unter der fett- und cholesterinreichen Diät lagerte die Leber deutlich mehr Neutralfette ein, wie in der Fettrotfärbung (Abbildung 33) deutlich zu sehen ist. Es fand eine starke Vakuolisierung der Zellen durch Lipidtröpfchen statt, die in der Eosin/Hämalaun Färbung als ungefärbte Zellstruktur zu sehen ist. Hiervon zu unterscheiden sind die auch in der Fettrotfärbung sichtbaren "Risse", bei denen es sich um Kryoartefakte handelt, die durch Kristallisationen während des Einfrierens entstehen. Die transgene Leber einer diätgefütterten Maus schien in der Fettrotfärbung der Abbildung 33 etwas mehr neutrale Fette (Cholesterinester und Triglyzeride) einzuspeichern. Dies war nur tendenziell zu beobachten und nicht in allen geschnittenen Lebern deutlich zu erkennen. Um quantitative Aussagen über den Lipidgehalt der Leber machen zu können, wurde deren Gehalt enzymatisch bestimmt.



Färbung

Färbung

# Abbildung 33: Kryoschnitte der Leber von wildtyp und transgenen Mäusen nach normaler und

#### westlicher Diät.

Die Mäuse wurden nach einem sechsstündigen Nahrungsentzug narkotisiert, die Organe nach in vivo Perfusion mit PBS sofort in Isopentan, welches in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurde, eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Die 5 µm dicken Kryoschnitte wurden nach Fixierung mit 50% igem Ethanol bzw. Methanol mit Fettrot (Neutralfette)/Hämalaun (Kern) oder Eosin (Zytoplasma)/Hämalaun (Kern) gefärbt.

Die Lipide der Leber wurden nach Homogenisierung und Lyse nach einem modifizierten Protokoll von Carr et al. extrahiert und die Lipide enzymatisch gemessen (Carr et al 1993). Abbildung 34 zeigt den erwarteten Anstieg der Neutralfette, die unter der westlichen Diät in der Leber eingespeichert wurden.



# Abbildung 34: Lipidgehalt der Lebern transgener und wildtyp Mäuse unter normaler und unter westlicher Diät

50-80 mg der Lebern wurden homogenisiert und lysiert. Die Lipide wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, enzymatisch in Doppelbestimmungen gemessen und auf das Gewicht der Leber bezogen. Je Gruppe wurden zwischen fünf und neun weibliche Mäuse analysiert: wildtyp Mäuse normale Diät n=5; transge Mäuse normale Diät n=8; wildtyp Mäuse westliche Diät n=9; transgene Mäuse westliche Diät n=7; \*p<0,05; \*\*p<0,005; \*\*\*p<0,0001 (wildtyp Mäuse Diät vs. transgene Mäuse Diät).

Das freie Cholesterin stieg ebenfalls deutlich an, während der Anteil an freien Fettsäuren und Phospholipiden von der Diät unbeeinflusst waren. Die transgene Leber zeigte signifikant höhere Werte aller Lipide mit Ausnahme der Phospholipide. Ein Anstieg um 30 % konnte beim Cholesterin und den Triglyzeriden beobachtet werden, freie Fettsäuren und freies Cholesterin waren in den transgenen Lebern um etwa 50 % erhöht. Die Erhöhung der Lipide spiegelte sich auch im Ölsäuregehalt der Leber wieder (Abbildung 35). Dieser wurde nach Hydrolyse der Lipide gaschromatographisch ermittelt. Wie schon in Abbildung 27 gezeigt, ist der Ölsäuregehalt unter normaler Diät in transgenen Weibchen erniedrigt im Verhältnis zu den wildtyp Tieren. Nach Fütterung einer westlichen Diät stieg der Gehalt der Ölsäure über das Niveau in den nichttransgenen Mäusen hinaus an. Sie ähneln in diesem Fall den männlichen Mäusen unter einer normalen Diät.



# Abbildung 35: Ölsäuregehalt der Leber von wildtyp und transgenen Mäusen mit normaler oder westlicher Diät

20-30 mg Leber wurden homogenisiert und nach Zugabe des internen Standards Heptadekansäure die Lipide zweimal nach "Folch" extrahiert (Methanol: Chloroform 2:1). Nach Hydrolyse und Methylierung wurden die Fettsäuren gaschromatographisch aufgetrennt. Die Verbindungen wurden im Flammenionisations-Detektor registriert und mit der vorhandenen Software identifiziert und quantifiziert. Es wurden je Gruppe fünf Mäuse analysiert und in Doppelbestimmungen gemessen.

#### 3.4.2.2 Proliferation der Peroxisomen

In Nagetieren, zu denen die hier untersuchten Mäuse gehören, wird eine Proliferation der Peroxisomen durch die Transkriptionsfaktoren PPAR vermittelt. Diese werden u. a. durch den Fettsäurespiegel der Zelle reguliert. Da in der Leber der transgenen Tiere ein erhöhter Fettsäurespiegel im Vergleich zu den Kontrolltieren festzustellen war, wurde die Enzymaktivität der Katalase gemessen, um auf die Proliferation der Peroxisomen Rückschlüsse ziehen zu können. Parallel hierzu wurde die Aktivität der sauren Phosphatase, Markerenzym der Lysosomen, gemessen.

# A. Saure Phosphatase



#### Abbildung 36: Aktivität der sauren Phosphatase und der Katalase in der Leber von wildtyp und

#### transgenen Mäusen unter normaler und unter westlicher Diät

In den Präparationen der murinen Lebern (2.2.10.1) wurde die Aktivität zweier Enzyme bestimmt und auf den Proteingehalt der Leber bezogen. A.: Alkalische Phosphatase: die Aktivität des Enzyms wird durch die photometrische Messung der Umsetzung von p-Nitrophenyl-Phosphat in ein farbiges Produkt bestimmt. Die Standardisierung erfolgte mit gereinigter alkalischer Phosphatase mit definierter Aktivität. B.: Katalase: die Aktivität des Enzyms wird durch die photometrische Messung des Verstoffwechslung und damit Eliminierung des Substrates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemessen. Die Standardisierung erfolgte mit definierter Menge an Katalase, ohne die spezifische Aktivität zu berücksichtigen. Außerdem ist die LAL-Aktivität in der Leber von wildtyp und transgenen Mäusen unter normaler Diät tabellarisch abgebildet (siehe Abbildung 25).

Wie in der Literatur beschrieben (DeLamatre et al. 1996; Flatmark et al. 1988; Neat et al. 1980; Bremer & Norum 1982), war ein Anstieg der Katalaseaktivität unter einer

fett- und cholesterinreichen Diät zu verzeichnen (Abbildung 36). Der Anstieg war in der transgenen Leber deutlicher ausgeprägt, was mit dem erhöhten Spiegel der freien Fettsäuren in der genmanipulierten Leberzelle korrelierte. Die Aktivität der sauren Phosphatase stieg nur leicht unter der Diät, die Lysosomen scheinen von der Diät nicht betroffen zu sein, wobei ein direkter Zusammenhang der Phosphataseaktivität und der Anzahl an Lysosomen in der Literatur nicht beschrieben ist.

# 3.4.2.3 Einfluss auf die Expression von regulatorisch wichtigen Proteinen des Lipidstoffwechsels

Unter einer fett- und cholesterinreichen Diät zeigten sich mit einer Erhöhung der VLDL ein leicht verändertes Lipoproteinprofil der transgenen Mäuse und eine erhöhte Akkumulation der Lipide in der Leber. Um einen Zusammenhang mit der Lipoproteinaufnahme und -synthese, sowie der Fettsäuresynthese und -oxidation in der Leber herstellen zu können, wurde die Expression ausgewählter Lipoproteinrezeptoren, Apolipoproteine sowie die der Schlüsselenzyme der Fettsäuresynthese (FAS) und der peroxisomalen Fettsäureoxidation (ACO) untersucht. In den Abbildung 37 bis Abbildung 40 sind Westernblotanalysen gezeigt. Hierfür wurden aus den Lebern von wildtyp und transgenen Mäusen nach einer zehnwöchigen Diät Proteine aufgereingt und über 8-12%ige Acrylamidgele unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrocellulose Membranen wurden dann diverse Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. Für Proteine, deren Expression in der transgenen Mausleber durch die LAL verändert wurde, sind zwei Gele mit jeweils drei bis vier Leberproben von verschiedenen Mäusen je Gruppe dargestellt. Von Proteinen, deren Expression durch die LAL unbeeinflusst blieb, ist ein exemplarisches Gel dargestellt. Weitere Westernblotanalysen sind im Anhang abgebildet.

#### 3.4.2.3.1 Aufnahme von Lipoproteinen

Die Aufnahme von Apo E-haltigen Lipoproteinen erfolgt zum größten Teil über den LDL-R und das LRP (Brown & Goldstein 1986; Brown & Goldstein 1997). Im Gegensatz zum LRP wird die Expression des LDL-R über die intrazelluläre Cholesterinkonzentration gesteuert. SR-BI ist in den reversen Cholesterintransport zur Leber involviert und ebenfalls cholesterinsensitiv reguliert (Landschulz et al. 1996; Fluiter et al. 1998). Abbildung 37 zeigt eine unveränderte Expression der drei oben genannten Lipoproteinrezeptoren in wildtyp und transgenen Tieren.

# A. LDL-R





Wildtyp und transgenen Mäusen wurden nach zehnwöchiger westlicher Diät im Alter von 22 Wochen die Organe nach *in vivo* Perfusion mit PBS entnommen und die Proteine der Leber präpariert. Es wurden jeweils 10 µg Leberproteine pro Bahn und Maus über eine 10%ige SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es sind exemplarische Gele mit jeweils vier Leberproben von vier verschiedenen Mäusen je Gruppe dargestellt. Die Detektion des rezeptorassoziierten Proteins (RAP) diente der Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels.

#### 3.4.2.3.2 Synthese von Lipoproteinen

Es wurde die Expression der Apolipoproteine E, B und A-I untersucht. Alle werden in der Leber produziert und sind Bestandteil von Lipoproteinen: Apo E und B sind mit der VLDL assoziiert, während Apo A-I das zentrale Apolipoprotein der HDL ist. So-wohl die VLDL-Synthese wie auch die Cholesterinaufnahme in die Leber wird vom intrazellulärem Lipidstatus beeinflusst (Elshourbagy et al. 1985; Dixon & Ginsberg 1993; Dixon et al. 1991; Du et al. 1999; Wang et al. 1997; Tanaka et al. 1993; Srivastava 1996; Mensenkamp et al. 1999; Davidson & Shelness 2000).



#### Abbildung 38: Westernblotanalyse der Apolipoproteine Apo E, Apo B und Apo A-I

Die technische Durchführung erfolgte wie in Abbildung 37 beschrieben. Es sind exemplarische Gele mit jeweils vier Leberproben von vier verschiedenen Mäusen je Gruppe dargestellt. Die Detektion von Cathepsin D, Actin oder RAP diente der Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels.

Die Analyse der von der Leber synthetisierten Apolipoproteine (Abbildung 38) zeigte eine leichte Erhöhung der Apo E-Produktion, was ein Hinweis auf eine erhöhte VLDL-Sekretion der Leber sein könnte, wobei Apo B unverändert blieb. Apo A-I, Proteinkomponente der HDL, war unverändert. Beide Befunde korrelierten mit den Daten aus der FPLC, wo sich ein erhöhter VLDL-Peak im Plasma von transgenen Mäusen gezeigt hatte. Die HDL lag in beiden Tiergruppen im Plasma in gleicher Menge vor.

#### 3.4.2.3.3 Synthese von Lipiden

# A. FAS



#### Abbildung 39: Westernblotanalyse der FAS und des SREBP1

Die technische Durchführung erfolgte wie in Abbildung 37 beschrieben. Es wurden 25 µg pro Spur geladen. Abgebildet sind exemplarische Gele mit jeweils drei Leberproben von drei verschiedenen Mäusen je Gruppe. Die Detektion von RAP diente der Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels.

Ein wichtiges Enzym der Fettsäuresynthese ist die Fettsäure-Synthase, welche Fettsäuren aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA herstellt. Dessen Expression schien in der transgenen Maus, wie in Abbildung 39 A zu sehen ist, stärker zu sein als in der Leber einer normalen Maus. Je nach Energiestatus und Bedarf der Zelle wird die Transkription der FAS über den Transkriptionsfaktor SREBP1c reguliert (Shimano et al. 1997; Sato et al. 1999). Dessen Expression ist im unteren Teil der Abbildung 39 (B) dargestellt. Auch hier war ein in der Tendenz stärkeres Signal zu verzeichnen. Somit könnte der Fettsäuresyntheseweg in der LAL-überexprimierenden Maus stärker aktiv sein.

#### 3.4.2.3.4 Abbau von Lipiden

Die Acyl-CoA-Oxidase katalysiert die Schrittmacherreaktion der peroxisomalen β-Oxidation. ACO wird in der Leber über den Transkriptionsfaktor PPARα und damit über den Fettsäuregehalt reguliert (Schoonjans et al. 1995; Tugwood et al. 1992). Wie in der Abbildung 40 dargestellt, schien eine verstärkte LAL-Aktivität in der Leber zu einer stärkeren Expression der ACO zu führen, da das Signal in der transgenen Maus stärker als im Kontrolltier war.



#### ACO

#### Abbildung 40: Westernblotanalyse der ACO

Die technische Durchführung erfolgte wie in Abbildung 37 beschrieben. Abgebildet sind exemplarische Gele mit jeweils vier Leberproben von vier verschiedenen Mäusen je Gruppe. Die Detektion von Cathepsin D und Actin diente der Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels. Tabellarisch ist außerdem die gemittelte Aktivität der Katalase der beiden Mausgruppen dargestellt (siehe auch Abbildung 36). Ein Antikörper zur Detektion von PPAR stand nicht zur Verfügung.

# 4 Diskussion

# 4.1 Generierung eines transgenen Tiermodells der leberspezifischen Überexpression der lysosomalen sauren Lipase

Es wurden zunächst Vorversuche mit einem von Prof. Ameis (UKE) hergestellten, LAL-exprimierenden Adenovirus zur transienten Überexpression der LAL in Zellkultur durchgeführt. Nach Infektion von Hepatomazellen mit dem Adenovirus Ad-CMVhLAL kam es in den Zellen zu einer zwölffachen Erhöhung der LAL-Aktivität, ohne dass sich jedoch die intrazelluläre Lipidkonzentration änderte. Dies galt auch für Zellen, die einer erhöhten LDL-Konzentration im Medium ausgesetzt waren und zeigt, dass die adenovirale Überexpression zwar in der Lage ist, eine partielle Entspeicherung in Wolman-Fibroblasten innerhalb weniger Tage zu bewirken (Tietge et al. 2001), jedoch keinen Phänotyp in normalen Zellen hervorruft. Um die Folgen einer dauerhaften Überexpression der LAL *in vivo* zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell etabliert.

Durch die Integration zusätzlicher Gene in einen lebenden Organismus können wichtige Erkenntnisse über molekulare Funktionen von Proteinen gewonnen werden. Die Maus ist das am häufigsten verwendete transgene Tiermodell. Die Labormaus hat zahlreiche Vorteile als experimentelles Versuchssystem: sie ist klein und gut unter definierten Umweltbedingungen zu halten. Sie produziert zahlreiche Nachkommen nach kurzer Schwangerschaft und erlaubt damit relativ große Versuchstiergruppen. Sie teilt zudem einige Stoffwechsel- und Entwicklungswege mit dem Menschen. Obwohl die Maus von Natur aus resistent gegenüber atherosklerotischen Veränderungen ist, ist sie das meist verwendete Versuchstier in der Lipoproteinforschung. Die Tiermodelle der Grundlagenforschung sind in der Regel mit medizinischen Fragestellungen verbunden, da die genetische Manipulation zu einem pathologischen Phänotyp führen oder einen Vorteil für den tierischen Organismus darstellen kann. Bei vielen der "großen Volkskrankheiten" handelt es sich um multifaktorielle Erkrankungen (Atherosklerose/koronare Herzkrankheiten, metabolisches Syndrom), bei denen komplexe Zusammenhänge durch Veränderung einer oder mehrere dieser Faktoren im Tiermodell nur Stück für Stück zusammengefügt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden nach der Generierung und der molekularen Charakterisierung von transgenen Mäusen die Auswirkungen einer leberspezifischen Überexpression der LAL auf den Lipidstoffwechsel untersucht. Es ist seit langem durch die Wolman'sche Krankheit bekannt, dass eine Defizienz des Enzyms verheerende Folgen für den humanen Organismus hat; es ist jedoch nicht geklärt, ob eine verstärkte lipolytische Aktivität zu messbaren Veränderungen im Lipidverstoffwechl führt und daraus Folgen für die Zelle oder den Organismus erwachsen.

Da die Leber das zentrale Organ des Fettstoffwechsels ist, wurde ein Mausstamm generiert, der die LAL spezifisch in der Leber überexprimiert. In der Literatur sind verschiedene Promotoren zur Generierung von transgenen Mäusen mit leberspezifischer Expression eines fremden Gens beschrieben, darunter Promotoren der Gene der Phenylalanin-Hydroxylase (Chatterjee et al. 1996; Jackerott et al. 2002), des Apolipoprotein E (Wang et al. 1998), des Antitrypsins (Gay et al. 1997) und des Albumins (Tanaka et al. 1997).

Apo A-I ist das hauptsächliche Strukturprotein der HDL und wird in der Darmmukosa und in der Leber synthetisiert (Zannis et al. 1985; Sastry et al. 1988). Leberspezifische Gene werden durch Promotor/Enhancer-Sequenzen reguliert, welche dicht beieinander liegende so genannte "cis-acting"-Elemente enthalten, die Bindungsstellen für ubiquitäre und spezifische Transkriptionsfaktoren aufweisen. Hierzu gehören Proteine der Familie der hepatischen nukleären Faktoren 1 und 3 aus der Superfamilie der nukleären Rezeptoren sowie "cCAAT enhancer binding proteins" (C/EBP). Der humane Apo A-I-Promotor wurde aufgrund der Promotorstudien von Walsh et al ausgewählt (Walsh et al. 1989) und ein 256 bp langes Fragment, welches für eine leberspezifische Expression essentiell ist, verwendet. Dieser Teil des Promotors des Apo A-I-Gens enthält von Nukleotid -222 bis -110 aufwärts vom Transkriptionsstart einen solchen leberspezifischen Enhancer (Sastry et al. 1988; Widom et al. 1991). Er enthält die drei "cis-acting"-Elemente A (-214-192), B (-169-146) und C (-134-119) und bindet Mitglieder der nukleären Rezeptor-Superfamilie: HNF4, "Apolipoprotein regulatorisches Protein1" (ARP1), RXR sowie die leberspezifischen Faktoren HNFβ, HNFα und C/EBP (Rottman et al. 1991; Widom et al. 1992; Widom et al. 1991; Ladias & Karathanasis 1991; Ge et al. 1994; Harnish et al. 1994; Harnish et al. 1996). Zu Beginn der Arbeit wurde zunächst der für die Leberspezifität notwendige oben beschriebene Enhancer von 256 bp des humanen Apo A-I-Promotors mit der cDNA

der humanen LAL ligiert und kloniert. Das hieraus resultierende ApoAl-hLAL-Fragment wurde erfolgreich auf Funktionalität in einer hepatischen Zelllinie überprüft und zur Absicherung die DNA des Promotors sequenziert. Das Konstrukt wurde anschließend im Labor von Dr. Breslow, USA, zur Generierung von transgenen Mäusen durch Mikroinjektion in fertilisierte Oozyten verwendet. Von den 27 Nachkommen wiesen zwei Mäuse eine genomische Integration des Transgens auf und wurden "Founder" von zwei heterozygot transgenen Mauslinien durch Kreuzung mit C57Bl/6J-Mäusen. Bei der Herstellung von transgenen Tieren durch Mikroinjektion in befruchtete Oozyten ist die Entstehung von Mosaiken ein bekanntes Phänomen, das darauf beruht, dass das Transgen ungleichmäßig während der ersten Zellteilungen verteilt wird und nur in ausgewählten Zellen dieses frühen Entwicklungsstadiums dauerhaft verankert wird (Wilkie et al. 1986). Da das Transgen in etwa 50 % der Nachkommen vererbt wurde und damit dem Mendel`schen Vererbungsgang folgte, konnte ein Mosaik ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung des LAL-Proteins sollte in der Arbeit ein spezifischer Antikörper hergestellt werden. Die Arbeitsgruppe von Du et al. hat 1996 die erfolgreiche Herstellung eines LAL-spezifischen Antikörpers durch Immunisierung mit rekombinanter inaktiver LAL von Kaninchen beschrieben (Du et al. 1996). Da dieser Antikörper nicht zur Verfügung stand, wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Biotrend ein Antikörper hergestellt, der spezifisch den C-Terminus der humanen und murinen LAL erkennen sollte. Das errechnete Molekulargewicht der LAL liegt bei 42,4 kDa, die in der SDS-PAGE ermittelte Größe liegt deutlich höher. Die Differenz wird auf die ausgeprägte N-Glykosylierung der Lipase zurückgeführt (Sheriff et al. 1995; Ameis et al. 1994). Die LAL weist eine Signalseguenz von 27 Aminosäuren an ihrem N-terminalen Ende auf. Die hydrophobe Signalsequenz sorgt für den Transport des Enzyms vom Ribosomen zum Endoplasmatischen Reticulum (ER). Kotranslational wird das naszierende Polypeptid in das ER übertragen und die Signalsequenz abgespalten. Die Lipase weist außerdem ein vermutetes Propeptid mit 49 Aminosäuren auf. Propeptide dienen vermutlich der Proteinstabilisierung, leisten einen Beitrag zur korrekten Faltung und stellen ein zusätzliches Signal für die Proteinsortierung dar. Die Abspaltung des Propeptids erfolgt erst im Prälysosom (Kornfeld 1986). Dies erklärt möglicherweise, dass nach einer Aufreinigung der LAL aus humaner Leber zwei aktive Formen der LAL von 55 kDa und 41 kDa erhalten werden (Ameis et al. 1994). Diese Ergebnisse weichen von denen anderer Autoren ab, die Molekularmassen von 29 kDa und 58 kDa für die LAL beschrieben haben (Warner et al. 1981; Sjoberg et al. 1987; Anderson & Sando 1991). In den in Abbildung 18 dargestellten Westernblots wurde in den Leberproben ausschließlich eine Bande bei etwa 55-58 kDa detektiert. Es ist möglich, dass der Antikörper nur die unprozessierte Form erkennt oder die prozessierte kleinere Form nur in deutlich geringerer Konzentration vorliegt. Zur Entstehung der 41 kDa-Form der LAL ist denkbar, dass eine spezifische Abspaltung eines Propeptides für die posttranslationale Prozessierung verantwortlich ist. Für das Vorkommen einer derartigen Proteolyse lysosomaler Enzyme gibt es mehrere Beispiele. Bei der Untersuchung der  $\alpha$ -Fukosidase (Johnson et al. 1991), der  $\beta$ -Glukuronidase (Gabel & Foster 1987) und des Cathepsin D (Gieselmann et al. 1983; Richo & Conner 1994) wurde diese Form der posttranslationalen Prozessierung nachgewiesen. Eine carboxyterminale Prozessierung, wie sie für die  $\beta$ -Glukuronidase (Erickson & Blobel 1983) und die saure Phosphatase (Gottschalk et al. 1989) beschrieben wurden, wäre bei der LAL als Ursache für die Heterogenität der Molekulargewichte ebenfalls möglich. Eine solche Prozessierung würde erklären, dass das gespaltene Protein nicht detektierbar ist, da der Antikörper gegen den C-Terminus gerichtet ist. Es ist jedoch nicht zu erklären, warum der Antikörper nicht zwischen transgen und wildtyp unterscheiden kann. Da sowohl die Menge an mRNA der LAL als auch die enzymatische Aktivität in der überexprimierenden Leber deutlich erhöht ist, kann davon ausgegangen werden, dass auch mehr Protein vorhanden ist.

In der Immunfluoreszenz der adenoviralvermittelten Überexpression der LAL wurden zwar Zellen angefärbt, allerdings bewirkt eine adenovirale Infektion auch eine deutlich höhere Überexpression in der einzelnen infizierten Zelle des eingeschleusten Gens im Vergleich zu der drei- bis siebenfachen Erhöhung in den Tieren. Es könnte also auch sein, dass der Antikörper nicht sensitiv genug ist. Da außerdem nicht ausgeschlossen werden konnte, dass ein völlig anderes Protein erkannt wird, wurde im Folgenden von einer weiteren Benutzung des Antikörpers abgesehen.

# 4.2 Bedeutung der lysosomalen sauren Lipase unter normaler Haltungsdiät

Die Mäuse wurden zunächst unter einer normalen Diät gehalten und analysiert. Die normale Haltungsdiät der Mäuse enthält 3 % Fett und kein Cholesterin und entspricht

damit nicht der durchschnittlichen, deutlich lipidreicheren Ernährung in westlichen Ländern.

Die Transkription der integrierten cDNA wurde durch Messung der mRNA des Transgens nachgewiesen, die funktionelle Expression wurde auf Proteinebene durch Messung der Aktivität guantifiziert. Beides zeigte, dass ein Tiermodell einer funktionellen hepatischen Überexpression der LAL etabliert wurde. Die Expression des Transgens verändert nicht die Transkription der endogenen murinen mRNA. Eine Transkription des Transgens im Darm war, wie aus Promotorstudien (Walsh et al.) zu erwarten, minimal bzw. nicht nachzuweisen. Dr. M. Merkel, der das Plasmid zur Amplifikation des Promotorfragmentes zur Verfügung stellte, konnte zeigen, dass eine Klonierung der LpL hinter das hier eingesetzte Promotorfragment zu einer vierbis neunfachen Überexpression der Transgen-Aktivität ausschließlich in der Leber führt (Merkel et al. 1998). Dies liegt im Rahmen der drei- bis siebenfachen Überexpression der hepatischen Aktivität in den LAL-transgenen Tieren. Die adenovirale Behandlung mit einem Adenovirus, der die LAL unter dem starken CMV-Promotor exprimiert, führt zu einer neun- bis zwölffach höheren Aktivität in der zuvor LALdefizienten Leber im Vergleich zur normalen Leber (Du et al. 2002) und zu deutlichen physiologischen Veränderungen. Die hier beobachtete Verstärkung der hydrolytischen Aktivität könnte somit in einem physiologisch relevanten Bereich liegen.

In den Mäusen wurde eine geschlechtsspezifische Regulation des Transgens festgestellt. Auf Transkriptionsebene war dies mit einer fünffach höheren mRNA-Menge in transgenen Männchen noch ausgeprägter als auf Aktivitätsebene (doppelte Aktivität Männchen versus Weibchen).

Die verschiedensten Studien haben gezeigt, dass die Genexpression des humanen Apo A-I von verschiedenen Aktivatoren und Liganden von nukleären Rezeptoren kontrolliert wird. Hierzu gehören die Glukokortikoide und das Schilddrüsenhormon, Östrogene, Retinoide und die hypolipidämischen Fibrate, welche PPARα-Aktivatoren sind (Berthou et al. 1994; Staels et al. 1989; Staels & Auwerx 1998; Staels et al. 1990; Staels et al. 1991; Staels et al. 1992). Bei einer geschlechtsspezifischen Regulierung von Genen liegt eine Involvierung der Sexualhormone nahe. In Menschen führt Östrogen, wie in Studien von Östrogen-Ersatz-Therapien gezeigt wurde, zur Erhöhung der Plasmakonzentration des Apo A-I, die auf eine Erhöhung der hepatischen ApoA-I-mRNA-Synthese zurückzuführen ist (Rich-Edwards & Hennekens 1996; Stampfer & Colditz 1991; Granfone et al. 1992). Dies führt zu höheren HDL-Plasmawerten in der premenopausalen Frau, was eine mögliche Erklärung des geringeren Risikos einer KHK in der Frau bis zur Menopause ist. Auch im humanen hepatischen Zellkultursystem steigert Östrogen die Apo A-I-mRNA-Synthese der Leber (Archer et al. 1986; Jin et al. 1998).

Der humane Apo A-I-Promotor enthält allerdings kein klassisches östrogenresponsives Element (ERE); die Östrogensensitivität wird über die Interaktion mit Cofaktoren vermittelt, welche ihrerseits direkt an einer der "cis-acting"-Elemente binden können. So führt die Transfektion einer hepatischen Zelllinie mit dem Östrogenrezeptor ER $\alpha$  zur Repression der Apo A-I-Expression, es sei denn, es wird zusätzlich ein Cofaktor transfiziert. Die Aktivierung der Apo A-I-Genexpression ist somit abhängig vom intrazellulären Gleichgewicht von ER $\alpha$ , Östrogen und Cofaktoren wie z. B. HNF3 und RIP140 (Harnish et al. 1994; Harnish et al. 1996; Harnish et al. 1998).

Die Wirkung des Östrogens auf die Expression des Apo A-I-Gens wird in der Maus kontrovers diskutiert, da es in Abhängigkeit von der Dosis der Östrogengabe sowohl zu einer Aktivierung (Tang et al. 1991) als auch Inhibierung (Srivastava et al. 1997) kommen kann. Dies kann zum einem an einer unterschiedlichen Promotorstruktur der murinen Sequenz liegen, zum anderen an unterschiedlichen intrazellulären Bedingungen, wie die An- oder Abwesenheit von Cofaktoren oder nukleären Transkriptionsfaktoren. Vergnes et al. beschrieben 2000 ein transgenes Mausmodell, in dem das humane Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV-Gencluster unter der Kontrolle einer 8,5 kb großer Sequenz vom 5'-Ende des Apo A-I-Genes überexprimiert wird (Vergnes et al. 2000). In diesen männlichen Tieren ist die Expression ebenfalls etwa eineinhalb bis zweifach höher als in den weiblichen. Dies zeigt, dass ein und dieselbe Promotorstruktur speziesspezifisch reguliert werden kann.

Des Weiteren spielen andere hormonelle und diätetische Faktoren eine regulative Rolle, unabhängig von der Östrogenwirkung. Das "cis-acting"-Element des humanen Apo A-I-Promotors enthält ein PPAR-responsives Element und wird durch Fibrate aktiviert (Vu-Dac et al. 1998; Berthou et al. 1996). Zur Charakterisierung der transgenen Mäuse wurde das Fettsäuremuster der Leber gaschromatographisch analysiert. Die Lebern der weiblichen und männlichen transgenen Mäuse zeigten eine leichte Verschiebung des Fettsäuremusters der Leber. Während Weibchen eine Verringerung des Fettsäuregehalts aufwiesen, stieg dieser in den Männchen an. Diese Fettsäuren könnten PPARα-vermittelt die höhere Aktivität der LAL in den Männchen induziert haben. Gegen diese Erklärung spricht allerdings, dass der Triglyzeridgehalt in der weiblichen Leber höher war als bei Männchen (Phinney et al. 1994), was mit dem gemessenen Gesamtgehalt an Fettsäuren in der Leber übereinstimmt. Weiteren Aufschluss über diesen möglichen Regulationsweg würde die Bestimmung der freien Fettsäuren in der Leber sowie der peroxisomalen Proliferation als Marker der PPAR-Aktivierung ergeben.

Die Aminosäuresequenz der murinen LAL ist seit 1996 bekannt. Sowohl die genomische Organisation als auch die cDNA ist homolog zum humanen Gegenstück. Das Protein zeigt eine Ähnlichkeit von 95 % bei einer 75% igen Identität. Ein Großteil der Strukturmotive der hLAL findet sich auch im murinen Enzym einschließlich der katalytischen Triade, vier der sechs potentiellen Glykosylierungsstellen und drei der sechs Cysteinreste. Triglyzeride werden mit deutlich höherer Affinität als Cholesterinester hydrolysiert; dies gilt auch für das humane Homolog, allerdings ist die Differenz der Affinität bei dem murinen Enzym stärker (Groener et al. 2000). Während die Triglyzeride vom humanen Enzym mit einer zehnfach höheren Aktivität hydrolysiert werden, hydrolysiert sie das murine Enzym mit einer 100fachen Aktivität. Zudem variiert die Affinität zum Substrat je nach gebundener Fettsäure. Im Allgemeinen sind Öl- und Stearinsäure die besten Substrate, während langkettigere und mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie die Arachidonsäure mit einer geringeren Affinität gespalten werden (Smith et al. 1974; Takano et al. 1974). Die Untersuchungen zur Substratspezifität wurden mit LAL aus Kaninchen, Mensch und Schwein durchgeführt, nicht jedoch in der Maus. Möglicherweise verursachen diese speziesspezifischen Unterschiede in Aktivität und Substratspezifität in Verbindung mit der unterschiedlich starken Aktivität der LAL in Männchen und Weibchen ein verändertes Verhältnis des endogenen Enzym zum transgenen Enzym. Die Folge sind die hier beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede der Fettsäuremuster der Leber.

Der intrazelluläre Fettsäuregehalt einer Leberzelle wird auch durch das Gleichgewicht zwischen der  $\beta$ -Oxidation und VLDL-Synthese einerseits und der Veresterung und Einspeicherung in Form von Triglyzeriden andererseits bestimmt. Die höhere Aktivität der LAL in der männlichen Leber könnte bewirken, dass der hieraus resultierende höhere Einstrom an freien Fettsäuren vom Lysosom in das Zytoplasma das Gleichgewicht in Richtung Einspeicherung verschiebt (evtl. bei maximaler Auslastung der oxidativen Kapazität). Zudem ist die Kapazität der  $\beta$ -Oxidation in der weiblichen Maus höher als in der männlichen Maus, ohne dass die Expression der Schlüsselenzyme der Fettsäureoxidation verändert ist (Djouadi et al. 1998; Nohammer et al. 2003). Es wird ein zusätzlicher Fettsäure-brauchender Stoffwechselweg postuliert, der über Östrogen gesteuert wird. In dem Zusammenhang einer erhöhten Lipidverstoffwechslung wird evtl. ein unabhängiger östrogenregulierter Lipid-abbauender Weg induziert. Es ist ebenfalls denkbar, dass Östrogenrezeptoren PPARα-Zielgene über PRE oder ERE's aktivieren.

Die Plasmalipide inklusive des Lipoproteinprofils wurden durch die zusätzliche Aktivität der Lipase nicht verändert. Lediglich in der transgenen weiblichen Maus zeigte sich eine nichtsignifikante Tendenz einer höheren VLDL-Synthese. Auch diese könnte Ursache der Reduzierung des Fettsäuregehalts in der transgenen Leber sein.

# 4.3 Bedeutung der lysosomalen sauren Lipase unter "westlicher" Diät

Der Einsatz von lipidreichen Diäten ist in der Forschung mit Tieren, im Besonderen auf dem Gebiet des Lipidstoffwechsels, des Diabetes und der Atherosklerose weit verbreitet. Insgesamt gehört die Maus zu den atheroskleroseresistenten Spezies, es gibt jedoch Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm C57Bl/J6 ist ein atheroskleroseanfälliger Stamm (Paigen et al. 1990). Um die Bedeutung der LAL unter Lipidbeladung untersuchen zu können, wurden weibliche Mäuse für zehn Wochen mit einer so genannten "westlichen" Diät gefüttert. Ein Kontrollkollektiv bekam die normale Haltungsdiät.

Die Diät bestand zu 15 % aus Fett und war mit 1,5 % Cholesterin versetzt. Die Fettquelle war Kakaobutter, hieraus ergibt sich die folgende Fettsäurenzusammensetzung: 25 % 16:0; 30 % 18:0; 37 % 18:1, 4 % 18:2 und 4 % nicht identifiziert. In der Summe ergibt sich ein Anteil von 55 % an ungesättigten (SFA), 37% an einfach ungesättigten (MUFA) und 4 % an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) (Nishina et al. 1993a). Das Füttern dieser Diät über einen Zeitraum von zehn Wochen führte nicht zu einem Anstieg des Körpergewichts im Vergleich zu den normal gefütterten Mäusen. Dies stimmt mit Beobachtungen von Nishina et al. überein, dass selbst nach 18-wöchiger lipidreicher Diät keine signifikanten Veränderungen des Körpergewichts auftreten.

#### Die Auswirkungen der LAL-Überexpression auf Plasmalipide und Leber

Es wurden zunächst die Plasmalipide analysiert. In Abbildung 31 A sind die Plasmalipidwerte vor und nach der Diät von wildtyp Mäusen dargestellt. Der mittlere Cholesterinwert unter normaler Diät lag bei knapp 80 mg/dl und damit im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte zwischen 70 und 90 mg/dl (LeBoeuf et al. 1990; Nishina et al. 1993b; Stein et al. 2001). Gleiches gilt für das freie Cholesterin mit 13 mg/dl (Escola-Gil et al. 2001; Aubert et al. 1988). Die Triglyzeridwerte sind in der Literatur sehr unterschiedlich beschrieben und variieren von 30 bis 60 mg/dl. Die freien Fettsäuren liegen in der Regel zwischen 25 und 35 mg/dl (Burant et al. 1997; Koopmans et al. 2001; Nishina et al. 1993a; Nishina et al. 1993b; Escola-Gil et al. 2001); dies korreliert mit den hier analysierten Werten.

Wenn atheroskleroseanfällige Mäuse mit einer triglyzerid- und cholesterinreichen Diät gefüttert werden, erhöht sich der Gesamtcholesterinspiegel, wobei insbesondere der Plasma-HDL- (und Apo A-I)-Spiegel steigt. In resistenten Mäusen (z. B. BALB/c ) bleibt der HDL-Spiegel unverändert (Dueland et al. 1997). Außerdem tritt ein VLDL-Peak auf. Unter einer lipidreichen Diät und damit einer positiven Energiebilanz kommt es immer zu einer erhöhten VLDL-Synthese parallel zu einer Aktivitätssteigerung des mikrosomalen Triglyzerid-Transferproteins (MTP) (Davis & Boogaerts 1982; Tanaka et al. 1993; Read et al. 2000; Kesaniemi & Grundy 1983), welches eine entscheidende Rolle in der VLDL-Synthese am ER spielt (Chang et al. 1999; Raabe et al. 1999; Hayhurst et al. 2001). In den hier analysierten Tieren bewirkte die westliche Diät den erwarteten Anstieg der Lipidspiegel im Plasma, verbunden mit einer Modifikation des Lipoproteinprofils (Erhöhung des VLDL/LDL-Peaks). In den transgenen Mäusen fiel dieser VLDL-Anstieg signifikant höher aus (42 %, p=0,018), während die Plasmalipide insgesamt in beiden Tiergruppen gleichermaßen stiegen.

Ursache für die erhöhten VLDL-Spiegel im Plasma der transgenen Tiere kann eine langsamere Verstoffwechslung der VLDL oder eine höhere Produktions- und Sekretionsrate der Lipoproteine durch die Leber sein. Kinetische Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ameis mit radioaktiv markierten Lipoproteinen zeigten keine Veränderung in der Kinetik der Lipoproteinaufnahme (persönliche Mitteilung). Es ist somit wahrscheinlich, dass eine erhöhte VLDL-Synthese und -Sekretion in der transgenen Leber stattfindet. Das Muster des Cholesterin- und Lipidstoffwechsels in der Leber von Säugetieren ist sehr komplex. Es involviert die Aufnahme von Lipoproteinen, die Synthese von Lipiden in der Zelle, die Bildung und Sekretion von Lipoproteinen und die Benutzung von Lipiden zur Cholesterylester- und Triglyzeridbildung sowie des Cholesterins zur Gallensäuresynthese.

Das Füttern einer triglyzerid- und cholesterinreichen Diät, egal ob mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren über mehrere Wochen, führt zu einer Akkumulation von Triglyzeriden und Cholesterinestern in der Leber (Kersten et al. 1999). Dies wurde zunächst in einer Fettrotfärbung von Gefrierschnitten der Leber überprüft. Diese zeigten zahlreiche Lipidtröpfchen, die unter normaler Diät nicht beobachtet wurden. Eine guantitative Einschätzung der Unterschiede aus diesen Schnitten war nicht möglich, auch wenn der Eindruck entstand, dass die LAL-Überexprimierung zu einer stärkeren Fettrotfärbung führte. Es wurde dann eine genaue Analyse durch Messung der Leberlipide durchgeführt. In der Abbildung 34 sind die einzelnen Lipidwerte je Gramm Leber dargestellt. Es kam in beiden Mausgruppen zu einer Erhöhung der Cholesterinester- und Triglyzeridkonzentration. Dies stimmt mit zahlreichen in der Literatur beschriebenen Studien überein (Nishina et al. 1993a; Nishina et al. 1993b; Nishina et al. 1990; Paigen 1995). Der Anteil an freiem Cholesterin sowie an freien Fettsäuren stieg ebenfalls. Die Überexpression der LAL bewirkte eine Verstärkung dieser Akkumulation um 37 % sowie eine Erhöhung der Konzentration an freiem Cholesterin (+ 31 %) und an freien Fettsäuren (+ 39 %). Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Erhöhung der freien Fettsäuren und des Cholesterins durch einen kinetischen Effekt. Dies würde bedeuten, dass eine schnellere Hydrolyse der Substrate im Lysosom zu einer schnelleren Ausschleusung der Produkte aus dem Kompartiment führt und es zu einer Erhöhung der Konzentration der Produkte der LAL kommt. Als Konsequenz kommt es zur Verstärkung der durch freie Fettsäuren und Cholesterin regulierten Stoffwechselwege. Ein solches Modell wurde für ein transgenes Mausmodell vorgeschlagen, in dem die hormonsensitive Lipase (HSL) überexprimiert wurde. Escary et al beschrieb 1999 ein transgenes Tiermodell, indem die Überexpression der HSL zur Erhöhung der Cholesterinestereinspeicherung führt. Es wurde postuliert, dass das durch die zusätzliche Hydrolyse im höheren Maß vorliegende freie Cholesterin die ACAT so stark aktiviert, dass es zu einer erhöhten Lipideinspeicherung kommt (Escary et al. 1999).
Diskussion

Bei der gefütterten westlichen Diät akkumuliert hauptsächlich Ölsäure in der Leber. Bei der gaschromatographischen Quantifizierung der Ölsäure wurde deutlich, dass es bei einer normalen Diät zu einer Reduktion des Ölsäuregehalts in transgenen Weibchen kommt. Unter der westlichen Diät tritt bei deutlich höheren Spiegeln eine Erhöhung der Ölsäure im Vergleich mit den Kontrolltieren auf. Die transgenen gefütterten Weibchen ähneln damit den männlichen Mäusen unter normaler Diät. Möglicherweise ist die oxidative Kapazität in der weiblichen Leber maximal ausgelastet, so dass es trotz der erhöhten VLDL-Synthese zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten einer Einspeicherung kommt.

Unter einer hohen exogenen Cholesterinzufuhr, findet eine verstärkte Endozytose von Lipoproteinen statt und es kommt zu einer Einspeicherung des überschüssigen Cholesterins als Cholesterinester. Die gleichzeitige Verminderung der endogenen Cholesterinsynthese sowie der LDL-R-Aktivität wirkt einer Akkumulation entgegen, kann sie aber nicht verhindern, wenn die Zufuhr den Cholesterinbedarf übersteigt. Die Westernblotanalysen (Abbildung 37) zeigen, dass eine Expression des LDL-R trotz der Diät vorliegt und es trotz des höheren zellulären Cholesterinspiegels zu keiner weiteren Verringerung der Expression in der transgenen Leber kommt. Es scheint sich somit um eine minimale basale Expression des Rezeptors zu handeln.

Die Leber nimmt Cholesterin aus dem peripheren Gewebe auf. Die Ausschleusung aus der peripheren Zelle geschieht über den reversen Cholesterintransport mit Hilfe der HDL, welches freies Cholesterin aufnimmt, das in der HDL von der LCAT verestert wird und dann in den Kern des Lipoproteins gelangt. Die Leber nimmt Cholesterin vor allem über SR-BI auf. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht eine höhere HDL-Aufnahme in die Leber Ursache für die zusätzliche Einspeicherung zu sein scheint, da die Expression von SR-BI und von Apo A-I in der Leber beider Tiergruppen gleich ist. Desgleichen lässt die unveränderte LRP- und LDL-R-Expression eine unveränderte Aufnahme der Apo E-reichen Plasmalipoproteine vermuten.

In den transgenen Mäusen ist die hepatische Konzentration an freiem Cholesterin erhöht. Hohe Konzentrationen an freiem Cholesterin sind zytotoxisch (Warner et al. 1995). Um die Spiegel an freiem Cholesterin konstant zu halten, aktiviert freies Cholesterin die ACAT, welches freies Cholesterin mit einer freien Fettsäure verestert. Das entstandene neutrale Fett kann im Zytosol gespeichert werden und ist nicht toxisch für die Zelle. Die Mobilisierung erfolgt über eine neutrale Lipase. Beide Enzyme sind stetig aktiv, so dass ein Zyklus von Hydrolyse und Veresterung entsteht, der sich je nach Bedarf der Zelle zugunsten einer Seite verschieben kann. Die ACAT wird allosterisch durch ihr Substrat aktiviert (Chang et al. 1997; Chang et al. 1998); damit kann von einer Erhöhung der ACAT in der transgenen Zelle ausgegangen werden, was die erhöhte Lipideinspeicherung erklärt. Der Efflux des Cholesterins aus der Leber geht über die Gallensäuresynthese und wird unter einer cholesterinreichen Diät verstärkt. Cholesterin aktiviert die Cyp7A1, was zu einer erhöhten Synthese führt. In der Leber der transgenen Maus liegt möglicherweise eine parallele Aktivierung beider Wege vor, die Gallensäuresynthese kann jedoch vermutlich die Aktivität der ACAT nicht ausgleichen. Die ACAT wird nur in Anwesenheit von freien Fettsäuren, gebunden an spezielle Fettsäure-bindenden Proteine, aktiviert (Chao et al. 2003). Diese Bedingung war gegeben, da die gefütterte Diät sowohl Cholesterin als auch Fettsäuren enthielt. Favorisiertes Substrat der ACAT ist die Ölsäure, welche verstärkt vorlag (Warner et al. 1995).

Ein Überangebot an lipidreicher Nahrung führt zu einem erhöhten Vorkommen an freien Fettsäuren. Hieraus folgt eine Erhöhung der Triglyzeridsynthese und der damit verbundenen Veresterung der Fettsäuren (Memon et al. 1999). Ebenso wie freies Cholesterin sind freie Fettsäuren zytotoxisch für die Zelle. In Zellkultur führt vor allem die Aufnahme von SFA zur Apoptose der Zelle, während MUFA's und PUFA's nicht lipotoxisch sind (Listenberger et al. 2001; Paumen et al. 1997; Zhang et al. 1992; Doi et al. 1978). So führte die Gabe von Palmitat zur Apoptose, während Ölsäure die Triglyzeridsynthese stimuliert (Listenberger et al. 2003; Rosenthal 1981). Die VLDL-Synthese ist abhängig von der Verfügbarkeit der Fettsäuren (Gibbons 1990; Olofsson et al. 1999; Linden et al. 2000), eine längere fettreiche Diät induziert die Expression des MTP (Bennett et al. 1996; Davis & Boogaerts 1982; Tanaka et al. 1993; Read et al. 2000), die wiederum eine verstärkte VLDL-Synthese bedingt. Da ein erhöhter Fettsäurespiegel in der transgenen Leber vorliegt, ist eine höhere Verfügbarkeit gegeben. Xie et al zeigten zudem, dass die Anzahl der Doppelbindungen einer Fettsäure die Veresterung und damit die Einspeicherung von Cholesterin sowie die VLDL-Synthese beeinflussen. Je nach Diät (18:1 > 18:2 > 8:0 > 14:0) verstärkte sich die Einspeicherung, beides jedoch nur, wenn neben den Fettsäuren auch Cholesterin gefüttert wird (Xie et al. 2002). Die vorherrschende Fettsäure der gefütterten Diät war mit 37 % die Ölsäure (18:1), welche zudem das optimale Substrat für die LAL ist. Es ist demnach wahrscheinlich, dass in der LAL-überexprimierenden Leber ein paralleler, verstärkter Ausstrom von Ölsäure und Cholesterin aus dem Lysosom stattfindet. Damit ist eine größere Verfügbarkeit von Lipiden und nachfolgend eine verstärkte VLDL-Synthese als in der normalen Maus gegeben. Es wurde die Expression von den VLDL-assozierten Apolipoproteinen Apo E und Apo B untersucht. Parallel zur VLDL-Synthese vermittelte die LAL-Aktivität eine Aktivierung der Apo E-Expression, während die Expression von Apo B unverändert blieb. Im Gegensatz zum Menschen wird in der Leber der Maus das APOBEC-Gen, welches für das Editing der Apo B mRNA zuständig ist, exprimiert. Damit kann die Leber sowohl Apo B-100 als auch Apo B-48 synthetisieren. Etwa 70 % der mRNA werden editiert, im Plasma wie auch in der Leber ist das Apo B-48 die dominante Form (Greeve et al. 1993). Das Apo B-Gen wird konstitutiv exprimiert und nichtsekretiertes Protein wird wieder abgebaut. Die Veränderung der Triglyzeridsekretion wird damit vorwiegend über die Beladung der sezernierten VLDL mit Lipiden und weniger über eine veränderte Anzahl an freigesetzten Partikeln erreicht

#### Die Auswirkung der LAL-Überexpression auf die Regulation der Lipidhomöostase

Eine verstärkte Aktivität der LAL in der Leber führte zu höheren Konzentration an freien Fettsäuren und an freiem Cholesterin in der hepatischen Zelle. Es ist davon auszugehen, dass eine deutlichere Ausprägung der von Fettsäuren und Cholesterin regulierten Prozesse vorliegt. Es wurde die Expression zweier Transkriptionsfaktoren (SREBP1 und PPARα) in der Leber untersucht.

SREBPs sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren, welche die Lipidhomöostase regulieren. Drei verschiedene Isoformen (SREBP1a, 1c und 2) kontrollieren die Expression von Genen, welche für die Biosynthese von Cholesterin, Fettsäuren, Triglyzeride und Phospholipiden benötigt werden (Horton et al. 2002b; Horton et al. 2002a). In den meisten tierischen Geweben ist SREBP1c die vorherrschende Isoform und liegt etwa in zehnfach höheren Konzentrationen als SREBP1a und in doppelter als SREBP2 vor (Shimomura et al. 1997). SREBP1a wird konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert und scheint für eine basale Cholesterin- und Fettsäuresynthese zuständig zu sein. SREBP1c und SREBP2 dagegen werden reguliert, wobei

SREBP2 seine Aktivität auf die Regulierung der Cholesterinhomöostase beschränkt und SREBP1 Gene der Lipogenese reguliert (Horton et al. 2002b; Horton et al. 2002a; Pai et al. 1998). So führt die Überexpression von SREBP1 in der transgenen Maus zu einer deutlichen Erhöhung von lipogenen Enzymen, wie zum Beispiel der Fettsäure-Synthase oder der Acetyl-CoA-Synthase; und es kommt zu einer vermehrten Triglyzerideinspeicherung (Shimomura et al. 1998; Shimano et al. 1996).

Für die Analyse der SREBP-Expression im Westernblot wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch SREBP1 erkennt, nicht aber zwischen den Isoformen 1a und 1c unterscheiden kann. Vor diesem Hintergrund des zehnfachen Überschusses der SREBP1c gegenüber der SREBP1a Isoform kann davon ausgegangen werden, dass die im Westernblot auftretenden Unterschiede auf eine Veränderung der Isoform 1c zurückzuführen sind. In den Lipase-überexprimierenden Mäusen konnte eine verstärkte Expression von SREBP1c sowie eines seiner Zielgene FAS beobachtet werden. FAS ist ein direktes Zielgen von SREBP1c: im Promotor des Gens wurde eine SREBP-Bindungsstelle identifiziert (Magana & Osborne 1996). Es ist allerdings zu diskutieren, warum es trotz erhöhter Lipidzufuhr und damit trotz hoher Fettsäure- und Cholesterinkonzentrationen zu einer Erhöhung der SREBP1c-Expression und damit der Fettsäuresynthese kommt. Die Regulation könnte über den Transkriptionsfaktor LXR erfolgt sein.

Bei einem Überschuss an Cholesterin und damit an Oxysterol wird der Transkriptionsfaktor LXR aktiviert, der neben der Aktivierung des Gallensäurestoffwechsels auch SREBP1c und damit die Fettsäuresynthese aktiviert. In der murinen Leber führt eine Fütterung mit Cholesterin (oder einem LXR-Agonisten) zu einem LXRvermittelten Anstieg der SREBP1c-Expression, die von SREBP1a und 2 bleibt unverändert (Repa et al. 2000). In der Literatur ist eine Inhibition von LXR durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) und eine damit verbundene Reduktion der SREBP1c mRNA-Synthese beschrieben (Xu et al. 1999). Ungesättigte Fettsäuren wirken somit antagonistisch/kompetitiv zur oxysterolvermittelten Aktivierung von LXR (Ou et al. 2001; Pawar et al. 2002). Die Hierarchie dieses Fettsäureeffektes auf LXR ist 20:4 > 18:2 > 18:1; gesättigte Fettsäuren haben keinen Einfluss. Fettquelle in der gefütterten Diät war Kakaobutter, welche fast nur gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren beinhaltet. Es ist davon auszugehen, dass es in der Leber zu einer LXRvermittelten Aktivierung der Fettsäuresynthese kommt, die nicht durch ungesättigte Fettsäuren inhibiert wird. Ein weiteres Zielgen von LXR ist das Apo E, dessen Expression ebenfalls in der Westernblotanalyse erhöht schien (Abbildung 38). Weitere Effekte einer LXR-Aktivierung ist eine Stimulierung der VLDL-Synthese ohne dass sich die Triglyzeridkonzentrationen im Plasma ändert (Grefhorst et al. 2002).

In Peroxisomen finden Degradationsreaktionen von Lipiden und Aminosäuren statt, bei denen Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gebildet wird. Diese korrosive Substanz ist potentiell zytotoxisch und kann verheerende oxidative Schäden in der Zelle anrichten. Sie wird von der Katalase in H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub> gespalten und so abgebaut. Die Katalase ist damit ein wichtiges Enzym der Peroxisomen, deren Gehalt proportional zur Anzahl an Peroxisomen ist (de Craemer et al. 1994). In vivo Studien zeigen, dass die peroximale Oxidation ansteigt, wenn man Ratten oder Mäusen eine westliche Diät füttert, wobei dies verstärkt in atheroskleroseanfälligen Stämmen der Fall ist (Neat et al. 1980; Bremer & Norum 1982). Zusätzlich zu dem erwarteten diätinduzierten Anstieg, war die Proliferation der Peroxisomen in der Lipase-überexprimierenden Maus deutlich stärker (+ 25 %). Eine Erhöhung der Anzahl an Lysosomen durch die humane LAL fand nicht statt. Da PPARα die vorherrschende Isoform in der Leber ist, kann davon ausgegangen werden, dass eine LAL-Überexpression zur verstärkten Aktivierung von PPARα führt. Es konnte außerdem gezeigt, dass die Expression von ACO in der murinen transgenen Leber erhöht war (Abbildung 40). Sie ist ein essentielles Enzym der peroximalen Fettsäureoxidation. Da der Promotor der ACO ein PRE enthält, wird dies durch die beschriebene Erhöhung von PPARa induziert. Weitere Zielgene von PPAR $\alpha$  sind Enzyme der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation, es kann also postuliert werden, dass auch diese stärker exprimiert werden.

PPARα beeinflusst nicht Apo B, Apo E, MTP (Kersten et al. 1999) oder den LDL-R (Linden et al. 2001). In der transgenen Leber wurde eine verstärkte Apo E-Expression und VLDL-Synthese festgestellt, die vermutlich nicht PPARα-vermittelt ist.

Freie Fettsäuren interagieren außerdem mit dem Transkriptionsfaktor HNF4, einem hoch konservierten Mitglied der Familie der nukleären Rezeptoren. Aktiviertes HNF4 induziert eine Überführung von Fettsäuren in oxidative Stoffwechselwege. Fettsäure-Acyl-CoA-Thioester (FACoA) modulieren die DNA-bindende Aktivität von HNF4 (Ladias et al. 1992; Sladek et al. 1999; Sladek et al. 1990). Diese wirken als Agonist oder Antagonist je nach Länge und Sättigkeitsgrad der Fettsäure. Gesättigte Fettsäure-re-CoA-Thioester aktivieren HNF4, während CoA-Thioester von PUFA's die HNF4 Aktivität antagonisieren (Hertz et al. 1998). In Mäusen, die durch einen konditionellen

Knock-Out in der Leber HNF4 defizient sind, ist die Expression des MTP stark reduziert. Da die Diät zum größten Teil aus gesättigten Fettsäuren besteht, kann eine erhöhte HNF4-Aktivität postuliert werden. Der hier beschriebene Phänotyp entspricht einer Überexpression von HNF4 und könnte die erhöhte VLDL-Synthese und Apo E-Expression erklären.

## 4.4 Pathophysiologische Überlegungen zur Überexpression der lysosomalen sauren Lipase

Vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Spezies haben eine Korrelation der Aktivität der LAL mit einer unterschiedlichen Inzidenz atherosklerotischer Gefäßläsionen gezeigt (Bonner et al. 1972). Aortale Zellen von Kaninchen und Schweinen, die leicht eine Diät-induzierbare Atherosklerose ausbilden, wiesen eine geringere Enzymaktivität auf als Zellen von Ratte, Hund und Meerschweinchen, die gegen die Ausbildung einer Atherosklerose relativ resistent sind. Einer relativen Defizienz der LAL wurde eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Schaumzellbildung und der fortgeschrittenen atherosklerotischen Gefäßläsionen zugesprochen (de Duve 1975). Untersuchungen an CESD-Patienten, die eine vorzeitige Atherosklerose aufwiesen, unterstützen diese Hypothese (Fredrickson et al. 1972). Basierend auf zwei Studien zum kausalen Zusammenhang einer geringeren LAL-Aktivität mit dem Risiko einer KHK (Coates et al. 1986; Yatsu et al. 1980), wurde postuliert, dass eine niedrigere Aktivität der LAL einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer Atherosklerose darstellt. Dem entgegen zeigten lipidüberladene Zellen eine bis zu dreieinhalbfach erhöhte Aktivität der Lipase im Vergleich zu nichtüberladenen Zellen. Erst bei einer fortgeschrittenen Lipidakkumulation kommt es zur Produkthemmung der LAL. Diese Daten widersprachen der Annahme, dass die lysosomale Lipid-Überladung in atheromatös veränderten Arterienzellen auf eine relative Defizienz der LAL zurückzuführen ist (Haley et al., 1980). Auch das in dieser Arbeit beschriebene Tiermodell widerspricht dieser Annahme, da trotz erhöhter Lipolyse eine zusätzliche Einspeicherung von Lipiden stattfindet.

Escary *et al* beschrieb 1999 ein transgenes Tiermodell, indem die Überexpression einer Lipase (HSL) zur Erhöhung der Einspeicherung führt. In den beschriebenen Tieren wird die HSL makrophagenspezifisch überexprimiert. Obwohl die Aktivität der HSL im Aktivitätsassay erhöht ist, kommt es zu einer Verstärkung der Lipideinspeicherung unter eine atherogenen Diät. Das im höheren Maß vorliegende freie Cholesterin scheint die ACAT so stark zu aktivieren, dass eine Nettobewegung zugunsten der Lipideinspeicherung entsteht. Als Konsequenz kommt es in diesen transgenen Tieren zu einer vermehrten Ausbildung von atherosklerotischen Vorgängen (Escary et al. 1999). Gleichfalls ist beschrieben, dass eine Inhibierung der ACAT-Aktivität die Bildung von Fettstreifen im Kaninchen reduziert (Bocan et al. 1991; Tanaka et al. 1994). Die Überexpression der LAL in der Leber führt zu einer zusätzlichen Lipidakkumulation. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass eine Überexpression der LAL in Makrophagen oder den glatten Muskelzellen einen proatherogenen Faktor darstellt. Es ist eine kausale Beziehung der Akkumulation von Fettsäuren und der Insulinresistenz beschrieben (Merkel et al. 1998; Kahn 1994; Shulman 2000). Auch ähnelt die Kombination der hepatischen Lipidakkumulation und Überproduktion von VLDL-Partikeln Beobachtungen in humanen diabetischen Zuständen (Grefhorst et al. 2002). Es ist demzufolge zu spekulieren, dass eine Überexpression der LAL ein metabolisches Risiko ist, sowohl was die Atherogenese also auch die Insulinresistenz betrifft.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein transgenes Tiermodell zur Überexpression der lysosomalen sauren Lipase (LAL) etabliert und der Einfluss dieses Enzyms auf den Lipidstoffwechsel untersucht.

Die cDNA der humanen LAL wurde hinter den ApoA-I-Promotor kloniert und erfolgreich zur Generierung einer Mauslinie verwendet, in der die LAL leberspezifisch überexprimiert wird. Die Lebern der transgenen Mäuse weisen eine drei (Weibchen) bis siebenfach (Männchen) höhere Aktivität der LAL auf. Damit konnte erstmalig die Bedeutung der LAL-Überexpression in einem transgenen Tiermodell *in vivo* untersucht werden. Die Expression des Transgens wird geschlechtsspezifisch reguliert. In den männlichen ist im Vergleich zu den weiblichen Tieren die fünffache Menge an mRNA-Transkripten und eine zweifach höhere LAL-Aktivität in der Leber vorhanden. Die gaschromatographische Analyse der Fettsäuren zeigte, dass die LAL das Fettsäuremuster der Leber mitbestimmt. Während bei den transgenen Weibchen die Masse einiger Fettsäuren signifikant abnahm, wurde bei den Männchen eine signifikante Erhöhung der Fettsäurekonzentrationen beobachtet. Die Analyse der Leberund Plasmalipide unter normalen diätetischen Bedingungen ergab keine weiteren signifikanten Veränderungen durch die Überexpression der LAL.

Die Charakterisierung des Lipidstoffwechsels unter einer so genannten "westlichen Diät", die der Ernährung in industrialisierten Gesellschaften entspricht, zeigte die Bedeutung der LAL bei erhöhter Lipidzufuhr. Es wurde eine verstärkte Einspeicherung von neutralen Lipiden in der Leber der transgenen Tiere sowie eine Erhöhung der VLDL-Synthese festgestellt. Dies konnte mit der Erhöhung der Konzentration an freiem Cholesterin und freien Fettsäuren in der Leber in Zusammenhang gebracht werden. Die Expression einiger am Lipidstoffwechsel beteiligter Proteine wurde im Westernblot dargestellt. Die im Vergleich unveränderte Expression der untersuchten Lipoproteinrezeptoren deutet auf eine gleichbleibende Aufnahme der Lipoproteine hin. Die erhöhte Apo E-Expression wurde in Zusammenhang mit der erhöhten VLDL-Synthese gebracht, während die gleichbleibende Apo A-I-Expression den unveränderten HDL-Spiegel bestätigte. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der LAL möglicherweise zu einer zusätzlichen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren PPARα und SREPB1c und der damit verbundenen Stoffwechselwege führt. Westernblotanalysen zeigten eine vermehrte Expression der Fettsäure-Synthase (FAS) und der Acyl-CoA-Oxiase (ACO). Dadurch konnte zum einem auf eine Erhöhung der Fettsäuresynthese zwecks Veresterung des überschüssigen Cholesterins und zum anderen auf eine Erhöhung der Fettsäureoxidation durch die ACO zur Energiegewinnung geschlossen werden.

Unter erhöhter Lipidbeladung scheint demnach eine hohe LAL-Aktivität bei Auslastung der Lipid-eliminierenden Wege zur zusätzlichen Lipideinspeicherung in der Leber zu führen.

# 6 Anhang

6.1 Sequenzierung des leberspezifischen Promotorfragmentes des humanen Apo A-I



Abbildung 41: Sequenzanalyse des klonierten Promotorfragmentes Apo A-I

Das Plasmid pcDNA3-CMV-ApoAI-hLAL wurde mit den Primern T7 (forward) und hLAL RS1 (reverse), welche direkt 3' bzw. 5' des klonierten Promotorfragmentes liegen, sequenziert. A. und B.: Sequenzanalyse mit dem Primer T7. Da einige Nukleotide nicht zu identifizieren waren, wurde die Sequenzierung wiederholt und die Sequenz miteinander abgeglichen. C.: Sequenzanalyse mit dem reversen Primer hLAL RS1.

	Mäuse	Cholesterin	Freies	Cholesterin	Triglyzeride	Freie Fett-
			Cholesterin			säuren
		mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
Männchen	wildtyp	99,4 ± 12,4	31,8 ± 4,8	67,6 ± 12,2	63,1 ± 7,5	
	transgen	97,7 ± 14,5	$\textbf{32,5} \pm \textbf{6,1}$	65,2 ± 10,1	66,6 ± 4,8	n.b.
Weibchen	wildtyp	86,1 ± 10,8	23,0 ± 6,8	63,1 ± 13,3	$\textbf{46,7} \pm \textbf{11,1}$	
	transgen	87,7 ± 8,9	15,9 ± 4,7	71,8 ± 12,0	42,7 ± 7,7	

## 6.2 Plasmalipide der Mauslinien 21 und 24

#### Tabelle 6: Plasmalipide der wildtyp und transgenen Mäuse der Linie 21

Im Plasma von 12-14 Wochen alten Mäusen wurden die Lipide mit kommerziellen enzymatischen Farbtests gemessen und photometrisch ausgewertet. Die Standardisierung erfolgte mit Precinorm von Roche. Je Gruppe wurden fünf bis acht Mäuse einzeln analysiert und der Mittelwert gebildet. n.b.: nicht bestimmt

	Mäuse	Cholesterin	Freies	Cholesterin	Triglyzeride	Freie Fett-
			Cholesterin			säuren
		mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
normale	wildtyp	79,7 ± 8,3	13,2 ± 1,9	$66,5\pm7,3$	40,3 ± 11,3	$14,\!4\pm2,\!3$
Diät	transgen	75,5 ± 10,3	12,3 ± 1,2	63,2 ± 11,0	39,8 ± 7,7	13,7 ± 2,5
westliche	wildtyp	98,6 ± 9,1	17,1 ± 2,1	81,1 ± 8,0	$\textbf{27,3} \pm \textbf{3,0}$	17,0 ± 3,8
Diät	transgen	106,8 ± 9,9	$17,9\pm3,4$	88,9± 6,4	$\textbf{23,9} \pm \textbf{4,4}$	14,1 ± 2,6

# Tabelle 7: Plasmalipide der wildtyp und transgenen Mäuse der Linie 24 unter einer normalenHaltungsdiät und unter einer westlichen Diät

Wildtyp und transgenen Mäusen wurde nach zehnwöchiger westlicher Diät im Alter von 22 Wochen Blut entnommen und im Plasma die Lipide mit kommerziellen enzymatischen Farbtests gemessen und photometrisch ausgewertet. Die Standardisierung erfolgte mit Precinorm von Roche. Je Gruppe wurden fünf bis acht Mäuse einzeln analysiert und der Mittelwert gebildet.



### 6.3 Plasmalipoproteinprofil der Mauslinie 21



Zur Auftrennung der Lipoproteine im Serum der Mäuse wurde eine FPLC Superose 6 Säule von Pharmacia verwendet und über eine FPLC betrieben. Es wurden 100 µl Plasma je Maus über die Säule gegeben und in 500 µl Fraktionen eluiert. In diesen wurden Cholesterin und Triglyzeride in Doppelbestimmungen enzymatisch mit Kits von Roche gemessen. Die Standardisierung erfolgte mit Precinorm von Roche. Je Gruppe wurden fünf Mäuse einzeln analysiert und der Mittelwert gebildet.

6.4 Zusätzliche Westernblotanalysen von Leberproteinen nach westlicher Diät

Antigen	wildtyp Mäuse	transgene Mäuse
LDLR	frield all	- Handler Band
	and a second day and survey	and a summer and
LRP		
	is brind brind from	
	strong general ground general	
SRBI		
		and some land through
Аро Е		
	territe and the second	stand and and the second
Аро В		
	territorial territorial Second	barrowed barrowed become

Antigen	wildtyp Mäuse	transgene Mäuse
Apo A-I		
FAS		
SREBP1	which have being being	sainty hours ment
ACO		
LAL		
		Manager and Annalysis and Annalysis
		white an and the second s

#### Abbildung 43: Zusätzliche Westernblotanalysen einiger am Lipidstoffwechsel beteiligter Prote-

#### ine

Wildtyp und transgene Mäuse wurden nach zehnwöchiger westlicher Diät im Alter von 22 Wochen die Organe nach *in vivo* Perfusion mit PBS entnommen und die Proteine der Leber präpariert. Es wurden jeweils 10 µg Leberproteine pro Bahn und Maus über eine 10% ige SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulose Membran wurden die Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es sind Gele mit jeweils Leberproben von drei bis vier verschiedenen Mäusen je Gruppe dargestellt.

# 7 Verzeichnisse

## 7.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht des Lipoproteinmetabolismus	6
Abbildung 2: Der intrazelluläre Kreislauf des LDL-Rezeptors	9
Abbildung 3: Intrazelluläre Stoffwechselwege von Cholesterin und Fettsäuren in der Leber	12
Abbildung 4: Regulation der Transkriptionsfaktoren durch freie Fettsäuren	13
Abbildung 5: Regulation von Transkriptionsfaktoren durch Cholesterin	16
Abbildung 6: Reaktionsschema für eine lipasekatalysierte Hydrolyse eines Triglyzerids	18
Abbildung 7: Genfamilie der sauren Lipasen	20
Abbildung 8: Schematische Darstellung einer normalen und einer LAL-defizienten Zelle	23
Abbildung 9: LAL-Aktivität von Ad-hLAL und Ad-βGAL infizierten HuH7-Zellen	57
Abbildung 10: Lipidgehalt von Ad-hLAL und Ad-βGAL infizierten HuH7-Zellen	58
Abbildung 11: Nukleotidsequenz des verwendeten ApoAl-Promotorfragmentes und der hLAL	59
Abbildung 12: Analytisches Agarosegel von Vektor und Insert für die Herstellung des	
Expressionsplasmids pcDNA3-CMV-ApoAI-hLAL	60
Abbildung 13: Restriktionsanalyse (Smal/KpnI) der Klone nach Ligation	60
Abbildung 14: Vektorkarte des Plasmids pcDNA3-CMV-ApoAI-hLAL	61
Abbildung 15: Expression des Transgens in HuH7-Zellen	62
Abbildung 16: Genotypisierung der Founder	63
Abbildung 17: Überprüfung des PCR-Produktes ApoAI-hLAL der Mäuse 21 und 24	63
Abbildung 18: Westernblotanalyse mit einem hLAL-spezifischen Antikörper	65
Abbildung 19: Immunfluoreszenz von Ad-CMV-hLAL und Ad-CMV-βGAL infizierten HuH7-Zellen	66
Abbildung 20: Spezifität der Primer für die murine LAL	68
Abbildung 21: Spezifität der Primer für die humane LAL	69
Abbildung 22: Gereinigte RNA aus Leber und Darm	70
Abbildung 23: Standardisierung der Echtzeit-PCR für die mLAL, hLAL und PBDG	71
Abbildung 24: Relative Expression der endogenen murinen und der humanen transgenen LAL	73
Abbildung 25: Aktivität der humanen LAL in der murinen Leber	74
Abbildung 26: Westernblotanalyse von wildtyp und transgenen Lebern	75
Abbildung 27: Fettsäuremuster der Leber in transgenen und wildtyp Mäusen	76
Abbildung 28: Gesamt-Fettsäuregehalt der Leber in transgenen und wildtyp Mäusen	77
Abbildung 29: Plasmalipoproteinprofil von transgenen und wildtyp Mäusen	78
Abbildung 30: Gewichtskinetik der Mäuse zwischen 12 und 22 Wochen	81
Abbildung 31: Plasmalipide von wildtyp Mäusen vor und nach einer westlichen Diät	82
Abbildung 32: Plasmalipoproteinprofil von wildtyp und transgenen Mäusen nach westlicher Diät	83
Abbildung 33: Kryoschnitte der Leber von wildtyp und transgenen Mäusen nach normaler und	
westlicher Diät.	85

Abbildung 34: Lipidgehalt der Lebern transgener und wildtyp Mäuse unter normaler und unter	
westlicher Diät	86
Abbildung 35: Ölsäuregehalt der Leber von wildtyp und transgenen Mäusen mit normaler oder	
westlicher Diät	87
Abbildung 36: Aktivität der sauren Phosphatase und der Katalase in der Leber von wildtyp und	
transgenen Mäusen unter normaler und unter westlicher Diät	88
Abbildung 37: Westernblotanalyse der Lipoproteinrezeptoren LDL-R, LRP und SR-BI	90
Abbildung 38: Westernblotanalyse der Apolipoproteine Apo E, Apo B und Apo A-I	91
Abbildung 39: Westernblotanalyse der FAS und des SREBP1	92
Abbildung 40: Westernblotanalyse der ACO	93
Abbildung 41: Sequenzanalyse des klonierten Promotorfragmentes Apo A-I	113
Abbildung 42: Plasmalipoproteinprofil von transgenen und wildtyp Mäusen der Linie 24	115
Abbildung 43: Zusätzliche Westernblotanalysen einiger am Lipidstoffwechsel beteiligter Proteine	117
Tabelle 1: Vergleich von klinischen und biochemischen Merkmalen der Wolman'schen Krankheit	
und der Cholesterinester-Speicherkrankheit	24
Tabelle 2: verwendete Antikörper	32
Tabelle 3: Temperaturprofil der PCR zur Genotypisierung	41
Tabelle 4: Temperaturprofil der PCR nach der cDNA-Synthese	45
Tabelle 5: Zusammensetzung der westlichen Diät	80
Tabelle 6: Plasmalipide der wildtyp und transgenen Mäuse der Linie 21	114
Tabelle 7: Plasmalipide der wildtyp und transgenen Mäuse der Linie 24 unter einer normalen	
Haltungsdiät und unter einer westlichen Diät	114

# 7.2 Abkürzungsverzeichnis

•	ABCA1	ATP-binding-Casette Transporter A1
•	ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
•	ACC	Acyl-CoA-Carboxylase
•	ACD	Acyl-CoA-Dehydrogenase
•	ACL	ATP-Citrat-Lyase
•	ACO	Acyl-CoA-Oxidase
•	ACS	Acyl-CoA-Synthase
•	Аро	Apolipoprotein
•	APS	Ammoniumpersulfat
•	ARP1	Apolipoprotein regulierendes Protein
•	ATP	Adenosintriphosphat
•	BGH	bovines Wachstumshormon
•	bp	Basenpaar
•	bPE	bovine prägastrische Esterase
•	BSA	bovines Serum-Albumin
•	C/EBP	CCAAT Enhancer-bindendes Protein
•	cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
•	CD36 und SRA	Scavenger-Rezeptoren
•	cDNA	chromosomale DNA
•	CE	Cholesterinester
•	CESD	Cholesterinester-Speicherkrankheit
•	CETP	Cholesterinester-Transferprotein
•	cFABP	zytosolische Fettsäure-bindende Proteine
•	Chylo	Chylomikronen
•	Chylo. Rem.	Chylomikronen Remnants
•	CMV	Cytomegalovirus
•	CoA	Coenzym A
•	Ct	Treshold Cycle
•	CURL	compartments of uncoupling of receptor and ligand
•	Cyp7A1	Cholesterin-7α-Hydroxylase
•	dGL	gastrische Lipase des Hundes
•	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
•	DNA	Desoxyribonukleinsäure
•	DTT	Dithiothreitol
•	E.coli	Escherichia coli
•	EC	Enzyme Comission
•	ECL	Enhanced Chemiluminiscense
•	EL	endotneliale Lipase
•	ER	endoplasmatischen Retikulums
•	et al.	et alli (und andere)
•		Irelen Fellsauren
•		
•		Fellsaure-AcylCoA-Inioesier
•		fetales houines Serum
•		freides Dovines Serum
•		Farnesyldinhosphat Synthase
		Fast Protein Liquid Chromatography®
	FXR	FarnesvI-X-Rezentor"
	G6Pase	Glukose-6-Phosphat-Dehvdrogenase
	GC	Gaschromatographie
	GPAT	Glyzerol-3-Phosphat-Acyltransferase
•	HDI	Lipoprotein hoher Dichte (High Density Lipoprotein)
•	hGl	humane gastrische Lipase

•	HL	hepatische Lipase
•	hLAL	humane lysosomale Lipase
•	HMG-CoA-R	3-Hydroxy-3methylolutaryl-Coenzym-A-Reduktase
	HMG-CoA-S	3-Hydroxy-3 methylalutaryl-Coenzym-A-Synthase
		bonatiocher nukleärer Eakter 4 a
•		The particular multiple ratio $4\alpha$
•	IDL	Lipoprotein mittierer Dichte (Intermediate Density Lipoprotein)
•	Ig	Immunglobulin
•	kDA	Kilodalton
•	LAL	saure lysosomale Lipase
•	LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
•	LDL	Lipoprotein geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)
•	LDL-R	L DL-Rezeptor
•		
		I DI -Rezentor-related Protein
		Lober V Dezenter
•		Lebel-A-Rezeptor
•		
•	MLAL	iysosomale Lipase der Maus
•	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
•	MTP	mikrosomales Triglyzerid-Transferprotein
•	NPC1	Niemann-Pick C1 Protein
٠	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
•	PCR	Polymerasekettenreaktion
•	PLTP	Phospholipid-Transferprotein
•	PPAR	peroxisomale Proliferatoren-aktivierter Rezeptor
•	PRE	PPAR-responsives Elementen
•	PXR	Pregnant-X-Rezeptor
•	RAP	Rezeptorassoziertes Protein
•	rER	rauhes endoplasmatischen Retikulums
•	rl Al	saure lysosomale Linase der Ratte
	rll	linguale Linase der Ratte
		Robinskielijsaule Potincid X Pozontor"
•		Relinoid-A-Rezeptor
•		Sile-1 Protease
•	52P	Sile-2 Protease
•	SCAP	SREBP Cleavage-activating Protein
•	SCD1	Stearyl-CoA-Desaturase 1
•	SCP2	Sterol-Carrier Protein 2
•	sPGL	prägastrische Lipase des Schafes
•	SR-BI	Scavanger Rezeptor BI
٠	SRE	Sterol-responsives Elemente
•	SREBP	Sterol-responsives Element-bindendes Protein
•	SS	Squalen-Synthase
•	StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
•	SV 40	Simianvirus 40
•	ТВЕ	Trisbase-Borsäure-Ethylendiamin-tetraessigsäure
•	TD	Tangier Disease
•	TE	Tris-HCI-Ethylendiamintetraessiosäure
•	TEMED	Tetramethylethylendiamin
•	ta	transgen
•	чэ ТС	Trialyzeride
-		Linoprotain sehr geringer Dichte (Very Low Density Linoprotain)
-		Welmen'sete Krenkheit
•	VVD	

• wt wildtyp

Internationale SI-Einheiten und Abkürzungen des Dudens wurden nicht aufgeführt

## 7.3 Literaturverzeichnis

Aaij, C. & Borst, P. 1972. The gel electrophoresis of DNA. Biochim. Biophys. Acta 269: 192-200.

- Abramov, G., Schorr, S. & Wolman, M. 1956. Generalized xanthomatosis with calcified adrenals. *Am J Dis Child* 91: 282-286.
- Agellon, L. B. & Torchia, E. C. 2000. Intracellular transport of bile acids. Biochim. Biophys. Acta 1486: 198-209.
- Ameis, D., Brockmann, G., Knoblich, R., Merkel, M., Ostlund, R. E., Yang, J. W., Coates, P. M., Cortner, J. A., Feinman, S. V. & Greten, H. 1995. A 5' splice-region mutation and a dinucleotide deletion in the lysosomal acid lipase gene in two patients with cholesteryl ester storage disease. *Journal of Lipid Research* 36: 241-250.
- Ameis, D., Merkel, M., Eckerskorn, C. & Greten, H. 1994. Purification, characterization and molecular cloning of human hepatic lysosomal acid lipase. *European Journal of Biochemistry* 219: 905-914.
- Anderson, R. A., Bryson, G. M. & Parks, J. S. 1999. Lysosomal acid lipase mutations that determine phenotype in Wolman and cholesterol ester storage disease. *Mol. Genet. Metab* 68: 333-345.
- Anderson, R. A., Byrum, R. S., Coates, P. M. & Sando, G. N. 1994. Mutations at the lysosomal acid cholesteryl ester hydrolase gene locus in Wolman disease. *Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America* 91: 2718-2722.
- Anderson, R. A. & Sando, G. N. 1991. Cloning and expression of cDNA encoding human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase. *Journal of Biological Chemistry* 266: 22479-22484.
- Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C. & Zenke, M. 1987. Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 15: 4593-4602.
- Ansorge, W., Sproat, B. S., Stegemann, J. & Schwager, C. 1986. A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *J. Biochem. Biophys. Methods* 13: 315-323.
- Antonian, E. 1988. Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. *Lipids* 23: 1101-1106.
- Arakane, F., Kallen, C. B., Watari, H., Foster, J. A., Sepuri, N. B., Pain, D., Stayrook, S. E., Lewis, M., Gerton, G. L. & Strauss, J. F., III 1998. The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR).
  StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis. J. Biol. Chem. 273: 16339-16345.
- Archer, T. K., Tam, S. P. & Deeley, R. G. 1986. Kinetics of estrogen-dependent modulation of apolipoprotein A-I synthesis in human hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 261: 5067-5074.
- Aslanidis, C., Klima, H., Lackner, K. J. & Schmitz, G. 1994. Genomic organization of the human lysosomal acid lipase gene (LIPA). *Genomics* 20: 329-331.
- Aslanidis, C., Ries, S., Fehringer, P., Büchler, C., Klima, H. & Schmitz, G. 1996. Genetic and biochemical evidence that CESD and Wolman disease are distinguished by residual lysosomal lipase activity. *Genomics* 33: 85-93.
- Assmann, G. 1982. Lipidstoffwechsel und Atherosklerose. Schattauer, Stuttgart.
- Assmann, G. & Seedorf, U. 2002. Acid lipase deficiency: Wolman's disease and cholesteryl ester storage disease. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. & Vallee, L. (eds.) *The Metabolic and Molecular Bases* of Inherited Disease, pp. 3551-3573. McGraw Hill, New York.
- Aubert, R., Perdereau, D., Roubiscoul, M., Herzog, J. & Lemonnier, D. 1988. Genetic variations in serum lipid levels of inbred mice and response to hypercholesterolemic diet. *Lipids* 23: 48-54.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. H. & Struhl, K. 1994. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Assiciates and Wiley-Interscience, New York.

- Baranski, T. J., Cantor, A. B. & Kornfeld, S. 1992. Lysosomal enzyme phosphorylation. I. Protein recognition determinants in both lobes of procathepsin D mediate its interaction with UDP-GlcNAc: lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *Journal of Biological Chemistry* 267: 23342-23348.
- Barrans, A., Collet, X., Barbaras, R., Jaspard, B., Manent, J., Vieu, C., Chap, H. & Perret, B. 1994. Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J. Biol. Chem.* 269: 11572-11577.
- Barrans, A., Jaspard, B., Barbaras, R., Chap, H., Perret, B. & Collet, X. 1996. Pre-beta HDL: structure and metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1300: 73-85.
- Beisiegel, U. 1992. Apolipoproteins as ligands for lipoprotein receptors. In: Rosseneu, M. (ed.) *Structure and function of apolipoproteins*, pp. 269-292. CRC Press, Boca Raton.
- Beisiegel, U. 1995. Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology* 6: 117-122.
- Beisiegel, U., Krapp, A., Weber, W. & Olivecrona, G. 1994. The role of alpha 2M receptor/LRP in chylomicron remnant metabolism. *Annals of the New York Academy of sciences* 737: 53-69.
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. & Stanley, K. K. 1989. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341: 162-164.
- Belfrage, P. & Vaughan, M. 1969. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labled oleic acid from mixtures with glycerides. *J Lipid Res* 10: 341-344.
- Bennett, A. J., Bruce, J. S., Salter, A. M., White, D. A. & Billett, M. A. 1996. Hepatic microsomal triglyceride transfer protein messenger RNA concentrations are increased by dietary cholesterol in hamsters. *FEBS Lett.* 394: 247-250.
- Bennett, M. K., Lopez, J. M., Sanchez, H. B. & Osborne, T. F. 1995. Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways. *J. Biol. Chem.* 270: 25578-25583.
- Berger, J. & Moller, D. E. 2002. The mechanisms of action of PPARs. Annu. Rev. Med. 53: 409-435.
- Bernard, D. W., Rodriguez, A., Rothblat, G. H. & Glick, J. M. 1990. Influence of high density lipoprotein on esterified cholesterol stores in macrophages and hepatoma cells. *Arteriosclerosis* 10: 135-144.
- Bernard, D. W., Rodriguez, A., Rothblat, G. H. & Glick, J. M. 1991. cAMP stimulates cholesteryl ester clearance to high density lipoproteins in J7774 macrophages. *J. Biol. Chem.* 266: 710-716.
- Berthou, L., Duverger, N., Emmanuel, F., Langouet, S., Auwerx, J., Guillouzo, A., Fruchart, J. C., Rubin, E., Denefle, P., Staels, B. & Branellec, D. 1996. Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J. Clin. Invest* 97: 2408-2416.
- Berthou, L., Staels, B., Saldicco, I., Berthelot, K., Casey, J., Fruchart, J. C., Denefle, P. & Branellec, D. 1994. Opposite in vitro and in vivo regulation of hepatic apolipoprotein A-I gene expression by retinoic acid. Absence of effects on apolipoprotein A-II gene expression. *Arterioscler. Thromb.* 14: 1657-1664.
- Bocan, T. M., Mueller, S. B., Uhlendorf, P. D., Newton, R. S. & Krause, B. R. 1991. Comparison of CI-976, an ACAT inhibitor, and selected lipid-lowering agents for antiatherosclerotic activity in iliac-femoral and thoracic aortic lesions. A biochemical, morphological, and morphometric evaluation. *Arterioscler. Thromb.* 11: 1830-1843.
- Bonner, M. J., Miller, B. F. & Kothari, H. V. 1972. Lysosomal enzymes in aortas of species susceptible and resistant to atherosclerosis. *Proceeding of the Society of Experimental Biology and Medicine* 139: 1359-1352.
- Bose, H., Lingappa, V. R. & Miller, W. L. 2002. Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import. *Nature* 417: 87-91.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L. & Menge, U. 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343: 767-770.
- Brecher, P., Pyun, H. Y. & Chobanian, A. V. 1977. Effect of atherosclerosis on lysosomal cholesterol esterase activity in rabbit aorta. *J. Lipid Res.* 18: 154-163.
- Bremer, J. & Norum, K. R. 1982. Metabolism of very long-chain monounsaturated fatty acids (22:1) and the adaptation to their presence in the diet. *J. Lipid Res.* 23: 243-256.
- Breslow, J. L. 1989. Genetic basis of lipoprotein disorders. Journal Of Clinical Investigation 84: 373-380.
- Brooks, B. & Weinhold, P. A. 1986. The activity and properties of an acidic triacylglycerol lipase from adult and fetal rat lung. *Biochim Biophys Acta* 875: 39-47.
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1983a. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 223-261.
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1983b. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J. Clin. Invest* 72: 743-747.
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47.
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-340.
- Brown, M. S., Ho, Y. K. & Goldstein, J. L. 1980. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterifaction of cytoplasmic cholesteryl esters. *Journal of Biological Chemistry* 255: 9344-9352.
- Brown, M. S., Kovanen, P. T. & Goldstein, J. L. 1979. Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Progress in Hormone Research* 35: 215-257.
- Brown, M. S., Kovanen, P. T. & Goldstein, J. L. 1981. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 212: 628-635.
- Brown, M. S., Sabhani, M. K., Braunschede, G. Y. & Golstein, J. S. 1976. Restoration of a regulatory response to low density lipoproteins in acid lipase-deficient human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 251: 3277-3286.
- Brown, W. J. & Sgoutas, D. S. 1980. Purification of rat liver lysosomal cholesteryl ester hydrolase. *Biochim Biophys Acta* 617: 305-317.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S. A. & Thim, L. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* 351: 491-494.
- Brzozowski, A. M., Savage, H., Verma, C. S., Turkenburg, J. P., Lawson, D. M., Svendsen, A. & Patkar, S. 2000. Structural origins of the interfacial activation in Thermomyces (Humicola) lanuginosa lipase. *Biochemistry* 39: 15071-15082.
- Burant, C. F., Sreenan, S., Hirano, K., Tai, T. A., Lohmiller, J., Lukens, J., Davidson, N. O., Ross, S. & Graves, R. A. 1997. Troglitazone action is independent of adipose tissue. *J. Clin. Invest* 100: 2900-2908.
- Burke, J. A. & Schubert, W. K. 1972. Deficient activity of hepatic acid lipase in cholesterol ester storage disease. *Science* 176: 309-310.
- Burton, B. K. & Mueller, H. W. 1980. Purification and properties of human placental acid lipase. 618.
- Carr, T. P., Andresen, C. J. & Rudel, L. L. 1993. Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin. Biochem.* 26: 39-42.
- Castle, C. K., Pape, M. E., Marotti, K. R. & Melchior, G. W. 1991. Secretion of pre-beta-migrating apoA-I by cynomolgus monkey hepatocytes in culture. *J. Lipid Res.* 32: 439-447.

- Chang, B. H., Liao, W., Li, L., Nakamuta, M., Mack, D. & Chan, L. 1999. Liver-specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse. J. Biol. Chem. 274: 6051-6055.
- Chang, C. C., Lee, C. Y., Chang, E. T., Cruz, J. C., Levesque, M. C. & Chang, T. Y. 1998. Recombinant acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) purified to essential homogeneity utilizes cholesterol in mixed micelles or in vesicles in a highly cooperative manner. *J. Biol. Chem.* 273: 35132-35141.
- Chang, T. Y., Chang, C. C. & Cheng, D. 1997. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. Annu. Rev. Biochem. 66: 613-638.
- Chao, H., Zhou, M., McIntosh, A., Schroeder, F. & Kier, A. B. 2003. ACBP and cholesterol differentially alter fatty acyl CoA utilization by microsomal ACAT. *J. Lipid Res.* 44: 72-83.
- Chatterjee, B., Song, C. S., Jung, M. H., Chen, S., Walter, C. A., Herbert, D. C., Weaker, F. J., Mancini, M. A. & Roy, A. K. 1996. Targeted overexpression of androgen receptor with a liver-specific promoter in transgenic mice. *Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America* 93: 728-733.
- Chiang, J. Y. 2003. Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Bile acids and nuclear receptors. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 284: G349-G356.
- Clay, M. A. & Barter, P. J. 1996. Formation of new HDL particles from lipid-free apolipoprotein A-I. J. Lipid Res. 37: 1722-1732.
- Clay, M. A., Newnham, H. H., Forte, T. M. & Barter, P. I. 1992. Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase activity promote shedding of apo A-I from HDL and subsequent formation of discoidal HDL. *Biochim. Biophys. Acta* 1124: 52-58.
- Coates, P. M., Langer, T. & Cortner, J. A. 1986. Genetic variation of human mononuclear leukocyte lysosomal acid lipase activity. Relationship to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 62: 11-20.

Cohen, J. C. 2003. Endothelial lipase: direct evidence for a role in HDL metabolism. J. Clin. Invest 111: 318-321.

- Cooper, A. D. 1990. Hepatic lipoprotein and cholesterol metabolism. In: Zakim, D. & Boyer, T. D. (eds.) *Hepatology. A textbook of liver disease*, pp. 96-123. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Craigen, W. 2001. Mouse Models of Human Genetic Disorders. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. & Vallee, L. (eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, pp. 379-416. McGraw Hill, New York.
- Crocker, A. C., Vawter, G. F., Neuhauser, E. & Rosowsky, A. 1965. Wolman's disease: Three new patients with a recently described lipidosis. *Pediatr Res* 35: 627-640.
- Curtiss, L. K. 2000. ApoE in atherosclerosis : a protein with multiple hats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1852-1853.
- Cygler, M., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M. K. & Doctor, B. P. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci.* 2: 366-382.
- Danielsen, E. M., Hansen, G. H. & Poulsen, M. D. 1993. Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J. Cell Biol.* 120: 1347-1356.
- Davidson, N. O. & Shelness, G. S. 2000. Apolipoprotein B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 169-193.

Davis, R. A. & Boogaerts, J. R. 1982. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Effect of fatty acids on triacylglycerol and apolipoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 257: 10908-10913.

- de Craemer, D., Vamecq, J., Roels, F., Vallee, L., Pauwels, M. & Van den, B. C. 1994. Peroxisomes in liver, heart, and kidney of mice fed a commercial fish oil preparation: original data and review on peroxisomal changes induced by high-fat diets. *J. Lipid Res.* 35: 1241-1250.
- de Duve, C. 1974. The participation of lysosomes in the transformation of smooth muscle cells to foamy cells in the aorta of cholesterol-fed rabbits. *Acta Cardiol.* Suppl 20: 9-25.

de Duve, C. 1975. Exploring cells with a centrifuge. Science 189: 186-194.

- DeLamatre, J. G., Schilleci, J. T. & Hanson, L. H. 1996. Influence of dietary fat on the effect of endotoxin on murine hepatic peroxisomes. *Hepatology* 24: 592-595.
- Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M. & Derewenda, Z. S. 1992. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* 31: 1532-1541.
- Desnick, R. J. 2001. Enzyme replacement and beyond. J. Inherit. Metab Dis. 24: 251-265.
- Desnick, R. J. & Schuchman, E. H. 2002. Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nat. Rev. Genet.* 3: 954-966.
- Dixon, J. L., Furukawa, S. & Ginsberg, H. N. 1991. Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from Hep G2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B. J. Biol. Chem. 266: 5080-5086.
- Dixon, J. L. & Ginsberg, H. N. 1993. Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. *J. Lipid Res.* 34: 167-179.
- Djouadi, F., Weinheimer, C. J., Saffitz, J. E., Pitchford, C., Bastin, J., Gonzalez, F. J. & Kelly, D. P. 1998. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator- activated receptor alpha- deficient mice. *J. Clin. Invest* 102: 1083-1091.
- Doi, O., Doi, F., Schroeder, F., Alberts, A. W. & Vagelos, P. R. 1978. Manipulation of fatty acid composition of membrane phospholipid and its effects on cell growth in mouse LM cells. *Biochim. Biophys. Acta* 509: 239-250.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. & Wahli, W. 1992. Control of the peroxisomal betaoxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68: 879-887.
- Du, E. Z., Fleming, J. F., Wang, S. L., Spitsen, G. M. & Davis, R. A. 1999. Translocation-arrested apolipoprotein B evades proteasome degradation via a sterol-sensitive block in ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* 274: 1856-1862.
- Du, H., Duanmu, M., Witte, D. & Grabowski, G. A. 1998a. Targeted disruption of the mouse lysosomal acid lipase gene: long-term survival with massive cholesteryl ester and triglyceride storage. *Human Molecular Genetics* 7: 1347-1354.
- Du, H., Heur, M., Duanmu, M., Grabowski, G. A., Hui, D. Y., Witte, D. P. & Mishra, J. 2001a. Lysosomal acid lipase-deficient mice: depletion of white and brown fat, severe hepatosplenomegaly, and shortened life span. J. Lipid Res. 42: 489-500.
- Du, H., Heur, M., Witte, D. P., Ameis, D. & Grabowski, G. A. 2002. Lysosomal acid lipase deficiency: correction of lipid storage by adenovirus-mediated gene transfer in mice. *Hum. Gene Ther.* 13: 1361-1372.
- Du, H., Sheriff, S., Bezerra, J., Leonova, T. & Grabowski, G. A. 1998b. Molecular and enzymatic analyses of lysosomal acid lipase in cholesteryl ester storage disease. *Mol. Genet. Metab* 64: 126-134.
- Du, H., Witte, D. P. & Grabowski, G. A. 1996. Tissue and cellular specific expression of murine lysosomal acid lipase mRNA and protein. *Journal of Lipid Research* 37: 937-949.
- Du, H., Schiavi, S., Levine, M., Mishra, J., Heur, M. & Grabowski, G. A. 2001b. Enzyme therapy for lysosomal acid lipase deficiency in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 10: 1639-1648.
- Dueland, S., France, D., Wang, S. L., Trawick, J. D. & Davis, R. A. 1997. Cholesterol 7alpha-hydroxylase influences the expression of hepatic apoA-I in two inbred mouse strains displaying different susceptibilities to atherosclerosis and in hepatoma cells. J. Lipid Res. 38: 1445-1453.
- Duplus, E. & Forest, C. 2002. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem. Pharmacol.* 64: 893-901.
- Edwards, P. A., Kast, H. R. & Anisfeld, A. M. 2002a. BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J. Lipid Res.* 43: 2-12.

- Edwards, P. A., Kennedy, M. A. & Mak, P. A. 2002b. LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul. Pharmacol.* 38: 249-256.
- Eisenberg, S. 1984. High density lipoprotein metabolism. J. Lipid Res. 25: 1017-1058.
- Elshourbagy, N. A., Liao, W. S., Mahley, R. W. & Taylor, J. M. 1985. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82: 203-207.
- Erickson, A. H. & Blobel, G. 1983. Carboxyl-terminal proteolytic processing during biosynthesis of the lysosomal enzymes beta-glucuronidase and cathepsin D. *Biochemistry* 22: 5201-5205.
- Ericsson, J., Jackson, S. M., Kim, J. B., Spiegelman, B. M. & Edwards, P. A. 1997. Identification of glycerol-3phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. J. Biol. Chem. 272: 7298-7305.
- Ericsson, J., Jackson, S. M., Lee, B. C. & Edwards, P. A. 1996. Sterol regulatory element binding protein binds to a cis element in the promoter of the farnesyl diphosphate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93: 945-950.
- Escary, J. L., Choy, H. A., Reue, K., Wang, X. P., Castellani, L. W., Glass, C. K., Lusis, A. J. & Schotz, M. C. 1999. Paradoxical effect on atherosclerosis of hormone-sensitive lipase overexpression in macrophages. *J. Lipid Res.* 40: 397-404.
- Escola-Gil, J. C., Julve, J., Marzal-Casacuberta, A., Ordonez-Llanos, J., Gonzalez-Sastre, F. & Blanco-Vaca, F. 2001. ApoA-II expression in CETP transgenic mice increases VLDL production and impairs VLDL clearance. J. Lipid Res. 42: 241-248.
- Faust, J. R., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 1977. Receptor-mediated uptake of low density lipoproteins and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured mouse adrenal cells. *Journal of Biological Chemistry* 252: 4861-4871.
- Fazio, S. & Yao, Z. 1995. The enhanced association of apolipoprotein E with apolipoprotein B-containing lipoproteins in serum-stimulated hepatocytes occurs intracellularly. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 593-600.
- Fielding, C. J. & Fielding, P. E. 1995a. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 36: 211-228.
- Fielding, C. J. & Fielding, P. E. 1995b. Role of an N-ethylmaleimide-sensitive factor in the selective cellular uptake of low-density lipoprotein free cholesterol. *Biochemistry* 34: 14237-14244.
- Fink, L., Seeger, W., Ermert, L., Hanze, J., Stahl, U., Grimminger, F., Kummer, W. & Bohle, R. M. 1998. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat. Med.* 4: 1329-1333.
- Fisher, E. A., Zhou, M., Mitchell, D. M., Wu, X., Omura, S., Wang, H., Goldberg, A. L. & Ginsberg, H. N. 1997. The degradation of apolipoprotein B100 is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway and involves heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.* 272: 20427-20434.
- Flatmark, T., Nilsson, A., Kvannes, J., Eikhom, T. S., Fukami, M. H., Kryvi, H. & Christiansen, E. N. 1988. On the mechanism of induction of the enzyme systems for peroxisomal beta-oxidation of fatty acids in rat liver by diets rich in partially hydrogenated fish oil. *Biochim. Biophys. Acta* 962: 122-130.
- Fluiter, K., van der Westhuijzen, D. R. & van Berkel, T. J. 1998. In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J. Biol. Chem.* 273: 8434-8438.
- Forester, G. P., Tall, A. R., Bisgaier, C. L. & Glickman, R. M. 1983. Rat intestine secretes spherical high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 258: 5938-5943.
- Forte, T. M., Nichols, A. V., Selmek-Halsey, J., Caylor, L. & Shore, V. G. 1987. Lipid-poor apolipoprotein A-I in Hep G2 cells: formation of lipid-rich particles by incubation with dimyristoylphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 920: 185-194.
- Fowler, S. D. & Brown, W. J. 1984. Lysosomal acid lipase. In: Borgström, B. & Brockman, H. L. (eds.) *Lipases*, pp. 329-364. Elsevier, New York.

- Francone, O. L., Royer, L. & Haghpassand, M. 1996. Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCATmediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *J. Lipid Res.* 37: 1268-1277.
- Fredrickson, D. S. 1963. Newly recognized disorders of cholesterol metabolism. Ann Intern Med 58: 718-723.
- Fredrickson, D. S., Sloan, H. R., Ferrans, V. J. & Demoski, S. J., Jr. 1972. Cholesteryl ester storage disease: A most unusual manifestation of deficiency of two lysosomal enzymes activities. *Transactions of the Association of American Physicians* 85: 109-119.
- Frolov, A., Woodford, J. K., Murphy, E. J., Billheimer, J. T. & Schroeder, F. 1996. Spontaneous and proteinmediated sterol transfer between intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* 271: 16075-16083.
- Gabel, C. A. & Foster, S. A. 1987. Postendocytic maturation of acid hydrolases: evidence of prelysosomal processing. *Journal of Cell Biology* 105: 1561-1570.
- Gabig, T. G. & Babior, B. M. 1981. The killing of pathogens by phagocytes. Annu. Rev. Med. 32: 313-326.
- Gasche, C., Aslanidis, C., Kain, R., Exner, M., Helbich, T., Dejaco, C., Schmitz, G. & Ferenci, P. 1997. A novel variant of lysosomal acid lipase in cholesteryl ester storage disease associated with mild phenotype and improvement on lovastatin. *Journal of Hepatology* 27: 744-750.
- Gay, E., Seurin, D., Babajko, S., Doublier, S., Cazillis, M. & Binoux, M. 1997. Liver-specific expression of human insulin-like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: repercussions on reproduction, ante- and perinatal mortality and postnatal growth. *Endocrinology* 138: 2937-2947.
- Ge, R. 1999. Genetically manipulated animals and their use in experimental research. Ann. Acad. Med. Singapore 28: 560-564.
- Ge, R., Rhee, M., Malik, S. & Karathanasis, S. K. 1994. Transcriptional repression of apolipoprotein AI gene expression by orphan receptor ARP-1. *J. Biol. Chem.* 269: 13185-13192.
- Genest, J. J., Jr., Martin-Munley, S. S., McNamara, J. R., Ordovas, J. M., Jenner, J., Myers, R. H., Silberman, S. R., Wilson, P. W., Salem, D. N. & Schaefer, E. J. 1992. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 85: 2025-33.
- Genest, J. J., McNamara, J. R., Salem, D. N. & Schaefer, E. J. 1991. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 67: 1185-1189.
- Gibbons, G. F. 1990. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. Biochem. J. 268: 1-13.
- Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A. & von Figura, K. 1983. Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* 97: 1-5.
- Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-430.
- Goldstein, J. L., Dana, S. E., Faust, J. R., Beaudet, A. L. & Brown, M. S. 1975. Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 250: 8487-8795.
- Gottlicher, M., Widmark, E., Li, Q. & Gustafsson, J. A. 1992. Fatty acids activate a chimera of the clofibric acidactivated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89: 4653-4657.
- Gottschalk, S., Waheed, A., Schmidt, B., Laidler, P. & v Figura, K. 1989. Sequential processing of lysosomal acid phosphatase by a cytoplasmic thiol proteinase and a lysosomal aspartyl proteinase. *EMBO Journal* 11: 3215-3219.
- Granfone, A., Campos, H., McNamara, J. R., Schaefer, M. M., Lamon-Fava, S., Ordovas, J. M. & Schaefer, E. J. 1992. Effects of estrogen replacement on plasma lipoproteins and apolipoproteins in postmenopausal, dyslipidemic women. *Metabolism* 41: 1193-1198.
- Green, P. H., Tall, A. R. & Glickman, R. M. 1978. Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein. J. Clin. Invest 61: 528-534.

- Greeve, J., Altkemper, I., Dieterich, J. H., Greten, H. & Windler, E. 1993. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. J. Lipid Res. 34: 1367-1383.
- Grefhorst, A., Elzinga, B. M., Voshol, P. J., Plosch, T., Kok, T., Bloks, V. W., van der Sluijs, F. H., Havekes, L. M., Romijn, J. A., Verkade, H. J. & Kuipers, F. 2002. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 277: 34182-34190.
- Groener, J. E., Bax, W., Stuani, C. & Pagani, F. 2000. Difference in substrate specificity between human and mouse lysosomal acid lipase: low affinity for cholesteryl ester in mouse lysosomal acid lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 1487: 155-162.
- Grosser, J., Schrecker, O. & Greten, H. 1981. Function of hepatic triglyceride lipase in lipoprotein metabolism. Journal of Lipid Research 22: 437-442.
- Guan, G., Dai, P. & Shechter, I. 1998. Differential transcriptional regulation of the human squalene synthase gene by sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) 1a and 2 and involvement of 5' DNA sequence elements in the regulation. J. Biol. Chem. 273: 12526-12535.
- Hagemenas, F. C., Manaugh, L. C., Illingworth, D. R., Sundberg, E. E. & Yatsu, F. M. 1984. Cholesteryl ester hydrolase activity in mononuclear cells from patients with type II hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 50: 335-344.
- Haley, N. J., Fowler, S. & de Duve, C. 1980. Lysosomal acid cholesterol esterase activity in normal and lipidladen aortic cells. *Journal of Lipid Research* 21: 961-969.
- Hall, P. F. & Almahbobi, G. 1997. Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 36: 463-479.
- Harnish, D. C., Evans, M. J., Scicchitano, M. S., Bhat, R. A. & Karathanasis, S. K. 1998. Estrogen regulation of the apolipoprotein AI gene promoter through transcription cofactor sharing. *J. Biol. Chem.* 273: 9270-9278.
- Harnish, D. C., Malik, S. & Karathanasis, S. K. 1994. Activation of apolipoprotein AI gene transcription by the liver-enriched factor HNF-3. *J. Biol. Chem.* 269: 28220-28226.
- Harnish, D. C., Malik, S., Kilbourne, E., Costa, R. & Karathanasis, S. K. 1996. Control of apolipoprotein AI gene expression through synergistic interactions between hepatocyte nuclear factors 3 and 4. *J. Biol. Chem.* 271: 13621-13628.
- Havel, R. J. & Hamilton, R. L. 1988. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology* 8: 1689-1704.
- Hayhurst, G. P., Lee, Y. H., Lambert, G., Ward, J. M. & Gonzalez, F. J. 2001. Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell Biol.* 21: 1393-1403.
- Heeren, J., Grewal, T., Jackle, S. & Beisiegel, U. 2001. Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J. Biol. Chem.* 276: 42333-42338.
- Heeren, J., Grewal, T., Laatsch, A., Rottke, D., Rinninger, F., Enrich, C. & Beisiegel, U. 2003. Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J. Biol. Chem.* 278: 14370-14378.
- Heeren, J., Niemeier, A., Merkel, M. & Beisiegel, U. 2002. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. J. Mol. Med. 80: 576-584.
- Heeren, J., Weber, W. & Beisiegel, U. 1999. Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 3): 349-359.
- Hennessy, L. K., Kunitake, S. T. & Kane, J. P. 1993. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins, with or without apolipoprotein A-II, as progenitors of pre-beta high-density lipoprotein particles. *Biochemistry* 32: 5759-5765.

- Henze, K. & Chait, A. 1981. Lysosomal enzyme activities and low density lipoprotein receptors in circulating mononuclear cells. Effect of insulin therapy in diabetic patients. *Diabetologia* 20: 625-629.
- Hertz, R., Magenheim, J., Berman, I. & Bar-Tana, J. 1998. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* 392: 512-516.
- Hide, W. A., Chan, L. & Li, W. H. 1992. Structure and evolution of the lipase superfamily. *Journal of Lipid Research* 33: 167-178.
- Higuchi, K., Law, S. W., Hoeg, J. M., Schumacher, U. K., Meglin, N. & Brewer, H. B., Jr. 1988. Tissue-specific expression of apolipoprotein A-I (ApoA-I) is regulated by the 5'-flanking region of the human ApoA-I gene. *J. Biol. Chem.* 263: 18530-18536.
- Holmquist, M. 2000. Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1: 209-235.
- Horton, J. D. 2002. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 1091-1095.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 2002a. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest* 109: 1125-1131.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 2002b. SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 67: 491-498.
- Huang, Y., von Eckardstein, A. & Assmann, G. 1993. Cell-derived unesterified cholesterol cycles between different HDLs and LDL for its effective esterification in plasma. *Arterioscler. Thromb.* 13: 445-458.
- Huang, Y., von Eckardstein, A., Wu, S. & Assmann, G. 1995. Cholesterol efflux, cholesterol esterification, and cholesteryl ester transfer by LpA-I and LpA-I/A-II in native plasma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 1412-1418.
- Hussain, M. M., Kancha, R. K., Zhou, Z., Zu, H. & Bakillah, A. 1996. Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim Biophys Acta* 1300: 151-170.
- Ikemoto, S., Takahashi, M., Tsunoda, N., Maruyama, K., Itakura, H., Kawanaka, K., Tabata, I., Higuchi, M., Tange, T., Yamamoto, T. T. & Ezaki, O. 1997. Cholate inhibits high-fat diet-induced hyperglycemia and obesity with acyl-CoA synthetase mRNA decrease. *Am. J. Physiol* 273: E37-E45.
- Ikonen, E. & Parton, R. G. 2000. Caveolins and cellular cholesterol balance. Traffic. 1: 212-217.
- Illingworth, D. R. 1993. Lipoprotein metabolism. Am J Kidney Dis 22: 90-97.
- Imanaka, T., Amanuma-Muto, K., Ohkuma, S. & Takano, T. 1984. Characterization of lysosomal acid lipase purified from rabbit liver. *Journal of Biochemistry* 96: 1089-1101.
- Infante, R., Polonovski, J. & Caroli, J. 1967. Polycorie cholésterique de l'adulte. II. Étude biochimique. *Presse Medicale* 75: 2829-2832.
- Ishida, B. Y., Albee, D. & Paigen, B. 1990. Interconversion of prebeta-migrating lipoproteins containing apolipoprotein A-I and HDL. *J. Lipid Res.* 31: 227-236.
- Ishida, B. Y., Blanche, P. J., Nichols, A. V., Yashar, M. & Paigen, B. 1991. Effects of atherogenic diet consumption on lipoproteins in mouse strains C57BL/6 and C3H. *J. Lipid Res.* 32: 559-568.
- Ishida, T., Choi, S., Kundu, R. K., Hirata, K., Rubin, E. M., Cooper, A. D. & Quertermous, T. 2003. Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. *J. Clin. Invest* 111: 347-355.
- Issemann, I. & Green, S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650.
- Jackerott, M., Baudry, A., Bucchini, D., Jami, J. & Joshi, R. L. 2002. Improved metabolic disorders of insulin receptor-deficient mice by transgenic overexpression of glucokinase in the liver. *Diabetologia* 45: 1292-1297.

- Jin, F. Y., Kamanna, V. S. & Kashyap, M. L. 1998. Estradiol stimulates apolipoprotein A-I- but not A-II-containing particle synthesis and secretion by stimulating mRNA transcription rate in Hep G2 cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 999-1006.
- Johnson, K. F., Hancock, L. W. & Dawson, G. 1991. Synthesis and processing of lysosomal alpha-fucosidase in cultured human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1073: 120-128.
- Johnson, M. R., Wang, K., Smith, J. B., Heslin, M. J. & Diasio, R. B. 2000. Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 278: 175-184.
- Joseph, S. B., Laffitte, B. A., Patel, P. H., Watson, M. A., Matsukuma, K. E., Walczak, R., Collins, J. L., Osborne, T. F. & Tontonoz, P. 2002. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. J. Biol. Chem. 277: 11019-11025.
- Jump, D. B. 2002. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* 13: 155-164.
- Jump, D. B. & Clarke, S. D. 1999. Regulation of gene expression by dietary fat. Annu. Rev. Nutr. 19: 63-90.
- Kahn, C. R. 1994. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43: 1066-1084.
- Kersten, S., Desvergne, B. & Wahli, W. 2000. Roles of PPARs in health and disease. Nature 405: 421-424.
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B. & Wahli, W. 1999. Peroxisome proliferatoractivated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest* 103: 1489-1498.
- Kesaniemi, Y. A. & Grundy, S. M. 1983. Increased low density lipoprotein production associated with obesity. *Arteriosclerosis* 3: 170-177.
- Kirchgessner, T. G., Chuat, J. C., Heinzmann, C., Etienne, J., Guilhot, S., Svenson, K., Ameis, D., Pilon, C., d'Auriol, L., Andalibi, A., Schotz, M. C., Galibert, F. & Lusis, A. J. 1989. Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America* 86: 9647-9651.
- Koo, C., Innerarity, T. L. & Mahley, R. W. 1985. Obligatory role of cholesterol and apolipoprotein E in the formation of large cholesterol-enriched and receptor-active high density lipoproteins. J. Biol. Chem. 260: 11934-11943.
- Koopmans, S. J., Jong, M. C., Que, I., Dahlmans, V. E., Pijl, H., Radder, J. K., Frolich, M. & Havekes, L. M. 2001. Hyperlipidaemia is associated with increased insulin-mediated glucose metabolism, reduced fatty acid metabolism and normal blood pressure in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *Diabetologia* 44: 437-443.
- Kornfeld, S. 1986. Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *Journal Of Clinical Investigation* 77: 1-6.
- Kostner, G. M. & März, W. 2001. Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In: Schwandt, P., Richter, P. O. & Parhofer, K. G. (eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, pp. 3-57. Schattauer, New York, Stuttgart.
- Kowal, R. C., Herz, J., Goldstein, J. L., Esser, V. & Brown, M. S. 1989. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86: 5810-5814.
- Kowal, R. C., Herz, J., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1990. Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 265: 10771-10779.
- Kraemer, F. B. 1992. Role of lipoprotein lipase and apolipoprotein E secretion by macrophages in modulating lipoprotein uptake. Possible role in acceleration of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* 41 Suppl 2: 77-80.
- Krieger, M. 1999. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 523-558.

- Krieger, M. & Herz, J. 1994. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* 63: 601-637.
- Krivit, W., Freese, D., Chan, K. W. & Kulkarni, R. 1992. Wolman's disease: a review of treatment with bone marrow transplantation and considerations for the future. *Bone Marrow Transplantation* 10: 97-101.
- Krivit, W., Peters, C., Dusenbery, K., Ben Yoseph, Y., Ramsay, N. K., Wagner, J. E. & Anderson, R. 2000. Wolman disease successfully treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 26: 567-570.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M. & Rajewsky, K. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427-1429.
- Künnert, B., Cossel, L. & Keller, E. 1979. Zur Diagnostik und Morphologie der Leber bei Cholesterolester-Speicherkrankheit. Lichtmikroskopische, histochromatographische und elektronenmikroskopische Untersuchungen. Zentralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie 123: 71-84.
- Kuriwaki, K. & Yoshida, H. 1999. Morphological characteristics of lipid accumulation in liver-constituting cells of acid lipase deficiency rats (Wolman's disease model rats). *Pathol. Int.* 49: 291-297.
- Kuriyama, M., Yoshida, H., Suzuki, M., Fujiyama, J. & Igata, A. 1990. Lysosomal acid lipase deficiency in rats: lipid analyses and lipase activities in liver and spleen. *Journal of Lipid Research* 31: 1605-1612.
- Ladias, J. A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V. & Cladaras, C. 1992. Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J. Biol. Chem.* 267: 15849-15860.
- Ladias, J. A. & Karathanasis, S. K. 1991. Regulation of the apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. *Science* 251: 561-565.
- Lageron, A., Caroli, J., Stralin, H. & Barbier, P. 1967. Polycorie cholésterique de l'adulte. I. Étude clinique, electronique, histochimique. *Presse Medicale* 75: 2785-2828.
- Lambe, K. G., Woodyatt, N. J., Macdonald, N., Chevalier, S. & Roberts, R. A. 1999. Species differences in sequence and activity of the peroxisome proliferator response element (PPRE) within the acyl CoA oxidase gene promoter. *Toxicol. Lett.* 110: 119-127.
- Landschulz, K. T., Pathak, R. K., Rigotti, A., Krieger, M. & Hobbs, H. H. 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest* 98: 984-995.
- Lang, L., Couso, R. & Kornfeld, S. 1986. Glycoprotein phosphorylation in simple eucaryotic organisms. Identification of UDP-GlcNAc:glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase activity and analysis of substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* 261: 6320-5.
- Lawn, R. M., Wade, D. P., Garvin, M. R., Wang, X., Schwartz, K., Porter, J. G., Seilhamer, J. J., Vaughan, A. M. & Oram, J. F. 1999. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J. Clin. Invest* 104: R25-R31.
- LeBoeuf, R. C., Doolittle, M. H., Montcalm, A., Martin, D. C., Reue, K. & Lusis, A. J. 1990. Phenotypic characterization of the Ath-1 gene controlling high density lipoprotein levels and susceptibility to atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 31: 91-101.
- Lepage, G. & Roy, C. C. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* 27: 114-120.
- Liang, H. Q., Rye, K. A. & Barter, P. J. 1994. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 35: 1187-1199.
- Liang, H. Q., Rye, K. A. & Barter, P. J. 1996. Remodelling of reconstituted high density lipoproteins by lecithin: cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.* 37: 1962-1970.
- Linden, D., Alsterholm, M., Wennbo, H. & Oscarsson, J. 2001. PPARalpha deficiency increases secretion and serum levels of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J. Lipid Res.* 42: 1831-1840.

- Linden, D., Sjoberg, A., Asp, L., Carlsson, L. & Oscarsson, J. 2000. Direct effects of growth hormone on production and secretion of apolipoprotein B from rat hepatocytes. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab 279: E1335-E1346.
- Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V., Jr., Ory, D. S. & Schaffer, J. E. 2003. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 3077-3082.
- Listenberger, L. L., Ory, D. S. & Schaffer, J. E. 2001. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramideindependent pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 14890-14895.
- Lopez, J. M., Bennett, M. K., Sanchez, H. B., Rosenfeld, J. M. & Osborne, T. E. 1996. Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* A 93: 1049-1053.
- Lowden, J. A., Barson, A. J. & Wentworth, P. 1970. Wolman's disease: a microscopic and biochemical study showing accumulation of ceroid and esterified cholesterol. *Canadian Medical Association Journal* 102: 402-5.
- Lusis, A. J. 2000. Atherosclerosis. Nature 407: 233-241.
- Magana, M. M., Koo, S. H., Towle, H. C. & Osborne, T. F. 2000. Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. J. Biol. Chem. 275: 4726-4733.
- Magana, M. M. & Osborne, T. F. 1996. Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J. Biol. Chem.* 271: 32689-32694.
- Mahley, R. W. & Ji, Z. S. 1999. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* 40: 1-16.
- Mayatepek, E., Seedorf, U., Wiebusch, H., Lenhartz, H. & Assmann, G. 1999. Fatal genetic defect causing Wolman disease. *J. Inherit. Metab Dis.* 22: 93-94.
- McCall, M. R., Forte, T. M. & Shore, V. G. 1988. Heterogeneity of nascent high density lipoproteins secreted by the hepatoma-derived cell line, Hep G2. *J. Lipid Res.* 29: 1127-1137.
- McCall, M. R., Nichols, A. V., Blanche, P. J., Shore, V. G. & Forte, T. M. 1989. Lecithin:cholesterol acyltransferase-induced transformation of HepG2 lipoproteins. *J. Lipid Res.* 30: 1579-1589.
- McCoy, E. & Yokoyama, S. 1991. Treatment of cholesteryl ester storage disease with combined cholestyramine and lovastatin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 623: 453-454.
- Memon, R. A., Fuller, J., Moser, A. H., Smith, P. J., Grunfeld, C. & Feingold, K. R. 1999. Regulation of putative fatty acid transporters and Acyl-CoA synthetase in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Diabetes* 48: 121-127.
- Mensenkamp, A. R., Jong, M. C., van Goor, H., van Luyn, M. J., Bloks, V., Havinga, R., Voshol, P. J., Hofker, M. H., van Dijk, K. W., Havekes, L. M. & Kuipers, F. 1999. Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. J. Biol. Chem. 274: 35711-35718.
- Merkel, M., Heeren, J., Dudeck, W., Rinninger, F., Radner, H., Breslow, J. L., Goldberg, I. J., Zechner, R. & Greten, H. 2002. Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. J. Biol. Chem. 277: 7405-7411.
- Merkel, M., Weinstock, P. H., Chajek-Shaul, T., Radner, H., Yin, B., Breslow, J. L. & Goldberg, I. J. 1998. Lipoprotein lipase expression exclusively in liver. A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. J. Clin. Invest 102: 893-901.
- Messieh, S., Clarke, J., Cook, H. W. & Spence, M. W. 1983. Abnormal neutral lipase activity in acid-lipasedeficient cultured human fibroblasts. *Pediatric Research* 17: 770-774.
- Michowitz, M., Gaton, E. & Wolman, M. 1977. Acid esterase activity in the pathogenesis of atherosclerosis: effect of partial aortic ligation in rabbits. *Isr. J. Med. Sci.* 13: 259-263.

- Miida, T., Kawano, M., Fielding, C. J. & Fielding, P. E. 1992. Regulation of the concentration of pre beta highdensity lipoprotein in normal plasma by cell membranes and lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *Biochemistry* 31: 11112-11117.
- Muller, U. 1999. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech. Dev.* 82: 3-21.
- Musliner, T. A., Long, M. D., Forte, T. M., Nichols, A. V., Gong, E. L., Blanche, P. J. & Krauss, R. M. 1991. Dissociation of high density lipoprotein precursors from apolipoprotein B-containing lipoproteins in the presence of unesterified fatty acids and a source of apolipoprotein A-I. J. Lipid Res. 32: 917-933.
- Nakagawa, H., Matsubara, S., Kuriyama, M., Yoshidome, H., Fujiyama, J., Yoshida, H. & Osame, M. 1995. Cloning of rat lysosomal acid lipase cDNA and identification of the mutation in the rat model of Wolman's disease. *Journal of Lipid Research* 36: 2212-2218.
- Neary, R., Bhatnagar, D., Durrington, P., Ishola, M., Arrol, S. & Mackness, M. 1991. An investigation of the role of lecithin:cholesterol acyltransferase and triglyceride-rich lipoproteins in the metabolism of pre-beta high density lipoproteins. *Atherosclerosis* 89: 35-48.
- Neat, C. E., Thomassen, M. S. & Osmundsen, H. 1980. Induction of peroxisomal beta-oxidation in rat liver by high-fat diets. *Biochem. J.* 186: 369-371.
- Neufeld, E. B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A. M., Dwyer, N. K., Roff, C. F., Ohno, K., Morris, J. A., Carstea, E. D., Incardona, J. P., Strauss, J. F., III, Vanier, M. T., Patterson, M. C., Brady, R. O., Pentchev, P. G. & Blanchette-Mackie, E. J. 1999. The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J. Biol. Chem.* 274: 9627-9635.
- Neufeld, E. F., Sando, G. N., Garvin, A. J. & Rowl, L. 1977. The transport of lysosomal enzymes. *Journal of Supramolecular Structure* 6: 95-101.
- Nishina, P. M., Lowe, S., Verstuyft, J., Naggert, J. K., Kuypers, F. A. & Paigen, B. 1993a. Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice. *J. Lipid Res.* 34: 1413-1422.
- Nishina, P. M., Verstuyft, J. & Paigen, B. 1990. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J. Lipid Res.* 31: 859-869.
- Nishina, P. M., Wang, J., Toyofuku, W., Kuypers, F. A., Ishida, B. Y. & Paigen, B. 1993b. Atherosclerosis and plasma and liver lipids in nine inbred strains of mice. *Lipids* 28: 599-605.
- Nohammer, C., Brunner, F., Wolkart, G., Staber, P. B., Steyrer, E., Gonzalez, F. J., Zechner, R. & Hoefler, G. 2003. Myocardial dysfunction and male mortality in peroxisome proliferator-activated receptor alpha knockout mice overexpressing lipoprotein lipase in muscle. *Lab Invest* 83: 259-269.
- Olivecrona, T. & Bengtsson-Olivecrona, G. 1993. Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Current Opinion in Lipidology* 4: 187-196.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J. & . 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* 5: 197-211.
- Olofsson, S. O., Asp, L. & Boren, J. 1999. The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 10: 341-346.
- Oram, J. F. & Yokoyama, S. 1996. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J. Lipid Res.* 37: 2473-2491.
- Osborne, T. F. 2000. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* 275: 32379-32382.
- Ou, J., Tu, H., Shan, B., Luk, A., DeBose-Boyd, R. A., Bashmakov, Y., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 2001. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98: 6027-6032.

- Pagani, F., Garcia, R., Pariyarath, R., Stuani, C., Gridelli, B., Paone, G. & F.E., B. 1996. Expression of lysosomal acid lipase mutants detected in three patients with cholesteryl ester storage disease. *Human Molecular Genetics* 5: 1611-1617.
- Pai, J. T., Guryev, O., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1998. Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins. J. Biol. Chem. 273: 26138-26148.
- Paigen, B. 1995. Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 458S-462S.
- Paigen, B., Ishida, B. Y., Verstuyft, J., Winters, R. B. & Albee, D. 1990. Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis* 10: 316-323.
- Patrick, A. D. & Lake, B. D. 1969. Deficiency of an acid lipase in Wolman's disease. Nature 222: 1067-1068.
- Paumen, M. B., Ishida, Y., Muramatsu, M., Yamamoto, M. & Honjo, T. 1997. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 3324-3329.
- Pawar, A., Xu, J., Jerks, E., Mangelsdorf, D. J. & Jump, D. B. 2002. Fatty acid regulation of liver X receptors (LXR) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* 277: 39243-39250.
- Phinney, S. D., Fisler, J. S., Tang, A. B. & Warden, C. H. 1994. Liver fatty acid composition correlates with body fat and sex in a multigenic mouse model of obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 60: 61-67.
- Pittman, R. C., Khoo, J. C. & Steinberg, D. 1975. Cholesterol esterase in rat adipose tissue and its activation by cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 250: 4505-4511.
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E. & Parton, R. G. 2001. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J. Cell Biol.* 152: 1057-1070.
- Raabe, M., Veniant, M. M., Sullivan, M. A., Zlot, C. H., Bjorkegren, J., Nielsen, L. B., Wong, J. S., Hamilton, R. L.
  & Young, S. G. 1999. Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. J. Clin. Invest 103: 1287-1298.
- Rassoul, F., Richter, V., Lohse, P., Naumann, A., Purschwitz, K. & Keller, E. 2001. Long-term administration of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin in two patients with cholesteryl ester storage disease. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 39: 199-204.
- Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1997. Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol. Cell* 1: 47-57.
- Read, J., Anderson, T. A., Ritchie, P. J., Vanloo, B., Amey, J., Levitt, D., Rosseneu, M., Scott, J. & Shoulders, C. C. 2000. A mechanism of membrane neutral lipid acquisition by the microsomal triglyceride transfer protein. *J. Biol. Chem.* 275: 30372-30377.
- Reddy, J. K. & Krishnakantha, T. P. 1975. Hepatic peroxisome proliferation: induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate. *Science* 190: 787-789.
- Redonnet-Vernhet, I., Chatelut, M., Salvayre, R. & Levade, T. 1998. A novel lysosomal acid lipase gene mutation in a patient with cholesteryl ester storage disease. *Human Mutation* 11: 335-336.
- Reihner, E. & Stahlberg, D. 1996. Lithogenic diet and gallstone formation in mice: integrated response of activities of regulatory enzymes in hepatic cholesterol metabolism. *Br. J. Nutr.* 76: 765-772.
- Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J. M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Mangelsdorf, D. J. 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 14: 2819-2830.
- Repa, J. J. & Mangelsdorf, D. J. 2000. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 459-481.

- Rich-Edwards, J. W. & Hennekens, C. H. 1996. Postmenopausal hormones and coronary heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.* 11: 440-446.
- Richo, G. R. & Conner, G. E. 1994. Structural requirements of procathepsin D activation and maturation. *Journal of Biological Chemistry* 269: 14806-14812.
- Ries, S., Buchler, C., Langmann, T., Fehringer, P., Aslanidis, C. & Schmitz, G. 1998. Transcriptional regulation of lysosomal acid lipase in differentiating monocytes is mediated by transcription factors Sp1 and AP-2. *J. Lipid Res.* 39: 2125-2134.
- Rigotti, A., Trigatti, B., Babitt, J., Penman, M., Xu, S. & Krieger, M. 1997. Scavenger receptor BI--a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.* 8: 181-188.
- Rinninger, F., Deichen, J. T., Jaeckle, S., Windler, E. & Greten, H. 1994. Selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters and high-density lipoprotein particle uptake by human monocytemacrophages. *Atherosclerosis* 105: 145-157.
- Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R. E. & Herz, J. 1998. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cremediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J. Clin. Invest* 101: 689-695.
- Rosenthal, M. D. 1981. Accumulation of neutral lipids by human skin fibroblasts: differential effects of saturated and unsaturated fatty acids. *Lipids* 16: 173-182.
- Rottman, J. N., Widom, R. L., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. & Karathanasis, S. K. 1991. A retinoic acidresponsive element in the apolipoprotein AI gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways. *Mol. Cell Biol.* 11: 3814-3820.
- Roussel, A., Canaan, S., Egloff, M. P., Riviere, M., Dupuis, L., Verger, R. & Cambillau, C. 1999. Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest. *J. Biol. Chem.* 274: 16995-17002.
- Rubinstein, A., Gibson, J. C., Paterniti, J. R., Jr., Kakis, G., Little, A., Ginsberg, H. N. & Brown, W. V. 1985. Effect of heparin-induced lipolysis on the distribution of apolipoprotein e among lipoprotein subclasses. Studies with patients deficient in hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest* 75: 710-721.
- Rudel, L. L., Marzetta, C. A. & Johnson, F. L. 1986. Separation and analysis of lipoproteins by gel filtration. *Methods Enzymol.* 129: 45-57.
- Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., Deleuze, J. F., Brewer, H. B., Duverger, N., Denefle, P. & Assmann, G. 1999. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATPbinding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* 22: 352-355.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sakai, J., Duncan, E. A., Rawson, R. B., Hua, X., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1996. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* 85: 1037-1046.
- Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 1998a. Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. J. Biol. Chem. 273: 5785-5793.
- Sakai, J., Rawson, R. B., Espenshade, P. J., Cheng, D., Seegmiller, A. C., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 1998b. Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol. Cell* 2: 505-514.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Sando, G. N. & Henke, V. L. 1982. Recognition and receptor-mediated endocytosis of the lysosomal acid lipase secreted by cultured human fibroblasts. *Journal of Lipid Research* 23: 114-123.

- Sando, G. N., Ma, G. P., Lindsley, K. A. & Wei, Y. P. 1990. Intercellular transport of lysosomal acid lipase mediates lipoprotein cholesteryl ester metabolism in a human vascular endothelial cell-fibroblast coculture system. *Cell Regulation* 1: 661-674.
- Sando, G. N. & Rosenbaum, L. M. 1985. Human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase: purification and properties of the form secreted by fibroblasts in microcarrier culture. *Journal of Biological Chemistry* 260: 15186-15193.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America* 74: 5463-5467.
- Sastry, K. N., Seedorf, U. & Karathanasis, S. K. 1988. Different cis-acting DNA elements control expression of the human apolipoprotein AI gene in different cell types. *Mol. Cell Biol.* 8: 605-614.
- Sato, R., Miyamoto, W., Inoue, J., Terada, T., Imanaka, T. & Maeda, M. 1999. Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J. Biol. Chem.* 274: 24714-24720.
- Schaefer, E. J. 2002. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. Am. J. Clin. Nutr. 75: 191-212.
- Schaefer, E. J., Wetzel, M. G., Bengtsson, G., Scow, R. O., Brewer, H. B., Jr. & Olivecrona, T. 1982. Transfer of human lymph chylomicron constituents to other lipoprotein density fractions during in vitro lipolysis. *J. Lipid Res.* 23: 1259-1273.
- Schmitz, G., Niemann, R., Brennhausen, B., Krause, R. & Assmann, G. 1985. Regulation of high density lipoprotein receptors in cultured macrophages: role of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. *EMBO Journal* 4: 2773-2779.

Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T. & Auwerx, J. 1995. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J. Biol. Chem.* 270: 19269-19276.

Schrag, J. D. & Cygler, M. 1997. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. Methods Enzymol. 284: 85-107.

- Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D. J., Lustig, K. D. & Shan, B. 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 14: 2831-2838.
- Scott, J. 1989. The molecular and cell biology of apolipoprotein-B. Mol. Biol. Med. 6: 65-80.
- Seedorf, U. & Assmann, G. 1991. Cloning, expression, and nucleotide sequence of rat liver sterol carrier protein 2 cDNAs. *J. Biol. Chem.* 266: 630-636.
- Seedorf, U., Ellinghaus, P. & Roch, N. J. 2000. Sterol carrier protein-2. Biochim. Biophys. Acta 1486: 45-54.
- Sheriff, S., Du, H. & Grabowski, G. A. 1995. Characterization of lysosomal acid lipase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *Journal of Biological Chemistry* 270: 27766-27772.
- Shimano, H., Horton, J. D., Hammer, R. E., Shimomura, I., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1996. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. J. Clin. Invest 98: 1575-1584.
- Shimano, H., Horton, J. D., Shimomura, I., Hammer, R. E., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1997. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. J. Clin. Invest 99: 846-854.
- Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 1997. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest* 99: 838-845.
- Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B. S., Bashmakov, Y. & Horton, J. D. 1998. Nuclear sterol regulatory elementbinding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. J. Biol. Chem. 273: 35299-35306.

- Shio, H., Haley, N. J. & Fowler, S. 1979. Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol-fed rabbits. III. Intracellular localization of cholesterol and cholesteryl ester. *Laboratory Investigation* 41: 160-167.
- Shulman, G. I. 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. J. Clin. Invest 106: 171-176.
- Simon, J., Cajzl, L., Krizek, M., Kraus, J. & Fiala, V. 1985. Incidence and risk of coronary heart disease in an industrial population. A five-year prospective study. *Czech. Med.* 8: 25-34.
- Sjoberg, E. R., Hatton, J. D. & O'Brien, J. S. 1987. Purification and characterization of a second form of acid lipase in human liver. *Biochemical Journal* 248: 139-144.
- Sladek, F. M., Ruse, M. D., Jr., Nepomuceno, L., Huang, S. M. & Stallcup, M. R. 1999. Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1. *Mol. Cell Biol.* 19: 6509-6522.
- Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E. & Darnell, J. E., Jr. 1990. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* 4: 2353-2365.
- Smith, A. G., Brooks, C. J. & Harland, W. A. 1974. Acid cholesterol ester hydrolase in pig and human aortas. *Steroids Lipids Res.* 5: 150-161.
- Smith, J. R., Osborne, T. F., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 1990. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. J. Biol. Chem. 265: 2306-2310.
- Srivastava, R. A. 1996. Regulation of the apolipoprotein E by dietary lipids occurs by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Mol. Cell Biochem.* 155: 153-162.
- Srivastava, R. A., Krul, E. S., Lin, R. C. & Schonfeld, G. 1997. Regulation of lipoprotein metabolism by estrogen in inbred strains of mice occurs primarily by posttranscriptional mechanisms. *Mol. Cell Biochem.* 173: 161-168.
- Staels, B. & Auwerx, J. 1998. Regulation of apo A-I gene expression by fibrates. *Atherosclerosis* 137 Suppl: S19-S23.
- Staels, B., Auwerx, J., Chan, L., van Tol, A., Rosseneu, M. & Verhoeven, G. 1989. Influence of development, estrogens, and food intake on apolipoprotein A-I, A-II, and E mRNA in rat liver and intestine. *J. Lipid Res.* 30: 1137-1145.
- Staels, B., Jansen, H., van Tol, A., Stahnke, G., Will, H., Verhoeven, G. & Auwerx, J. 1990. Development, food intake, and ethinylestradiol influence hepatic triglyceride lipase and LDL-receptor mRNA levels in rats. *J. Lipid Res.* 31: 1211-1218.
- Staels, B., van Tol, A., Andreu, T. & Auwerx, J. 1992. Fibrates influence the expression of genes involved in lipoprotein metabolism in a tissue-selective manner in the rat. *Arterioscler. Thromb.* 12: 286-294.
- Staels, B., van Tol, A., Chan, L., Verhoeven, G. & Auwerx, J. 1991. Variable effects of different corticosteroids on plasma lipids, apolipoproteins, and hepatic apolipoprotein mRNA levels in rats. *Arterioscler. Thromb.* 11: 760-769.
- Stampfer, M. J. & Colditz, G. A. 1991. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev. Med.* 20: 47-63.
- Stein, O., Dabach, Y., Hollander, G., Ben Naim, M., Halperin, G. & Stein, Y. 2001. Effect of atherogenic diet on reverse cholesterol transport in vivo in atherosclerosis susceptible (C57BL/6) and resistant (C3H) mice. *Atherosclerosis* 156: 307-313.
- Strauss, J. F., III, Liu, P., Christenson, L. K. & Watari, H. 2002. Sterols and intracellular vesicular trafficking: lessons from the study of NPC1. *Steroids* 67: 947-951.
- Sudhof, T. C., Russell, D. W., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1987. 42 bp element from LDL receptor gene confers end-product repression by sterols when inserted into viral TK promoter. *Cell* 48: 1061-1069.

- Swinnen, J. V., Alen, P., Heyns, W. & Verhoeven, G. 1998. Identification of diazepam-binding Inhibitor/Acyl-CoAbinding protein as a sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. J. Biol. Chem. 273: 19938-19944.
- Tabas, I. 1995. The stimulation of the cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.* 6: 260-268.
- Tabor, D. E., Kim, J. B., Spiegelman, B. M. & Edwards, P. A. 1999. Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 274: 20603-20610.
- Takahashi, Y. & Smith, J. D. 1999. Cholesterol efflux to apolipoprotein Al involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 11358-11363.
- Takano, T., Black, W. J., Peters, T. J. & de Duve, C. 1974. Assay, kinetics, and lysosomal localization of an acid cholesteryl esterase in rabbit aortic smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 249: 6732-6737.
- Tall, A. R., Jiang, X., Luo, Y. & Silver, D. 2000. 1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1185-1188.
- Tam, S. P. & Breckenridge, W. C. 1983. Apolipoprotein and lipid distribution between vesicles and HDL-like particles formed during lipolysis of human very low density lipoproteins by perfused rat heart. *J. Lipid Res.* 24: 1343-1357.
- Tanaka, H., Ohtsuka, I., Kogushi, M., Kimura, T., Fujimori, T., Saeki, T., Hayashi, K., Kobayashi, H., Yamada, T., Hiyoshi, H. & 1994. Effect of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor, E5324, on experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 107: 187-201.
- Tanaka, M., Jingami, H., Otani, H., Cho, M., Ueda, Y., Arai, H., Nagano, Y., Doi, T., Yokode, M. & Kita, T. 1993. Regulation of apolipoprotein B production and secretion in response to the change of intracellular cholesteryl ester contents in rabbit hepatocytes. J. Biol. Chem. 268: 12713-12718.
- Tanaka, S., Mohr, L., Schmidt, E. V., Sugimachi, K. & Wands, J. R. 1997. Biological effects of human insulin receptor substrate-1 overexpression in hepatocytes. *Hepatology* 26: 598-604.
- Tang, J. J., Krul, E. S. & Schonfeld, G. 1991. In vivo regulation of apolipoprotein A-I gene expression by estradiol and testosterone occurs at the translational level in inbred strains of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 1407-1411.
- Thrift, R. N., Forte, T. M., Cahoon, B. E. & Shore, V. G. 1986. Characterization of lipoproteins produced by the human liver cell line, Hep G2, under defined conditions. *J. Lipid Res.* 27: 236-250.
- Tietge, U. J., Sun, G., Czarnecki, S., Yu, Q., Lohse, P., Du, H., Grabowski, G. A., Glick, J. M. & Rader, D. J. 2001. Phenotypic correction of lipid storage and growth arrest in wolman disease fibroblasts by gene transfer of lysosomal acid lipase. *Hum. Gene Ther.* 12: 279-289.
- Trigatti, B. & Rigotti, A. 2000. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) and high-density lipoprotein metabolism: recent lessons from genetically manipulated mice. *Int. J. Tissue React.* 22: 29-37.
- Tugwood, J. D., Issemann, I., Anderson, R. G., Bundell, K. R., McPheat, W. L. & Green, S. 1992. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* 11: 433-439.
- Vergnes, L., Baroukh, N., Ostos, M. A., Castro, G., Duverger, N., Nanjee, M. N., Najib, J., Fruchart, J. C., Miller, N. E., Zakin, M. M. & Ochoa, A. 2000. Expression of human apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in mice induces hyperlipidemia but reduces atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 2267-2274.
- von Eckardstein, A., Huang, Y. & Assmann, G. 1994. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr. Opin. Lipidol.* 5: 404-416.
- von Eckardstein, A., Jauhiainen, M., Huang, Y., Metso, J., Langer, C., Pussinen, P., Wu, S., Ehnholm, C. & Assmann, G. 1996. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL. *Biochim. Biophys. Acta* 1301: 255-262.

von Figura, K. & Hasilik, A. 1986. Lysosomal enzymes and their receptors. Annu. Rev. Biochem. 55: 167-193.
- Vu-Dac, N., Chopin-Delannoy, S., Gervois, P., Bonnelye, E., Martin, G., Fruchart, J. C., Laudet, V. & Staels, B. 1998. The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J. Biol. Chem.* 273: 25713-25720.
- Walsh, A., Ito, Y. & Breslow, J. L. 1989. High levels of human apolipoprotein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoprotein (HDL) particles comparable to human HDL3. J. Biol. Chem. 264: 6488-6494.
- Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F. & Tall, A. R. 1998. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. J. Biol. Chem. 273: 32920-32926.
- Wang, S. L., Du, E. Z., Martin, T. D. & Davis, R. A. 1997. Coordinate regulation of lipogenesis, the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins by sterol response element binding protein 1. J. Biol. Chem. 272: 19351-19358.
- Wang, X., Sato, R., Brown, M. S., Hua, X. & Goldstein, J. L. 1994. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 77: 53-62.
- Warner, G. J., Stoudt, G., Bamberger, M., Johnson, W. J. & Rothblat, G. H. 1995. Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol. J. Biol. Chem. 270: 5772-5778.
- Warner, T. G., Dambach, L. M., Shin, H. J. & O'Brien, J. S. 1981. Purification of the lysosomal acid lipase from human liver and its role in lysosomal lipid hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* 256: 2952-2957.
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Glick, J. M., Patel, S., Neufeld, E. B., Brady, R. O., Pentchev, P. G. & Strauss, J. F., III 1999a. Niemann-Pick C1 protein: obligatory roles for N-terminal domains and lysosomal targeting in cholesterol mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 805-810.
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Watari, M., Neufeld, E. B., Patel, S., Pentchev, P. G. & Strauss, J. F., III 1999b. Mutations in the leucine zipper motif and sterol-sensing domain inactivate the Niemann-Pick C1 glycoprotein. J. Biol. Chem. 274: 21861-21866.
- White, T. J., Arnheim, N. & Ehrlich, A. H. 1989. The polymerase chain reaction. Trends Genet 5: 185-189.
- Widom, R. L., Ladias, J. A., Kouidou, S. & Karathanasis, S. K. 1991. Synergistic interactions between transcription factors control expression of the apolipoprotein AI gene in liver cells. *Mol. Cell Biol.* 11: 677-687.
- Widom, R. L., Rhee, M. & Karathanasis, S. K. 1992. Repression by ARP-1 sensitizes apolipoprotein AI gene responsiveness to RXR alpha and retinoic acid. *Mol. Cell Biol.* 12: 3380-3389.
- Wilkie, T. M., Brinster, R. L. & Palmiter, R. D. 1986. Germline and somatic mosaicism in transgenic mice. *Dev. Biol.* 118: 9-18.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A. & Hunziker, W. 1990. Structure of human pancreatic lipase. Nature 343: 771-774.
- Wolkoff, A. W. & Cohen, D. E. 2003. Bile Acid Regulation of Hepatic Physiology: I. Hepatocyte transport of bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G175-G179.
- Wolman, M., Sterk, V. V., Gatt, S. & Frenkel, M. 1961. Primary familial xanthomatosis with involvement and calcification of the adrenals: Report of two more cases in siblings of a previously described infant. *Pediatrics* 28: 742-757.
- Wong, H. & Schotz, M. C. 2002. The lipase gene family. J. Lipid Res. 43: 993-999.
- Woodyatt, N. J., Lambe, K. G., Myers, K. A., Tugwood, J. D. & Roberts, R. A. 1999. The peroxisome proliferator (PP) response element upstream of the human acyl CoA oxidase gene is inactive among a sample human population: significance for species differences in response to PPs. *Carcinogenesis* 20: 369-372.
- Xie, C., Woollett, L. A., Turley, S. D. & Dietschy, J. M. 2002. Fatty acids differentially regulate hepatic cholesteryl ester formation and incorporation into lipoproteins in the liver of the mouse. *J. Lipid Res.* 43: 1508-1519.

- Xu, J., Nakamura, M. T., Cho, H. P. & Clarke, S. D. 1999. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. J. Biol. Chem. 274: 23577-23583.
- Yatsu, F. M., Hagemenas, F. C., Manaugh, L. C. & Galambos, T. 1980. Cholesteryl ester hydrolase activity in human symptomatic atherosclerosis. *Lipids* 15: 1019-1022.
- Yokoyama, S. & McCoy, E. 1992. Long-term treatment of a homozygous cholesteryl ester storage disease with combined cholestyramine and lovastatin. *Journal Of Inherited Metabolic Disease* 15: 291-2.
- Yoshida, H. & Kuriyama, M. 1990. Genetic lipid storage disease with lysosomal acid lipase deficiency in rats. Laboratory Animal Science 40: 486-489.
- Zannis, V. I., Cole, F. S., Jackson, C. L., Kurnit, D. M. & Karathanasis, S. K. 1985. Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. *Biochemistry* 24: 4450-4455.
- Zhang, C. L., Lyngmo, V. & Nordoy, A. 1992. The effects of saturated fatty acids on endothelial cells. *Thromb. Res.* 65: 65-75.
- Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J. & Ansorge, W. 1988. Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS Lett.* 233: 432-436.
- Zschenker, O., Jung, N., Rethmeier, J., Trautwein, S., Hertel, S., Zeigler, M. & Ameis, D. 2001. Characterization of lysosomal acid lipase mutations in the signal peptide and mature polypeptide region causing Wolman disease. *J. Lipid Res.* 42: 1033-1040.

## 8 Danksagung

Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel danke ich für die Möglichkeit, diese experimentelle Arbeit in ihrem Labor durchzuführen und die intensive wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Detlev Ameis danke ich für die Einführung in das Thema.

Besonderer Dank geht an Dr. Jörg Heeren für viele wissenschaftliche Tipps und Anregungen und für die Bereitschaft, sich in "mein Thema" einzudenken.

Allen Mitarbeitern der Abteilung der Molekularen Zellbiologie sei ebenfalls gedankt, desgleichen Dr. Olli Zschenker und Britta Schwarzloh für fachliche, technische und moralische Unterstützung.

Mein Dank gebührt auch dem GRK 366 der DFG, ohne dessen Stipendium die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Marcel.